

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto de los procedimientos de separación sobre la
integridad del DNA espermático de *Vicugna pacos*
“alpaca”, Ayacucho 2017.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Presentado por la:
Bach. CONTRERAS MEJÍA, Mónica

AYACUCHO – PERÚ
2018

A Dios por darme el regalo más grande,
el don de la vida.

A mis padres Marcelino e Isidora por
todo su apoyo incondicional y a mis
hermanos por ser mi ejemplo a seguir.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi *Alma Mater*, por haberme acogido en sus aulas durante los años de estudio y por ser formadora de personas con conocimiento profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología, sobretodo a mi querida Especialidad de Biotecnología y en general a toda la plana docente.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho, por haberme permitido usar sus instalaciones y por ceder los materiales necesarios para realizar el presente trabajo de investigación.

Al Biólogo Fidel Rodolfo Mujica Lengua, asesor del presente trabajo por su apoyo y disponibilidad de tiempo en el desarrollo y redacción, muy agradecida por sus valiosos consejos, sugerencias, comprensión, confianza y amistad.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores, co-asesora del presente trabajo, por todas las facilidades brindadas en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del INIA, por su apoyo, sugerencias y comprensión.

Al M.V. Mijaíl Contreras Huamaní, M.V. Edwin Mendoza y Ronal Robles por su apoyo, experiencia y por guiarme durante la ejecución del presente trabajo.

A la Mg. Martha Valdivia Cuya, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, quien a la distancia supo guiarme, compartir sus conocimientos, brindarme su apoyo, confianza y amistad.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón, por haber contribuido con sus conocimientos y por haber sido de gran ayuda en la redacción del presente trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Reproducción asistida en Camélidos Sudamericanos	4
2.3. Criopreservación de espermatozoides en técnicas de reproducción asistida	6
2.4. Características del semen de alpaca	7
2.5. Evaluación de la función espermática	10
2.6. Técnicas de separación espermática	12
2.7. DNA del espermatozoide	16
2.8. Orígenes de la fragmentación en el DNA espermático	16
2.9. Técnicas para evaluar el daño en el DNA espermático	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Lugar de investigación	23
3.2. Material biológico	23
3.3. Técnicas de separación espermática	24
3.4. Evaluaciones de la calidad espermática	24
3.5. Procedimiento experimental	27
3.6. Análisis estadístico	32
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	51
VI. CONCLUSIONES	57
VII. RECOMENDACIONES	59
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Patrones de coloración de los estados de condensación de la cromatina espermática mediante la coloración Azul de Toluidina (AT).	26
Tabla 2. Motilidad progresiva de los espermatozoides de “alpaca” (media \pm DS) según las técnicas de separación espermática. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	35
Tabla 3. Vitalidad de los espermatozoides de “alpaca” (Media \pm DS) según las técnicas de separación espermática. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).	37
Tabla 4. Concentración de espermatozoides de “alpaca” (Media \pm DS) según las técnicas de separación espermática. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).	39
Tabla 5. Prueba de integridad de membrana plasmática en espermatozoides de “alpaca” (Media \pm DS) según las técnicas de separación espermática. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	41
Tabla 6. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca” (Media \pm DS) según la técnica del Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Espermatozoide de alpaca evaluado mediante microscopia óptica 400X.	8
Figura 2. Armado de la vagina artificial (izquierda) y monta de la alpaca macho en el maniquí (derecha)	9
Figura 3. Esquema comparativo entre la estructura de la cromatina de células somáticas y la de espermatozoides	15
Figura 4. Patrones de espermatozoides de llama teñidos con Azul de Toluidina: A) negativos: color azul, sin alteración en la condensación normal de la cromatina, B) intermedios: color violeta claro, algún grado de descondensación C) positivos: color violeta oscuro, alto grado de descondensación. (1000X)	20
Figura 5. Diseño experimental de la aplicación de las técnicas de separación espermática Swim up y Gradiente de Percoll, para la evaluación de la integridad del DNA espermático de alpaca	27
Figura 6. Proceso del descongelamiento de pajillas del semen de “alpaca” para la evaluación de parámetros espermáticos	28
Figura 7. Proceso de separación de espermatozoides por la técnica de Swim up para la evaluación de los parámetros espermáticos. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	29
Figura 8. Proceso de separación de espermatozoides mediante la técnica Gradiente de Percoll para la evaluación de los parámetros espermáticos. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	30
Figura 9. Proceso de evaluación de la integridad del DNA espermático mediante la técnica del Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA. Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	31
Figura 10. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides de “alpaca”. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	36
Figura 11. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la vitalidad de los espermatozoides de “alpaca”. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-	38

	Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	
Figura 12.	Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la concentración de los espermatozoides de “alpaca”. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	40
Figura 13.	Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad de membrana plasmática de los espermatozoides de “alpaca”. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	42
Figura 14.	(A) Vitalidad, (B) integridad de membrana plasmática y (C) concentración de espermatozoides de alpaca, 40X. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	43
Figura 15.	Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca”, negativos a la coloración con Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).	45
Figura 16.	Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca”, intermedios a la coloración con Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).	46
Figura 17.	Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca”, positivos a la coloración con Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).	47
Figura 18.	Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca”, con Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017)	48
Figura 19.	Patrones de coloración de los espermatozoides de “alpaca”, mediante la tinción del Azul de Toluidina: (A) Negativos; color azul, sin alteración de la condensación de la cromatina, (B) Intermedios; violeta claro, algún grado de descondensación, (C) Positivos; violeta oscuro, alto grado de descondensación a 100X. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).	49

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Composición del medio hipoosmótico	69
Anexo 2. Composición del medio Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato: TALP-Sperm 10X	69
Anexo 3. Composición del medio Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato: TALP-FIV	70
Anexo 4. Composición del Percoll 90%	70
Anexo 5. Composición del Percoll 45%	70
Anexo 6. Análisis estadístico realizado usando como variables (técnicas de separación espermática) entre los grupos de estudio (parámetros espermáticos) mediante la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, ($p \leq 0.05$)	71
Anexo 7. Análisis estadístico realizado usando como variables (motilidad, vitalidad, concentración e integridad de la membrana plasmática) mediante la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey	72
Anexo 8. Análisis estadístico realizado usando como variables (técnicas de separación espermática) entre los grupos de estudio (descondensación de la cromatina espermática) mediante la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, ($p \leq 0.05$)	74
Anexo 9. Análisis estadístico realizado usando como variables (descondensación de la cromatina espermática: negativo, intermedio, positivo) mediante la prueba Kruskal-Wallis, ($p \leq 0.05$)	75
Anexo 10. Fotografías preparado y fijado de muestras espermáticas de alpaca para su posterior evaluación	77
Anexo 11. Matriz de consistencia	78

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán - INIA - Ayacucho, ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray, de la provincia de Huamanga, región de Ayacucho entre los meses de julio a setiembre del 2017. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de las técnicas de separación espermática Swim up y Gradiente de Percoll sobre la motilidad, vitalidad, concentración, integridad de membrana plasmática e integridad del DNA de los espermatozoides de *Vicugna pacos* "alpaca". Las pajillas fueron descongeladas a 37°C, seguidamente se evaluaron los parámetros espermáticos y otra fracción se procedió a realizar la separación espermática. Para la evaluación de la integridad del DNA espermático se utilizó la Prueba del Azul de Toluidina. La motilidad espermática fue el parámetro más afectado, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre las técnicas Swim up y Gradiente de Percoll (13,13 y 15,60%), del mismo modo en el caso de la concentración espermática (36,67 y 80,51%); mientras que en vitalidad (54,19 y 53,45%) e integridad de membrana plasmática (56,30 y 57,18%) respectivamente para cada técnica de separación espermática, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$). En cuanto a la integridad del DNA espermático, los patrones de coloración observados fueron: Azul (AT negativo: Sin alteración de la condensación de la cromatina espermática), violeta claro (AT intermedio, algún grado de descondensación) y violeta oscuro (AT positivo, alto grado de la descondensación); mientras que los porcentajes encontrados para Swim up y Gradiente de Percoll fueron: AT negativo (97,83 y 95,28%), AT intermedio (2,07 y 3,62%) y AT positivo (0,10 y 1,10%) respectivamente, en los cuales se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambas técnicas de separación espermática ($p \leq 0.05$). En conclusión, ambas técnicas de separación espermática causaron daño a los espermatozoides, siendo la técnica de Swim up, el que generó menor daño en la integridad del DNA espermático.

Palabras claves: Swim up, Gradiente de Percoll, integridad del DNA, pajilla de semen.

I. INTRODUCCIÓN

La alpaca es uno de los Camélidos Sudamericanos (CSA) más importantes en nuestro país, constituye un recurso genético de gran importancia desde el punto de vista social, cultural, económico, ecológico y científico para el desarrollo local de miles de familias de la región andina comprendida entre 4000 a 5500 m de altitud, siendo fuente de fina fibra, carne ecológica y trabajo para la subsistencia de un amplio sector de la población alto andina.

El Perú tiene el privilegio de ocupar el primer lugar a nivel mundial en cuanto a la población de alpacas, el aprovechamiento racional de esta ventaja es el reto que el país encara como el medio más efectivo de lucha contra la inseguridad alimentaria y la pobreza del sector ganadero que poseen este valioso recurso. Para que esta ventaja se convierta en un factor de desarrollo se necesita contar con alternativas tecnológicas y así desarrollar un programa de mejora genética de sus animales y hacer de su crianza una actividad competitiva y rentable.

La Fertilización *In Vitro* (FIV) es una técnica de reproducción asistida, donde espermatozoides previamente capacitados fecundan ovocitos maduros con el propósito de producir embriones que luego serán transferidos a una hembra receptora, utilizando semen de alta calidad previamente congelado. Durante la criopreservación de espermatozoides se produce estrés físico y químico, y adicionalmente durante la separación espermática ya sea utilizando la técnica Swim up o Gradiente de Percoll, los espermatozoides se someten a un procedimiento de lavado y separación por centrifugación en los que se puede generar daño a la membrana plasmática y aumentar la producción basal de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs).¹ Las EROs son moléculas producidas por los mismos espermatozoides y tienen un efecto dual sobre las células espermáticas, ya que fisiológicamente son requeridas para los procesos de capacitación y reacción acrosómica, pero también sus altas concentraciones producen alteraciones directamente sobre la membrana plasmática y de una

manera dependiente de la dosis, pueden generar un aumento significativo en la fragmentación del DNA.² Los espermatozoides con anomalías en la cromatina pueden fertilizar ovocitos y producir embriones; sin embargo, se ha propuesto que dichos embriones podrían no llegar a término y/o no originar individuos sanos.³

Como lo mencionado anteriormente, las EROs no solo se generan durante la criopreservación, sino que aumentan durante los procedimientos de separación espermática generando daño en el DNA. En consecuencia, en el presente trabajo se realizó una investigación para evaluar el efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA espermático previo a realizar FIV, y así considerarlo como un nuevo parámetro de análisis seminal, lo cual permita poner de relieve la importancia de la valoración de la calidad de los espermatozoides en el eyaculado criopreservado y asegurar una buena tasa de fecundidad, preñez e individuos sanos para la explotación ganadera.

Los objetivos de la investigación fueron:

Objetivo General

Evaluar el efecto de los procedimientos de la separación sobre la integridad del DNA espermático en alpacas previo a la Fertilización *In Vitro* (FIV).

Objetivos Específicos

1. Evaluar los parámetros fisiológicos de motilidad, vitalidad, concentración e integridad de la membrana plasmática de espermatozoides seminales post descongelación y luego del proceso de separación espermática en alpacas.
2. Evaluar la integridad del DNA de espermatozoides seminales post descongelación y luego de la separación espermática por Swim up y Gradiente de Percoll, utilizando la Prueba del Azul de Toluidina.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Se compararon dos técnicas de separación de espermatozoides: Gradiente de Percoll y Swim up a diferentes tiempos de centrifugación (10, 30 y 45 min) y como control negativo espermatozoides no centrifugados, evaluando en ellos la fragmentación del DNA mediante el Ensayo Cometa. Los resultados evidenciaron que durante 10, 30 y 45 min de centrifugación a 700 g después de la realización del gradiente diferencial de Percoll, tuvo un efecto deletéreo sobre el DNA de los espermatozoides bovinos y que la centrifugación por 45 min además de causar daño en el DNA produjo pérdida de la integridad de la membrana plasmática.⁴

El Azul de Toluidina (AT) se ha utilizado para evaluar el grado de descondensación del DNA y determinar los patrones de coloración en semen fresco de alpacas. Se observaron los mismos patrones de tinción a los encontrados en llama, guanaco y el esperma equino: azul claro (negativo, sin alteración de la condensación de la cromatina), violeta claro (intermedio, algún grado de descondensación), violeta oscuro (positivo, alto grado de descondensación). Los porcentajes observados fueron (media \pm DE): AT positivo $7,55 \pm 5,22\%$, AT intermedio $21,67 \pm 6,81\%$ y AT negativo $70,78 \pm 10,80\%$.⁵

Se puso a punto la técnica de AT para la evaluación de la condensación de la cromatina espermática de llama, fijándose las muestras con etanol 96% durante 2 y 30 min. Los patrones de coloración observados fueron: coloración azul claro (negativos, sin alteración en la condensación normal de la cromatina), violeta claro (intermedios, algún grado de descondensación) y violeta oscuro (positivos, alto grado de descondensación). No se observaron diferencias significativas entre los tiempos de fijación y en conclusión se logró simplificar la técnica de AT y determinar los diferentes patrones en espermatozoides de llama y para evaluar la susceptibilidad de cada individuo a la descondensación *in vitro*.⁶

Se estudió la relación entre la integridad de la cromatina y las morfoanomalías de la cabeza espermática utilizando la tinción del Azul de Toluidina en semen descongelado de toros. Se agruparon según el estado de la cromatina, en normal (azul o verde claro) y en cromatina dañada (azul oscuro o violeta). Los espermatozoides con cromatina normal presentaron un porcentaje significativamente menor de morfoanomalías de la cabeza 2,13% que aquellos espermios que presentaron cromatina dañada 30,42%, la integridad de la cromatina y la morfología espermática están estrechamente relacionadas y los espermatozoides con cromatina dañada presentan más anomalías de la cabeza que los espermatozoides con cromatina normal.⁷

En semen fresco de humanos, se compararon muestras procesadas mediante Gradiente de Densidades (GD) y muestras antes de procesar, mediante la Prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática (DCS). Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa en la tasa de fragmentación del DNA espermático en muestras tras GD. Los espermatozoides inmóviles tienen más probabilidad de presentar el DNA fragmentado que los espermatozoides móviles.⁸

Se procesaron muestras de semen humano mediante Swim up y Gradiente de Densidades, valorando la fragmentación del DNA mediante el Ensayo Cometa. Los resultados mostraron que ambos métodos fueron beneficiosos en cuanto a la obtención de espermatozoides con menor grado de fragmentación y cuando se analizó cuál de los dos métodos era más efectivo, se observó que los espermatozoides recuperados tras GD tenían la media de fragmentación significativamente menor que los recuperados mediante Swim up; probablemente tenga mucho que ver el protocolo utilizado.⁹

2.2. Reproducción asistida en Camélidos Sudamericanos

La alpaca tienen una vida reproductiva de aproximadamente 14 años, quedando apta para la reproducción a los 2 años. La hembra presenta actividad sexual entre los meses de diciembre a marzo correspondientes a épocas de lluvias y de mayor disponibilidad de pastos, durante este período permanece en celo continuo hasta que es tomada por el macho. El periodo de gestación es de aproximadamente 345 días resultando en el nacimiento de una sola cría y se ha descrito que cerca del 50% de las gestaciones terminan dentro de los primeros 30 días.¹⁰ Las alpacas enfrentan problemas reproductivos de diversa índole que pueden afectar tanto a la hembra como al macho siendo el más relevante la baja

tasa de natalidad debido a la mortalidad embrionaria, con un porcentaje de preñez entre 40 - 60%¹¹ y un largo intervalo generacional.

El manejo de alpacas, son de tipo tradicional y carente de innovaciones tecnológicas. La crianza mixta de llamas y alpacas afecta la calidad de fibra, produciendo un alto porcentaje de animales manchados, híbridos o cruzados y otros con defectos congénitos por efecto de la alta consanguinidad de los rebaños; asimismo, durante mucho tiempo se ha estado introduciendo reproductores machos, sin importar la zona agroecológica de procedencia. Esta actividad ha contribuido a disminuir la variabilidad genética en los rebaños, en algunos casos favorablemente y en otros no.¹²

El desarrollo de las biotecnologías reproductivas en camélidos aún requiere investigaciones pero a la fecha se han realizado importantes avances de forma limitada. La Inseminación Artificial (IA) es una de las tecnologías de mayor impacto en bovinos lecheros; mientras que en camélidos aún persisten problemas, para la colección de semen, su manejo (naturaleza viscosa), uso de dilutores para su conservación, baja concentración de espermatozoides y el alto porcentaje de anormales.¹⁰ Las experiencias sobre IA reportan tasas de preñez del 73% con semen fresco depositado en los cuernos uterinos y los reportes con semen congelado son muy escasos; debido a que los porcentajes de motilidad pos descongelamiento encontrados fueron del 20%¹³ hasta 30 – 40%.¹⁴ Los porcentajes de preñez del 0 al 10% obtenidos al inseminar con semen congelado, indicarían que los espermatozoides sufren un deterioro en su capacidad fecundante, porque a pesar de que se inseminó con igual cantidad de espermatozoides viables y móviles, con el semen criopreservado se obtuvo un menor porcentaje de preñez que con semen fresco.¹⁵

En la transferencia de embriones, mediante estimulación hormonal se pudo obtener 4.3% de embriones en alpacas,¹⁶ para ser transferidas a otras hembras receptoras confirmándose así la factibilidad de la técnica pero con una variabilidad en la respuesta ovárica. La criopreservación de embriones y su posterior transferencia también se presentan como alternativa promisoría.

Mediante la Fertilización *In Vitro* (FIV), existen dos maneras en la que un óvulo puede ser fertilizado: En la FIV tradicional, el ovocito maduro se expone a espermatozoides previamente capacitados para que se produzca la fecundación; mientras que en el proceso de la Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), se utiliza una pequeña aguja, para inyectar un solo espermatozoide en el centro del óvulo. Ya sea con la fertilización tradicional FIV

o con la ICSI, una vez que la fertilización ocurre, el óvulo fecundado (ahora denominado embrión) crece en el laboratorio durante 1 a 5 días antes de ser transferido al útero de la hembra receptora. La FIV se aplica para la obtención de embriones a gran escala y aprovechar el potencial genético de los animales sobresalientes con características de importancia económica.¹⁷

En los procedimientos de biotecnología reproductiva generalmente se utiliza semen de alta calidad, sometiendo a los espermatozoides a procedimientos de lavado y separación por centrifugación en el que los de mejor movilidad son separados del plasma seminal, de los muertos e inmóviles, de los diluyentes, crioprotectores y de otras estructuras, por medio de técnicas de separación espermática.³ Durante estos procedimientos se pueden generar daño a la integridad espermática¹ y al material genético. Aun con este daño, los espermatozoides son capaces de fertilizar y transmitir material genético defectuoso, con consecuencias adversas para el desarrollo embrionario.¹⁸

2.3. Criopreservación de espermatozoides en técnicas de reproducción asistida

Este proceso pone a las células en animación suspendida donde pueden retener su viabilidad y procesos metabólicos indefinidamente. En la práctica, las células congeladas son almacenadas a temperaturas de -196°C en nitrógeno líquido.¹⁹

Hoy en día se usan muchos protocolos en los cuales se trabajan con Agentes Crioprotectores (ACPs), en variadas concentraciones, los cuales son clasificados en dos grupos: agentes crioprotectores permeables, estos ingresan dentro de la célula ya que poseen un peso molecular relativamente bajo, dentro de este grupo se encuentra el glicerol, dimetilsulfóxido (DMSO), el propilén glicol, dimetilacetamida (DMA) entre otros; y agentes crioprotectores no permeables, no ingresan dentro de la célula ya que son de peso molecular relativamente alto y su efecto lo ejercen en el medio exterior, ya que estos agentes crioprotectores mayormente son azúcares y favorecen la deshidratación celular. Dentro de este grupo se encuentran la glucosa, sacarosa, trealosa y fructosa.²⁰

A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130°C no existe agua en el estado líquido. Con una velocidad de congelación demasiado lenta el espermatozoide pierde toda el agua intracelular, de manera que no se forman cristales de hielo intracelulares. Por el contrario cuando la velocidad de congelación es demasiado rápida el agua intracelular no llega a salir del espermatozoide y se forma hielo intracelular.²¹

Durante el enfriamiento hasta 5°C la membrana plasmática sufre una reorganización de sus componentes. La membrana consta de una bicapa lipídica compuesta por diferentes tipos de fosfolípidos, proteínas integrales y colesterol; cada una de las especies de fosfolípidos presenta una temperatura de transición de fase diferente, cuando la membrana es sometida a un descenso de temperatura, se producen cambios de fase de los fosfolípidos, (fase líquida-cristalina a fase de gel) y las cadenas de ácidos grasos que los componen se convierten en rígidas y paralelas. Se forman dominios de gel a medida que las diferentes familias de fosfolípidos llegan a su temperatura de transición de fase, y el resultado final es una mayor rigidez de la membrana. Cuando la membrana es devuelta a la temperatura inicial, los fosfolípidos vuelven al estado líquido, pero ni éstos ni las proteínas vuelven a su localización inicial, produciendo una alteración en la función de la membrana plasmática.²¹

Por otra parte, el ciclo de congelación y descongelación ha sido descrito como responsable de una disminución en el nivel de antioxidantes, esta disminución permitiría que las EROs causen daño a los espermatozoides durante el proceso de criopreservación.⁴ Actualmente los resultados en la criopreservación de semen de alpaca son pobres debido a que no está muy bien desarrollada; existen dificultades para la colección de semen y el manejo de éste debido a su naturaleza viscosa, haciendo difícil su manejo y dilución.¹⁰ La motilidad espermática de semen post descongelamiento varía alrededor del 10-20%;¹³ sin embargo se tienen reportes de 46,7%²² y otro bastante desalentador del 0,00%;²³ mientras que en porcentaje de vitalidad se tiene en un rango de 40 a 50%.²⁴

2.4. Características del semen de alpaca

El semen de alpaca presenta una coloración que puede variar desde el blanco lechoso a blanco cristalino, según la concentración de espermatozoides, el volumen oscilan entre 1 a 4 ml²⁵ incluso más, extrema filancia y un plasma seminal con alta viscosidad, semejante a un gel que dificulta su manejo. Se compone de 11,5% de espermatozoides y 88,5% de líquido seminal.²⁶ El pH se encuentra en el rango de 7,2 - 8,6.¹⁴ Las anomalías morfológicas: presencia de doble cola (9-15%), cabezas sin colas y cabezas dobles (3-13%) y la presencia de gotas citoplasmáticas en 1 – 7% de los espermatozoides.¹¹

La alta viscosidad del plasma seminal así como la baja concentración espermática determinan patrones de motilidad particulares, en comparación con otras especies. No existe motilidad masal y la motilidad individual es estacionaria

u oscilante y no progresivo, ya que la mayoría de espermatozoides se mueven hacia atrás y adelante. Sólo del 5 al 10% de los espermatozoides tienen un movimiento progresivo hacia adelante.²⁷

El espermatozoide

Los espermatozoides son producidos durante la espermatogénesis, son células elongadas; la cabeza aplanada contiene al núcleo y la cola es un sistema que permite la motilidad espermática. Los cambios de madurez en el espermatozoide dependen de las secreciones del epidídimo y del tiempo de transporte. Uno de los cambios más notorios del espermatozoide durante la maduración epididimaria es el desarrollo de la motilidad espermática, los lípidos de membrana sufren cambios físicos y químicos lo que influye en el patrón de distribución de proteínas intramembrana (glicoproteínas), siendo un factor importante la presencia de altas cantidades de colesterol en el epidídimo las cuales estabilizan la membrana del espermatozoide.²⁸

La cabeza está cubierta por el acrosoma y compuesto por una membrana acrosomal externa e interna. Posee acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas que participan en el proceso de la fecundación, el segmento ecuatorial del acrosoma es importante debido a que esta parte del espermatozoide, junto con el segmento anterior de la región posacrosómica, se fusiona inicialmente con la membrana del ovocito durante la fecundación. La cola contiene elementos metabólicos para producir energía y proporciona mecanismos de propulsión para la motilidad. Esta estructura está formada por una pieza media, una pieza principal y una pieza terminal; un delicado cuello se ensambla entre la pieza media y la cabeza y las fibrillas flagelares amplían la longitud de la cola. La gota citoplasmática, que suele desprenderse de los espermatozoides tras la eyaculación, está compuesta de citoplasma residual.²⁹



Figura 1. Espermatozoide de alpaca evaluado mediante microscopía óptica 400X.

Fuente: Santiani (2012).³⁰

El espermatozoide de alpaca presenta una longitud total de 47 μ , mientras que el largo y el ancho promedio de la cabeza mide 6 y 3 μ respectivamente.³¹ En otro estudio, empleando un sistema de análisis de imagen computarizado, se evaluó la morfometría de las cabezas de los espermatozoides presentes en el semen, en el cual se definieron tres categorías de acuerdo al tamaño de las cabezas: normal 50%, pequeño 26% y grande 24% y cinco categorías de acuerdo a la forma de la cabeza del espermatozoide: normal 47%, piriforme 3%, pequeño 20%, redondo 1% y grande 29%.²⁹

2.4.1. Colección de semen de alpaca por el método de la vagina artificial

En este método se elabora un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de cópula; la vagina artificial para alpacas fue una modificación de aquella usada para vacunos y ovinos, la cual consiste en un tubo de PVC adaptado con una válvula para ingresar aire, introduciendo una manga de látex, de un extremo se amarra con bandas elásticas y el otro extremo queda suelto hasta introducir agua caliente en cantidad suficiente como para crear presión y temperatura similar a la vagina de la hembra, se pasa a sellar con bandas elásticas y se envuelve con franelas para conservar el calor. Con una bomba se introduce aire para generar presión, en una funda cónica se coloca un tubo falcon y en un extremo se sujeta con cinta adhesiva. La vagina artificial, antes preparada se le adapta a un maniquí y los machos aceptan el maniquí después de un corto entrenamiento.³²



Figura 2. Armado de la vagina artificial (izquierda) y monta de la alpaca macho en el maniquí (derecha).

Fuente: Torres (2006)³³

La colección de semen en CSA es bastante dificultosa dadas las características reproductivas, anatómicas y fisiológicas de esta especie y no existe un protocolo recomendado y una técnica óptima, así como su manejo posterior.

2.4.2. Evaluaciones sobre el estado de los espermatozoides

La estimación de la calidad o de la evaluación de espermatozoides requiere la contrastación y correlación con datos de motilidad espermática, viabilidad, morfología celular y grado de integridad celular (especialmente del acrosoma). Hoy en día no existe un método universal que pueda predecir la fertilidad de las muestras de espermatozoides. El objetivo de las pruebas de valoración *in vitro* es determinar cuántos espermatozoides son funcionalmente competentes para alcanzar el proceso de fertilización con éxito.³⁴

Las anomalías de los espermatozoides se pueden clasificar en “compensables” y “no compensables”. Los defectos compensables, son aquellos que dan lugar a fallos en la fertilización pero pueden ser compensados al incrementar el número de espermatozoides en la dosis inseminante,³⁵ como:

- Viabilidad espermática.
- Anomalías morfológicas.
- Características de funcionalidad (movilidad, concentración y duración de los espermatozoides para la reacción acrosómica).

Por el contrario, los defectos “no compensables”, engloban aquellos cuya presencia no limita el tránsito de los espermatozoides, ni la probabilidad de fecundación, pero causan deficiencias en la fertilización del ovocito o en el progreso embrionario.³⁵

- Daños en el DNA espermático.
- Mutaciones cromosómicas.
- Defectos en la morfología de la cabeza del espermatozoide.

2.5. Evaluación de la función espermática

El espermatozoide es una célula altamente especializada y con una función biológica compleja, influenciada por factores externos *in vitro* (tratamientos seguidos en el laboratorio para su conservación) o *in vivo* (cambios en el medio a lo largo de su paso por el tracto reproductor de la hembra).

La evaluación de espermatozoides proporciona suficientes elementos para la valoración de la capacidad de un reproductor en función de su calidad seminal.³⁶

Las formas de evaluación son realizadas de manera subjetiva, rápida, simple y con un coste moderado.³⁷

2.5.1. Motilidad

La motilidad espermática es un parámetro fundamental para el transporte espermático y la capacidad de penetración del ovocito, aunque no pronostica de

forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide. El método más utilizado para la evaluación de motilidad es la valoración subjetiva que consiste en evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles, así como, el tipo de movimiento que presentan de forma inmediata y económica. En CSA es mejor referirse como motilidad individual y oscilatoria, con movimiento lento que en parte es debido a la viscosidad del semen.¹⁴

La motilidad del semen de alpaca obtenida por vagina artificial es baja, entre los 49.7³⁸ y 57.29 %, ²⁶ aunque se han reportado valores entre los 60-98%;³⁹ sin embargo los porcentajes pueden variar y más aún al evaluar espermatozoides post descongelación, en los que se muestran descensos significativos.

- Motilidad progresiva (MP): espermatozoides moviéndose activamente, sea de manera lineal o en círculos grandes, independientemente de la velocidad.
- Motilidad no progresiva (NP): todos los otros patrones de motilidad con ausencia de progresión, por ejemplo: nadando en pequeños círculos, la fuerza flagelar con apenas desplazamiento de la cabeza o cuando solo un latido flagelar puede ser observado.
- Inmotilidad (IM): sin movimiento.

Donde $MP + MNP =$ Movilidad total. Todo este análisis es realizado bajo observaciones en microscopía óptica.⁴⁰

2.5.2. Vitalidad

La vitalidad espermática refleja el grado de integridad de la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide, parámetro que ha sido previamente asociado con la fertilidad potencial de una muestra de esperma. Este análisis se basa en la determinación de la proporción de espermatozoides vivos y muertos en función de la permeabilidad de membrana, las tinciones permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos, así en lo referente a colorantes la cabeza tiene la propiedad de dejar pasar los colorantes por perturbación de la membrana cefálica mientras que los vivos no.⁴¹

En semen fresco de alpaca, el porcentaje de vitalidad más alto encontrado fue 74.9% mediante el método de la vagina artificial,¹⁵ cabe resaltar que después de la criopreservación se observa un notorio descenso.

2.5.3. Concentración espermática

Es una prueba importante de análisis seminal, existe variabilidad muy grande en la concentración de un eyaculado a otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el

número de hembras a inseminar. La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra de semen, entre estos métodos destaca el uso de cámara de recuento celular como las de Bürker, Neubauer o Thoma.⁴²

Cabe indicar que la concentración espermática en la alpaca varía entre los 30 hasta 150 millones por mililitro y de acuerdo al método utilizado en la colección del semen;²⁶ así mismo se reportó hasta 339,4 millones/ml de espermatozoides,⁴³ sin duda un porcentaje muy elevado.

2.5.4. Prueba de la integridad de membrana plasmática

La evaluación de la integridad funcional de membrana, prueba de estrés hipoosmótico o Hypo Osmotic Swelling Test (HOST) permite evaluar la integridad de la membrana plasmática, valorando su funcionalidad al comprobar la resistencia osmótica del espermatozoide en medios hipo-osmóticos.⁴⁴

La célula espermática posee la capacidad de captar o liberar agua según la osmolaridad del medio extracelular, informando de la óptima funcionalidad de su membrana plasmática y de la capacidad del espermatozoide para la distribución de fluidos dentro y fuera del mismo. Los espermatozoides bioquímicamente activos permitirán la entrada de agua mostrando diferentes grados de turgencia en un esfuerzo por mantener la dinámica del equilibrio entre los fluidos de sus compartimientos interno y el entorno extracelular. Lo cual se evidenciará por el enrollamiento de la cola (endosmosis).⁴⁵

En semen fresco de alpaca, se encontraron respuestas endosmóticas de 55,80%,⁴⁶ 62%⁴⁷ y 53,34%.⁴⁸

2.6. Técnicas de separación espermática

Los espermatozoides de CSA no presentan motilidad progresiva en los eyaculados. Consecuentemente si se espera utilizar técnicas como FIV con semen de macho de alto valor genético, a los cuales no se desea o no hay motivos para castrar, resulta necesario implementar metodologías que permitan utilizar eyaculados frescos o criopreservados. Dentro de estos protocolos están incluidas las técnicas de preparación del semen por centrifugación, ya que se requieren la recuperación de un alto porcentaje de espermatozoides móviles libres de desechos celulares y de espermatozoides muertos.⁴⁹

2.6.1. Swim up

Es una técnica utilizada para seleccionar los espermatozoides más móviles de un eyaculado; para ello, el semen es depositado en el fondo de un tubo de ensayo con el medio adecuado y se incuba por espacio de una hora. Sólo los

espermatozoides con mejor motilidad nadarán hacia arriba, aquellos que se desplazan con movimientos rápidos y rectilíneos de tal manera que al momento de retirar el contenido de la parte superior del tubo se estarán seleccionando los espermatozoides vivos y con motilidad rectilínea progresiva. Esta técnica se basa en el geotropismo negativo de los espermatozoides, por lo tanto tras una centrifugación alcanzarán primero la superficie aquellos que sean más rápidos y por lo tanto con mayor capacidad fecundante.⁵⁰

Desde su inicio, el procedimiento sufrió una serie de variantes a fin de mejorar su eficiencia cualitativa y cuantitativa. Los espermatozoides obtenidos después del tratamiento son altamente móviles (buena calidad), sin embargo, el rendimiento cuantitativo es bajo, lo que puede constituir una desventaja, porque puede requerir del uso de más de una pajuela de semen, por otro lado no proporciona ninguna selección basada en la morfología normal de la cabeza, la integridad de la cromatina (espermatozoides con cromatina intacta), o la viabilidad e integridad acrosomal.⁵¹ El gran inconveniente de esta técnica es que durante la centrifugación precipitan tanto los espermatozoides maduros como los inmaduros y los leucocitos, con el posible efecto de generar EROs.⁵²

2.6.2. Gradiente de Percoll

En este método se seleccionan los espermatozoides en virtud de su velocidad potencial y su relativa alta densidad. El semen, diluido en medio de capacitación, es colocado en la parte superior del Percoll, el cual posee una concentración diferencial de 90 y 45%, procediéndose luego a su centrifugación, obteniendo espermatozoides viables concentrados en el fondo, quedando en las fases del gradiente los espermatozoides muertos o de baja motilidad, el plasma seminal y demás estructuras.

Mediante esta técnica se consiguen mejores parámetros seminales tras el procesado (mayor concentración de espermatozoides y tasa de recuperación de espermatozoides móviles) que mediante la técnica de Swim up, sin embargo los resultados clínicos que se obtienen al realizar inseminaciones artificiales son independientes de la técnica utilizada para preparar las muestras seminales.⁵³

2.7. DNA del espermatozoide

El DNA espermático está extremadamente condensado, es el DNA eucariótico más condensado, hasta 6 veces más que el cromosoma mitótico. Esta condensación extrema sólo es posible gracias a sus componentes estructurales y a su organización específica.⁵⁴

2.7.1. Remodelación de la cromatina

Durante este proceso, las histonas que conforman los nucleosomas en las células somáticas son reemplazadas en primer lugar por proteínas de transición y finalmente por protaminas, necesarias para mantener la capacidad de fertilización, de manera que se elimina la organización del DNA de las células somáticas.⁵⁵

Las protaminas son pequeñas proteínas muy básicas de bajo peso molecular que están asociadas al DNA en los núcleos espermáticos maduros, están involucradas en el empaquetamiento final del DNA espermático y en la condensación apropiada, lo que probablemente estabiliza el DNA y lo hace menos vulnerable frente a cualquier tipo de daño. Algunas especies de mamíferos presentan sólo un tipo de protamina, mientras que en otras especies existen dos tipos: Protamina 1 (PRM1 o P1), que es un polipéptido de unos 50 aminoácidos rico en arginina y cisteína; y protamina 2 (PRM2 o P2), que es un poco más grande, entre 54 y 62 aminoácidos y posee una gran cantidad de residuos de histidina. Se ha descrito la familia de la protamina 1 (P1) en todos los mamíferos y la familia P2 (formada por un compendio de otras protaminas) presente en los primates y roedores. La desestabilización de la proporción P1/P2 está altamente correlacionada con el incremento de la fragmentación del DNA espermático, generando fallos en la fertilización, mala calidad embrionaria y tasas bajas de embarazo.⁵⁶

El proceso de remodelación de la cromatina de histonas por protaminas no está muy claro, parece estar asociada a modificaciones en la estructura de la cromatina como la acetilación y la degradación por ubiquitinización. Se cree que la acetilación facilita la sustitución de las histonas por protaminas y que la ubiquitinización está implicada en la eliminación de las histonas. De hecho, algunos estudios han correlacionado alteraciones en el estado de condensación del DNA de los espermatozoides con altos niveles de fragmentación.⁵⁷

En las etapas finales de la espermiogénesis, cuando las protaminas son transportadas al núcleo una vez sintetizadas, se fosforilan de manera masiva. Esta fosforilación facilita la unión de las protaminas al DNA y va seguida de una defosforilación que parece estar asociada con el aumento de la condensación de la cromatina del espermatozoide. Las protaminas condensan el DNA que lo hacen muy resistente incluso a la ebullición. Aún con este nivel de condensación los espermatozoides son susceptibles de daño.⁵⁸

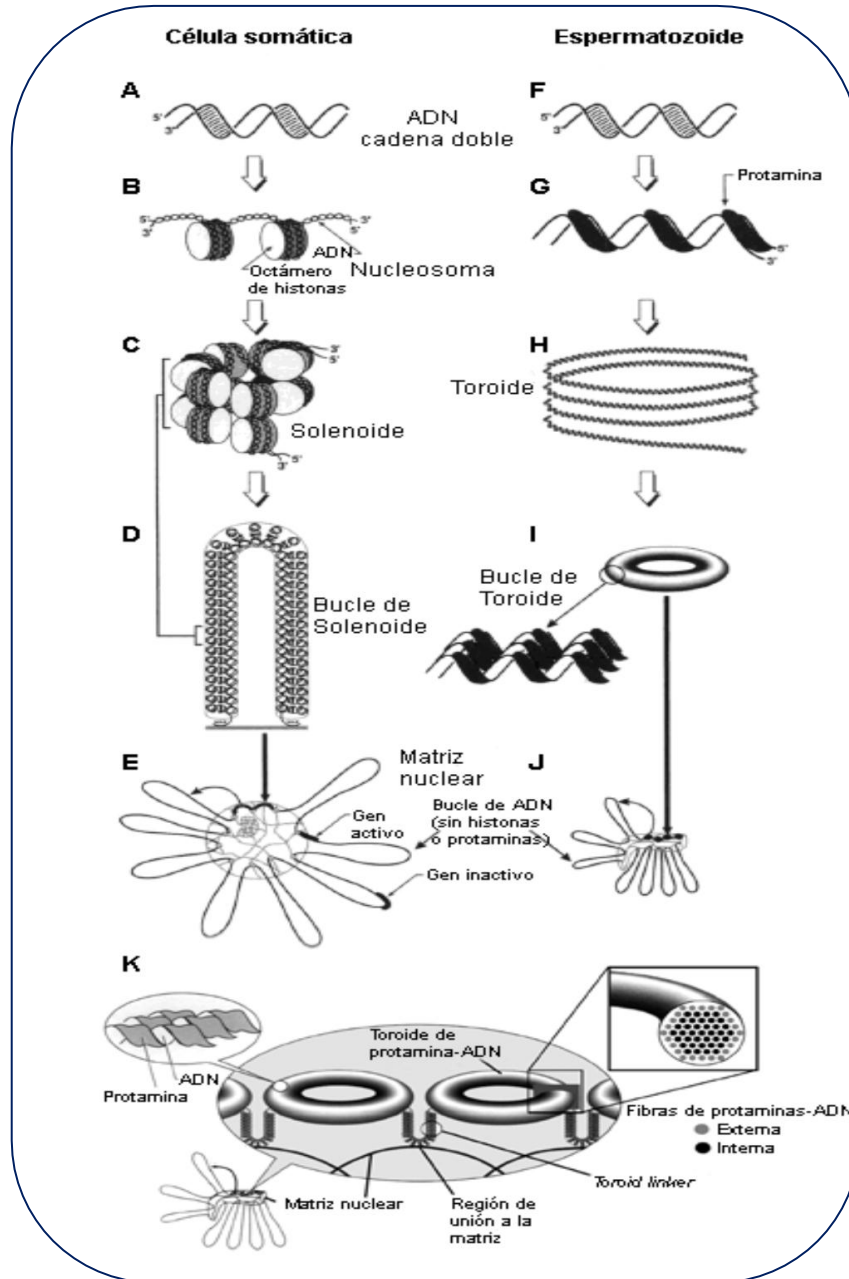


Figura 3. Esquema comparativo entre la estructura de la cromatina de células somáticas y la de espermatozoides.

Fuente: Ward (1991)⁵⁹

El DNA unido a las protaminas se organiza en estructuras toroidales. Cómo se forman los toroides y su organización sigue siendo motivo de investigación, aunque algunos autores mencionan que los toroides se unirían entre ellos mediante una región de cromatina (toroide linker o DNA espaciador), unida a la matriz nuclear espermática. Estas regiones de cromatina de estructura no toroidal son sensibles a DNAsas, esta sensibilidad sería debida a que en estas regiones el DNA a su vez estaría unido a histonas.⁶⁰

2.8. Orígenes de la fragmentación del DNA espermático

El mecanismo exacto por el cual se genera daño en el DNA de las células espermáticas no se conoce, pero se han planteado posibles orígenes las cuales podrían ser causadas de forma natural o inducidas por los procedimientos de preparación espermática realizadas en diversas biotecnologías de reproducción asistida.

2.8.1. Empaquetamiento anormal de la cromatina espermática

Durante la espermiogénesis tiene lugar una reorganización de la cromatina espermática en la que se reemplazan las histonas por protaminas. Se postula que en este proceso es necesaria la actividad de enzimas que corten y ligen el DNA en determinadas etapas liberando el estrés de torsión y facilitando la protaminación y el empaquetamiento de la cromatina. Un fallo en la reparación de estos cortes podría provocar que el espermatozoide llegara al eyaculado con su DNA fragmentado.⁶¹ Cabe indicar que una escasa protaminación se relaciona con una mayor susceptibilidad al daño oxidativo.

2.8.2. Apoptosis defectuosa antes de la eyaculación

En los testículos, las células germinales se expanden clonalmente en varias rondas de mitosis antes de iniciar su diferenciación a espermatozoides maduros. Esta expansión es excesiva y está equilibrada por un mecanismo de apoptosis selectivo, la apoptosis es la muerte celular programada estrictamente regulada utilizada por las células somáticas para el desarrollo adecuado y la eliminación de aquellas dañadas o peligrosas.⁶² El proceso apoptótico daña el DNA y contribuye a una pobre calidad espermática. Durante el proceso de formación de las espermátidas en las paredes de los túbulos seminíferos del testículo se produce la apoptosis continuamente. Las células de Sertoli, presentes también en las paredes de dichos túbulos, fagocitan y limpian los residuos celulares. Sin embargo, las células que se escapan del proceso de apoptosis y tienen su DNA fragmentado, pueden conservar la capacidad de diferenciarse en un espermatozoide maduro funcional, que puede alcanzar el ovocito y conseguir la fertilización. Además, estos espermatozoides generan una serie de metabolitos en el líquido seminal, que podrían acelerar el proceso de degradación del DNA de otros espermatozoides tras la eyaculación.⁶³ Algunos autores mencionan que la fragmentación del DNA espermático no se produciría de manera inmediata, sino que sería inducida de manera secundaria como resultado de la formación de daño oxidativo en el DNA.⁶⁴

2.8.3. Producción excesiva de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)

Los espermatozoides por sí mismos pueden producir EROs pero deben ser continuamente inactivadas, de modo que sólo una cantidad mínima esté presente para mantener las funciones normales de la célula. Los bajos niveles de EROs son necesarios para la capacitación espermática y la reacción acrosómica; mientras que una acumulación excesiva del metabolito puede modificar las funciones celulares y/o poner en peligro la supervivencia celular.²

El término "estrés oxidativo" se refiere a un desequilibrio en la producción o acumulación excesiva de EROs al disminuir la capacidad antioxidante del plasma seminal. Las EROs son radicales libres que causan daño oxidativo, son moléculas altamente reactivas que presentan un tiempo de vida corto, en su estructura presenta un electrón no apareado girando en sus orbitas externas, situación sumamente inestable por lo cual oxidan a cualquier molécula vecina y establecer un vínculo con otro electrón para convertirse en estable, alterando su estructura y convirtiéndola en otro radical libre. Estas especies químicas se producen como consecuencia del metabolismo celular del oxígeno durante procesos fisiológicos o en respuesta a factores exógenos. Las EROs más importantes son el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^\cdot), radical peróxido (ROO^\cdot) y también peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es el producto final de la reactividad de las EROs y es considerado como el más tóxico de los oxidantes.⁶⁵

Los espermatozoides son muy vulnerables al ataque oxidativo debido a la gran cantidad de Ácidos Grasos Poliinsaturados (AGP) en la membrana plasmática.²¹ Durante la criopreservación disminuye dramáticamente los AGP debido a la peroxidación lipídica, esto se inicia cuando el espermatozoide es atacado por las EROs. En mamíferos, la mayor fuente de formación de estas EROs incluyen la contaminación por los leucocitos, espermatozoides muertos o anormales y el exceso de residuos citoplasmáticos que causan efectos nocivos en las membranas espermáticas, disminución de la movilidad, pérdida de viabilidad y alteraciones directamente sobre la membrana plasmática resultando en daño del DNA, alteraciones en el citoesqueleto e inhibición de la unión espermatozoide-ovocito, finalmente, caída del potencial de fertilidad.⁵²

La centrifugación es uno de los procesos que afecta la viabilidad de los espermatozoides, generando alteraciones de diversa índole sobre éstos.⁶⁶ Un aumento en el tiempo de centrifugación o en la fuerza gravitacional, de manera dependiente de la dosis, pueden generar un aumento significativo en la

fragmentación del DNA y una pérdida severa de la motilidad, su calidad en general, debido a las fuerzas mecánicas asociadas, es por ello que diferentes sistemas de lavado de espermatozoides han sido desarrollados para reducir el efecto perjudicial de la centrifugación. Existen evidencias que demuestran que la sedimentación de una población de espermatozoides después de la centrifugación pueden aumentar aún más la producción basal de EROs en el sedimento, lo que provocaría un daño irreversible en los espermatozoides perjudicando así su capacidad de fecundación.¹ Por otro lado, la incubación de semen a temperatura ambiente o a 37°C también puede causar daño. Por lo tanto, el procesamiento de los espermatozoides en tecnologías de reproducción asistida debe regirse por el principio *primum non nocere*; es decir, debe evitarse la incubación innecesaria de semen y suspensiones de espermatozoides y utilizarse métodos de criopreservación que minimicen la fragmentación de DNA espermático.⁶⁷

2.9. Técnicas para evaluar el daño en el DNA espermático

Las pérdidas gestacionales tempranas, particularmente en los casos de muerte embrionaria, han sido poco estudiadas. Los recientes hallazgos en biología de la reproducción han mejorado tanto la comprensión fisiológica del espermatozoide como los mecanismos para llevar a cabo la fertilización y estos están basados sobre la integridad del genoma, es decir la integridad del DNA espermático que es crucial para la salud de las nuevas generaciones. La integridad del DNA espermático puede estar relacionada con el desarrollo embrionario temprano más que con la capacidad fecundante de un espermatozoide.⁶⁸ El estudio de este parámetro se puede realizar mediante el empleo de diferentes técnicas que permitan detectar la presencia de lesiones en el DNA.

En las últimas dos décadas, se han desarrollado técnicas de evaluación seminal, basadas en métodos fluorescentes, que permiten una valoración más precisa de la integridad de diversos compartimentos y estructuras celulares como las mitocondrias, el DNA nuclear, la membrana plasmática y acrosomal; así como han permitido evaluar diferentes aspectos de la capacidad funcional de las células espermáticas. Estas técnicas permiten reconocer de manera más precisa, las alteraciones celulares ocasionadas por procedimientos como la centrifugación, haciendo más factible, realizar los ajustes necesarios en los procesos de separación espermática, aunque su aplicación en el marco de la producción animal es más reducida.⁶⁷

La mayoría de las técnicas disponibles para detectar la fragmentación son laboriosas, requieren instrumentación cara o el uso de enzimas cuya actividad y accesibilidad a las roturas pueden verse con dificultad por la extrema condensación de la cromatina del espermatozoide. De manera que estos procedimientos son más adecuados para el campo de la investigación que para la utilización rutinaria en laboratorio.⁶⁹

Los métodos directos determinan el “daño real” del DNA e incluyen la técnica Túnel y Ensayo Cometa; mientras que los indirectos determinan “daño potencial” del DNA y comprenden: Prueba de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD), Ensayo de la Estructura de la Cromatina Espermática (SCSA), Ensayo de Naranja de Acridina (AO). Aunque inicialmente se utilizaron pruebas para evaluar el grado de condensación o compactación de la cromatina espermática mediante colorantes como el Azul de Toluidina (AT) y Cromomicina A3 (CMA).

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling): esta técnica es capaz de detectar roturas de la cadena simple y doble del DNA producido por sustancias inorgánicas, orgánicas y otros factores.⁷⁰

Ensayo Cometa: es una técnica rápida, simple, visual y sensible en células espermáticas,²¹ detecta niveles muy bajos de daño en el DNA; sin embargo no diferencia roturas de cadena simple, es habitual para la evaluación de diversos agentes (físicos o a la exposición de xenobióticos).⁷¹

Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD): esta técnica nos permite diferenciar entre los espermatozoides cuya cromatina esta condensada e intacta de los que tienen su DNA fragmentado, se basa en el principio que el DNA fragmentado no produce el halo característico de sus formas helicoidales, mientras que espermatozoides con DNA fragmentado muestran grandes halos alrededor del su nucleo.⁷²

2.9.1. Evaluación del DNA espermático mediante la Prueba del Azul de Toluidina (AT)

Esta prueba evalúa el grado de condensación de la cromatina espermática, permite detectar el daño potencial y susceptibilidad a la desnaturalización. Se utiliza típicamente para estudios espermáticos, ya que durante la maduración de los espermatozoides el DNA se condensa más de lo normal gracias a las protaminas; sin embargo los espermatozoides con cromatina inmadura tendrían habitualmente más roturas del DNA.⁷³

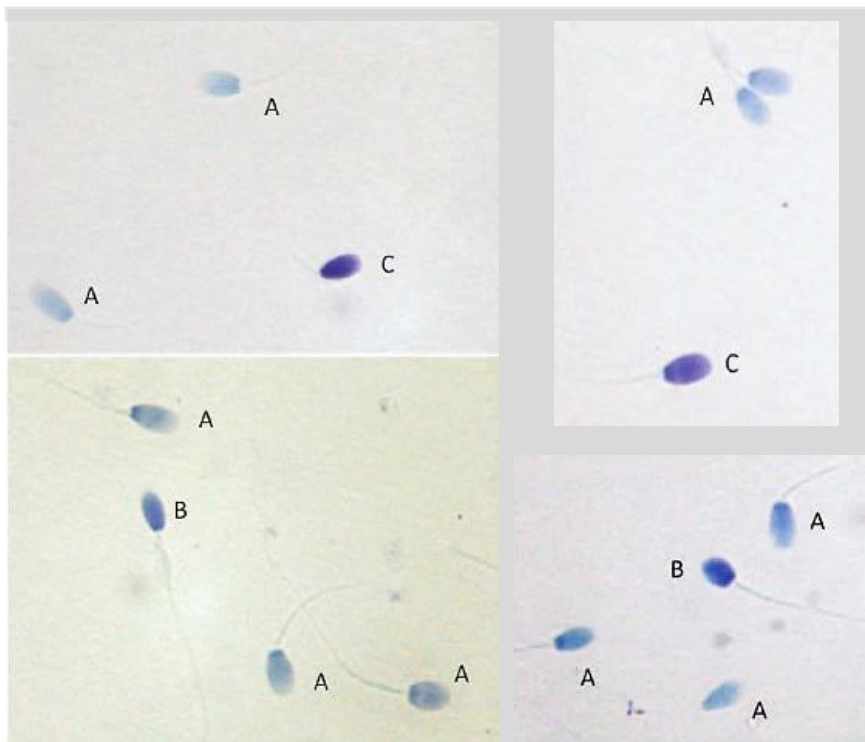


Figura 4. Patrones de espermatozoides de llama teñidos con Azul de Toluidina: A) negativos: color azul, sin alteración en la condensación normal de la cromatina, B) intermedios: color violeta claro, algún grado de descondensación C) positivos: color violeta oscuro, alto grado de descondensación. (1000X).

Fuente: Carretero (2009)⁶

Es un colorante catiónico cuya unión al DNA da lugar al color metacromático violeta oscuro que corresponden a agregados de AT interactuando iónicamente con los grupos fosfatos del DNA. La coloración violeta claro se debe a la participación de un número mucho más reducido de moléculas de AT que se unen como monómeros al DNA, mediante intercalación o por unión iónica. Mientras que la neutralización completa de los grupos fosfato por las argininas de las protaminas y la ocurrencia de entrecruzamientos entre protaminas, son los principales factores responsables de la reducida afinidad de la cromatina espermática por los colorantes catiónicos tornándose azul pálido.⁷⁴

La tinción con azul de toluidina también es útil para evaluar los efectos que las biotecnologías reproductivas tienen sobre el grado de condensación-descondensación de la cromatina del DNA espermático, al detectar la ausencia o ruptura de puentes disulfuro. La reducción de los grupos disulfuro mediante agentes reductores, permite que las proteínas se relajen y que los grupos fosfato del DNA queden disponibles y accesibles a la unión de los colorantes.⁷⁵

Esta técnica tiene como ventaja su bajo costo y fácil elaboración pero como principal desventaja, la baja reproducibilidad y difícil valoración de las coloraciones intermedias. El colorante AT, ha sido utilizado para detectar y evaluar la condensación de la cromatina en especies de producción tradicional, como el caballo (*Equus caballus*), la vaca (*Bos taurus*), y en especies de producción no tradicional, como la llama (*Lama glama*),⁶ guanaco y la alpaca (*Vicugna pacos*).⁵

2.9.2. Impacto del daño en el DNA espermático

Una fracción elevada de espermatozoides con defectos en la cromatina puede tener un impacto negativo en los resultados de las técnicas de reproducción asistida. Los estudios de FIV han demostrado que el desarrollo embrionario se afecta cuando existe daño en el DNA, aun así los espermatozoides con este daño son capaces de fertilizar, y producir embriones; sin embargo, se ha propuesto, que dichos embriones podrían no llegar a término o podrían conducir a la expresión de enfermedades tardías en la descendencia.³ La variabilidad del efecto de fragmentación del DNA espermático puede relacionarse con la calidad y capacidad del sistema de reparación del DNA dentro del ovocito. Sin embargo, cuando el daño proviene de la cadena doble de DNA, es mucho más difícil su reparación. Como consecuencia, uno de los principales efectos negativos en el desarrollo embrionario se asocia con abortos.⁷⁶

Experimentos realizados por FIV utilizando espermatozoides de toro con daño severo en su DNA demostraron que el espermatozoide permanecía intacto funcionalmente a nivel de membrana, de organelas y de movilidad, presentaban normalidad en la unión a la zona pelúcida del ovocito durante la fecundación y las tasas de ovocitos fertilizados, permanecieron normales. Sin embargo, los embriones obtenidos murieron por apoptosis durante la etapa de 4 a 8 células, posiblemente debido a una expresión defectuosa del genoma.⁷⁷

En los últimos años la importancia de incluir la evaluación del DNA espermático dentro de las características seminales de rutina se ha incrementado debido a reportes que correlacionan el grado de daño del DNA con varios índices de fertilidad como: tasas de fertilización, clivaje embrionario, implantación, preñez y nacidos vivos.⁷⁸

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray de la provincia de Huamanga, región Ayacucho, a 2735 msnm y geográficamente: Latitud sur 13° 10' 09" y una Longitud oeste de 74° 11' 53", con una temperatura promedio de 12-18 °C, precipitación pluvial promedio de 500 mm y humedad relativa de 40-50%.⁷⁹

3.2. Material biológico

Se utilizaron un total de 15 pajillas congeladas de 0.25 ml conteniendo semen en dilutor comercial AndroMed® (proporción 1:1), proveniente del plantel de machos reproductores de alpacas de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA-Ayacucho, mayores de dos años de edad colectados mediante método de la vagina artificial.

3.2.1. Obtención de muestras

Para la criopreservación de los espermatozoides, las motilidades espermáticas fueron superiores al 50%. Así mismo, las motilidades espermáticas post descongelación consideradas aptas para el trabajo tuvieron que ser superiores al 10%.

Para la descongelación, las pajillas de semen fueron retiradas de las canastillas del tanque criogénico y fueron sumergidas en un baño térmico a 37°C por un tiempo de 15 s, secadas con papel toalla para luego recuperar todo el contenido en un tubo eppendorf e inmediatamente fueron llevadas para la evaluación de los parámetros espermáticos de motilidad progresiva, vitalidad, concentración, integridad de membrana plasmática e integridad del DNA espermático.

Las evaluaciones se realizaron después de la descongelación y luego del proceso de separación espermática, tanto por la técnica de Swim up como Gradiente de Percoll.

Como control positivo se utilizó semen fresco de alpaca. En un eppendorf se colocaron 50 µl de semen fresco y se congelaron a -4°C, durante 90 min. Transcurrido el tiempo, en una lámina portaobjetos se realizó el frotis para luego realizar la coloración con Azul de Toluidina.

3.3. Técnicas de separación espermática

3.3.1. Swim up

En un tubo eppendorf se colocaron 100 µl del medio TALP-Sperm (previamente atemperado a 37°C), se agregaron 100 µl de muestra espermática descongelada, inmediatamente fue centrifugado a 150,93 g por 5 min a temperatura de laboratorio. El pellet formado se resuspendió en 20 µl de medio TALP-FIV, este nuevo volumen fue cuidadosamente inoculado al fondo de otro tubo eppendorf, el cual contenía 100 µl del medio de capacitación (previamente atemperado a 37°C); se dejó en incubación a 45° de inclinación y abierto durante 60 min en una incubadora de CO₂ a 38,5°C. Para la evaluación se tomaron espermatozoides que sobrenadaron a la superficie del medio de suspensión.

3.3.2. Gradiente de Percoll

En un tubo eppendorf se depositaron: primero 100 µl de Percoll al 22.5%, luego 100 µl de Percoll al 45% y finalmente 100 µl de muestra espermática descongelada. Fue centrifugado a 150,93 g por 10 min a temperatura de laboratorio, el pellet formado fue resuspendido en 100 µl del medio TALP-FIV y centrifugado por segunda vez a 150,93 g por 5 min. Finalmente el pellet obtenido después del segundo lavado se resuspendió en 50 µl del medio TALP-FIV y fue llevado a su evaluación.

3.4. Evaluación de la calidad espermática

3.4.1. Motilidad

Sobre una lámina portaobjetos atemperado a 37°C se colocaron 10 µl de la muestra espermática y sobre ella una lámina cubreobjetos, fue observada en un microscopio óptico a 40X. Los resultados fueron expresados en porcentajes, contando por lo menos 200 espermatozoides bajo los siguientes criterios:

MP : Movilidad progresiva

MNP : Movilidad no progresiva

IN : Inmovilidad

Donde MP + MNP = Movilidad total.⁴⁰

3.4.2. Vitalidad

En una lámina portaobjeto atemperada a 37°C, se colocaron 10 µl de muestra espermática, luego se añadieron 10 µl de colorante Eosina - Nigrosina (previamente preparado: Eosina 2% y Nigrosina 4%). Se realizó el frotis de la mezcla del semen coloreado y se dejó secar a temperatura ambiente, luego fue llevada al microscopio para su observación a 100X con aceite de inmersión. Contabilizando como mínimo 200 células espermáticas, la frecuencia de vivos (espermatozoides no coloreados) y muertos (espermatozoides rojos), los cuales se expresaron en porcentaje.

3.4.3. Concentración

La muestra espermática descongela fue diluida con agua destilada en proporción 1:10 (10 µl de muestra y 90 µl de agua), las muestras después de la separación espermática fueron diluidas con agua destilada en proporción 1:5 (10 µl de muestra y 40 µl de agua). Se colocaron 10 µl de la dilución en el centro de la Cámara de Neubauer, el cual estuvo provisto con una laminilla cubreobjetos, dejándolo reposar por 5 min y finalmente se contabilizaron los 5 cuadrados centrales en ambos lados. El recuento espermático se realizó en un microscopio óptico a 10X según la fórmula:⁴²

$$C = \frac{N}{\text{superf. cont.} \times \text{profundidad cámara} \times D}$$

Dónde:

C: Concentración espermática (en millones por ml).

N: Promedio de espermatozoides contados de 5 campos pequeños en ambos lados de la cámara.

Superficie contada: 5 cuadrados medianos corresponden a 0,2 mm²

Profundidad cámara: 0,1 mm

D: Grado de dilución.

3.4.4. Prueba de la integridad de membrana plasmática

La evaluación de la integridad de membrana espermática se realizó por la técnica de Hypo Osmotic Swelling Test (HOST)⁸⁰ adaptada.

En un eppendorf se colocaron 90 µl de medio hipoosmótico y fue llevado a 37°C, al cual se le agregaron 10 µl de muestra espermática, siendo luego incubado durante 40 min.

Transcurrido el tiempo, se tomaron 10 µl de la mezcla y fue colocado sobre una lámina porta objetos con su respectiva lámina cubreobjetos, observada a un aumento de 40X en un microscopio óptico y contando como mínimo 200

espermatozoides. Se determinaron como espermatozoides con reacción positiva a todos aquellos que tenían la cola enrollada, es decir aquellos con membrana plasmática intacta y los espermatozoides con la cola recta correspondían aquellos con la membrana plasmática alterada.

3.4.5. Integridad del DNA espermático

La evaluación del grado de descondensación de la cromatina espermática, se realizó mediante la coloración del Azul de Toluidina⁸¹ (AT) adaptada.

En portaobjetos limpios, se realizaron extendidos con las muestras espermáticas, luego se fijaron con etanol de 96% durante 2 min a temperatura ambiente. Los frotices fueron teñidos durante 5 min con una solución de trabajo de AT, se lavaron con agua destilada y fueron secados al aire protegidos de la luz.

La solución de trabajo fue preparada a partir de una solución stock (0,4 g de AT en 200 ml de agua destilada) que fue diluida en una proporción de 1:9 (1 parte de la solución stock en 9 partes de buffer pH 4). Los espermatozoides se evaluaron en microscopio óptico a 100X con aceite de inmersión, contando un mínimo de 200 espermatozoides y se clasificaron de acuerdo a la coloración de la cromatina espermática.⁵

Tabla 1. Patrones de coloración de los estados de condensación de la cromatina espermática mediante la coloración Azul de Toluidina (AT).

Color	Reacción AT	Estado de la cromatina espermática
Azul	Negativo	Sin alteración de la condensación
Violeta claro	Intermedio	Algún grado de descondensación
Violeta oscuro	Positivo	Alto grado de descondensación

3.5. Procedimiento experimental

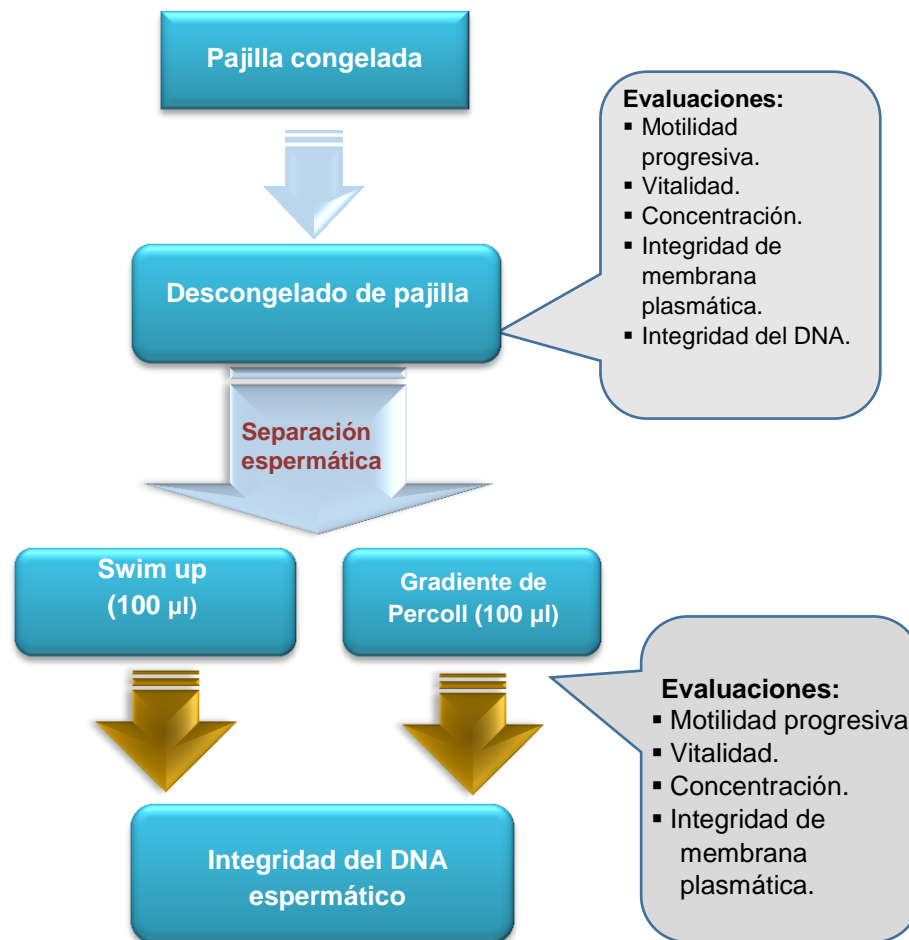


Figura 5. Diseño experimental de la aplicación de las técnicas de separación espermática Swim up y Gradiente de Percoll, para la evaluación de la integridad del DNA espermático de alpaca.

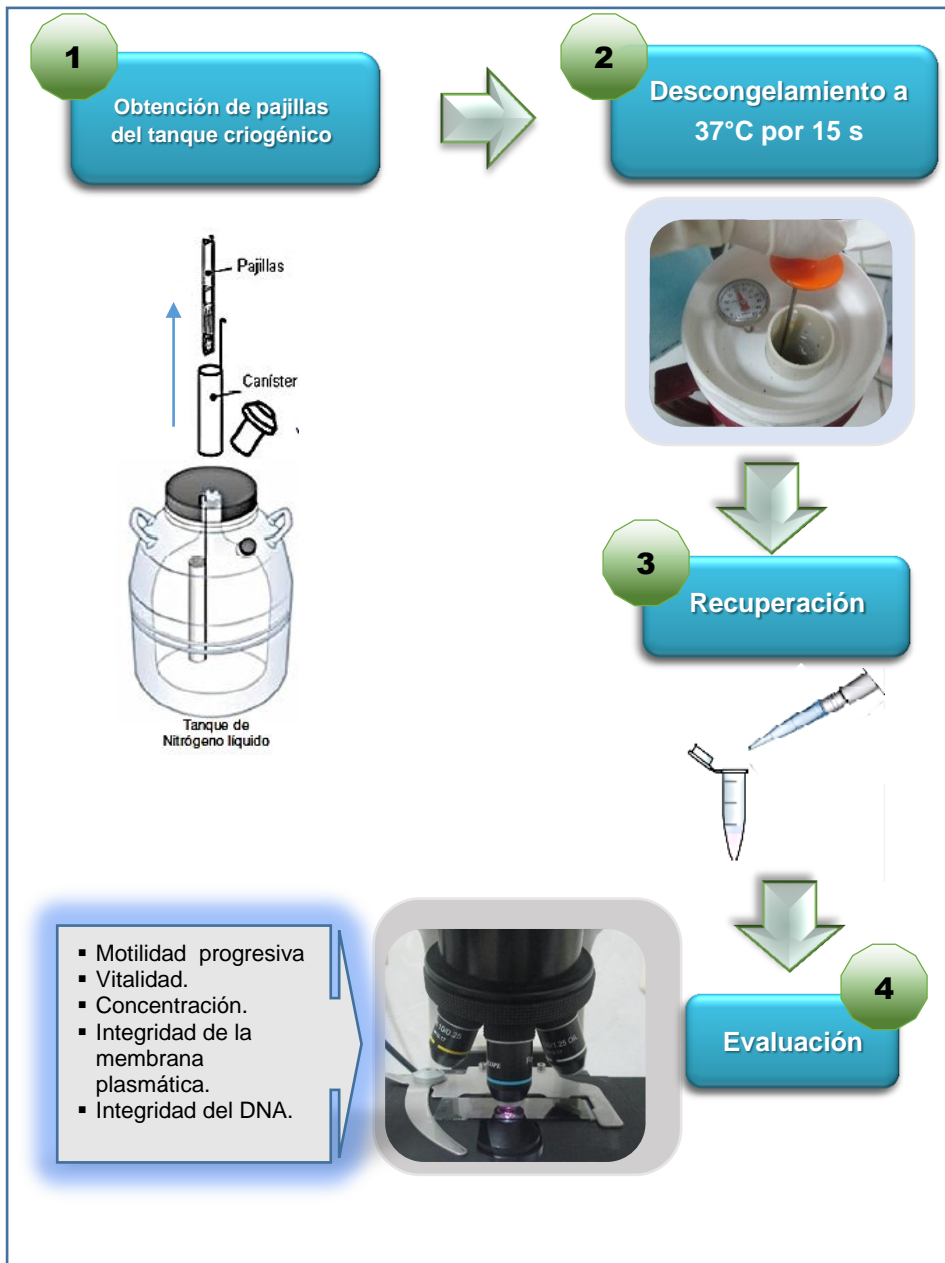


Figura 6. Proceso del descongelamiento de pajillas del semen de “alpaca” para la evaluación de parámetros espermáticos. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

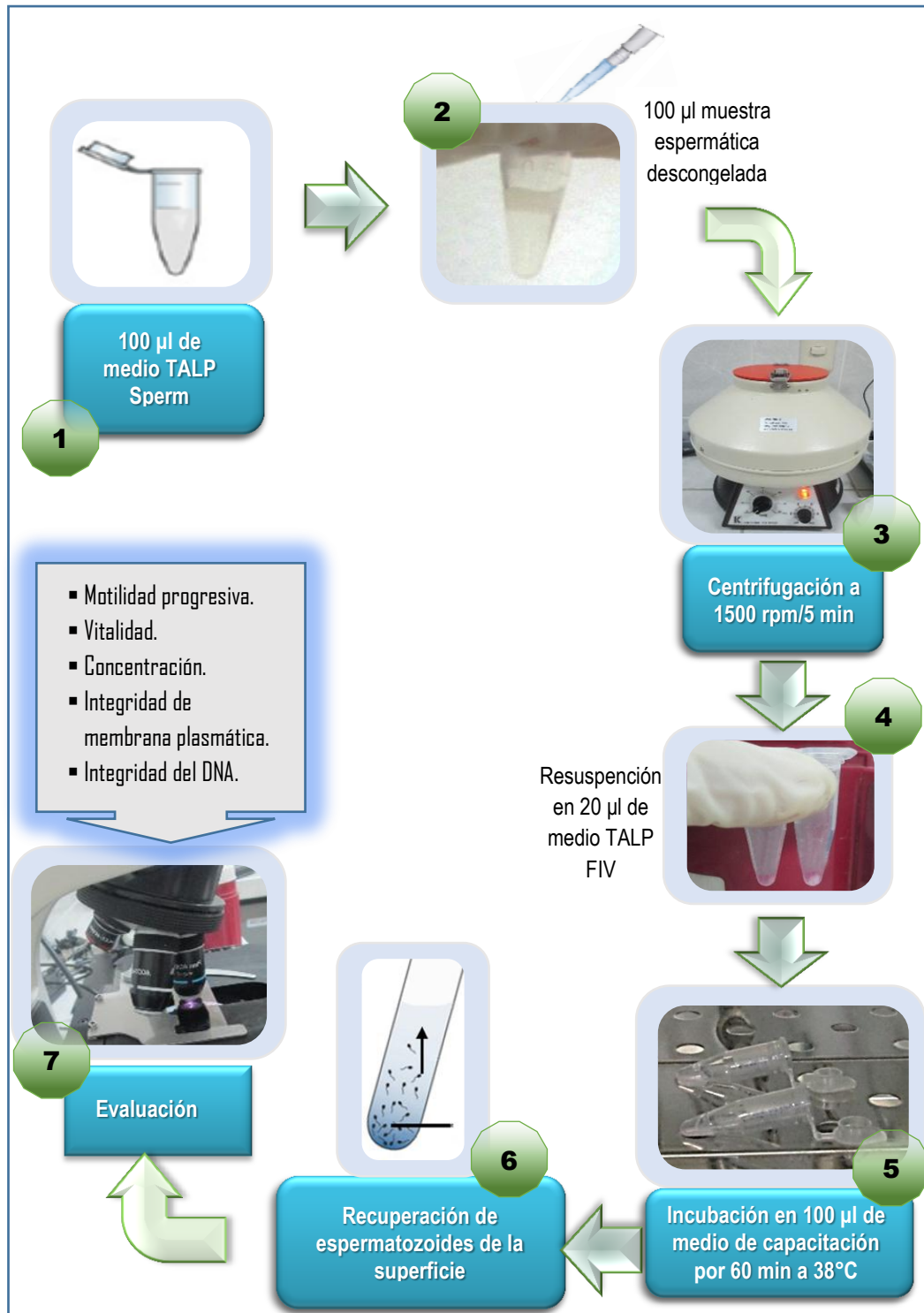


Figura 7. Proceso de separación de espermatozoides por la técnica de Swim up para la evaluación de los parámetros espermáticos. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

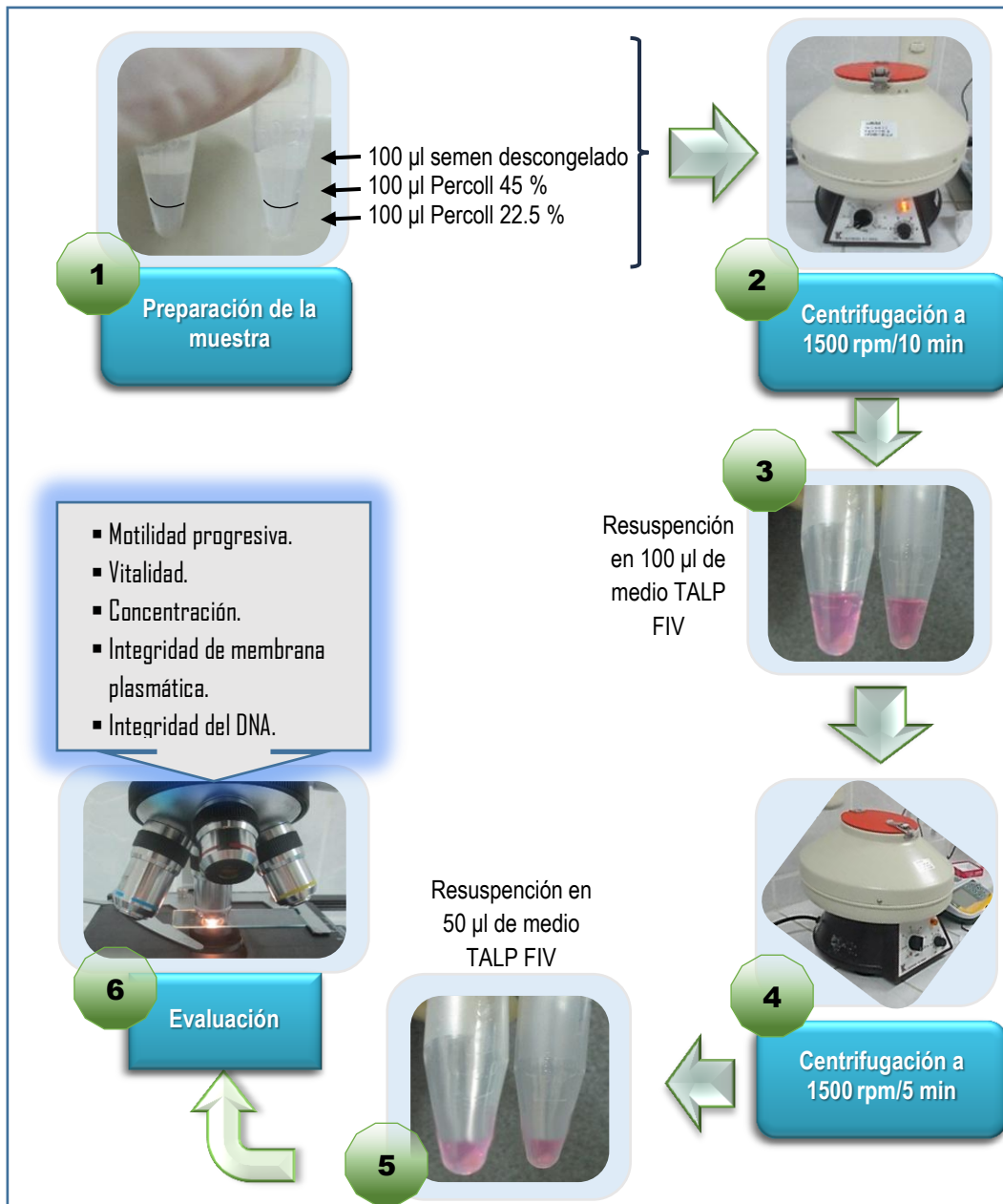


Figura 8. Proceso de separación de espermatozoides mediante la técnica Gradiente de Percoll para la evaluación de los parámetros espermáticos. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

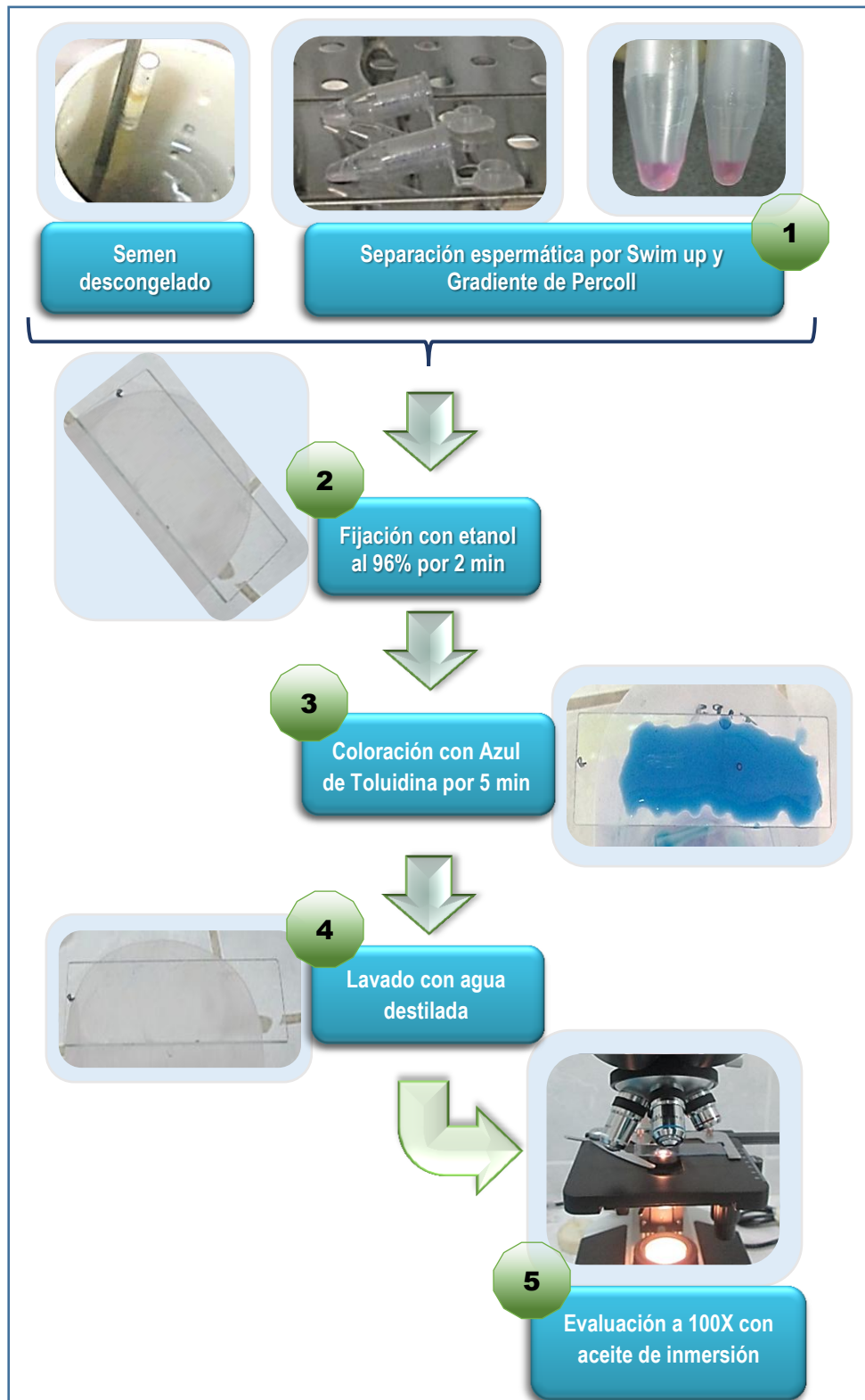


Figura 9. Proceso de evaluación de la integridad del DNA espermático mediante la técnica del Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

3.6. Análisis estadístico

El tipo de investigación fue básica-experimental; se realizaron 15 repeticiones por cada tratamiento y fueron expresadas como la Media \pm DE (Desviación Estándar) los datos de motilidad progresiva, vitalidad, concentración, integridad de membrana plasmática e integridad del DNA espermático.

Se realizó la prueba de normalidad para ver si los datos cumplían los criterios de distribución normal y homogeneidad mediante Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. Luego de contrastar que dichas variables tenían distribución normal, se pasó a comparar las medias mediante un análisis de varianza (ANOVA) para un diseño completamente aleatorio con variable independiente (factor) y los tratamientos (control, Swim up y Gradiente de Percoll). Por último se utilizó la prueba no paramétrica de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Para los datos que no cumplían con los criterios de normalidad, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis.

El análisis de datos se realizó utilizando el programa estadístico R 3.4.3.

IV. RESULTADOS

Tabla 2. Motilidad progresiva de los espermatozoides de “alpaca” (Media \pm DS) según las técnicas de separación espermática. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

Técnica de separación espermática	N	Media \pm DS (%)	Mínimo	Máximo
Control*	15	17,20 \pm 2,11 ^a	17,00	21,00
Gradiente de Percoll	15	15,60 \pm 2,75 ^a	16,00	20,00
Swim up	15	13,13 \pm 1,69 ^b	13,00	16,00

^{a,b} letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

*Semen descongelado

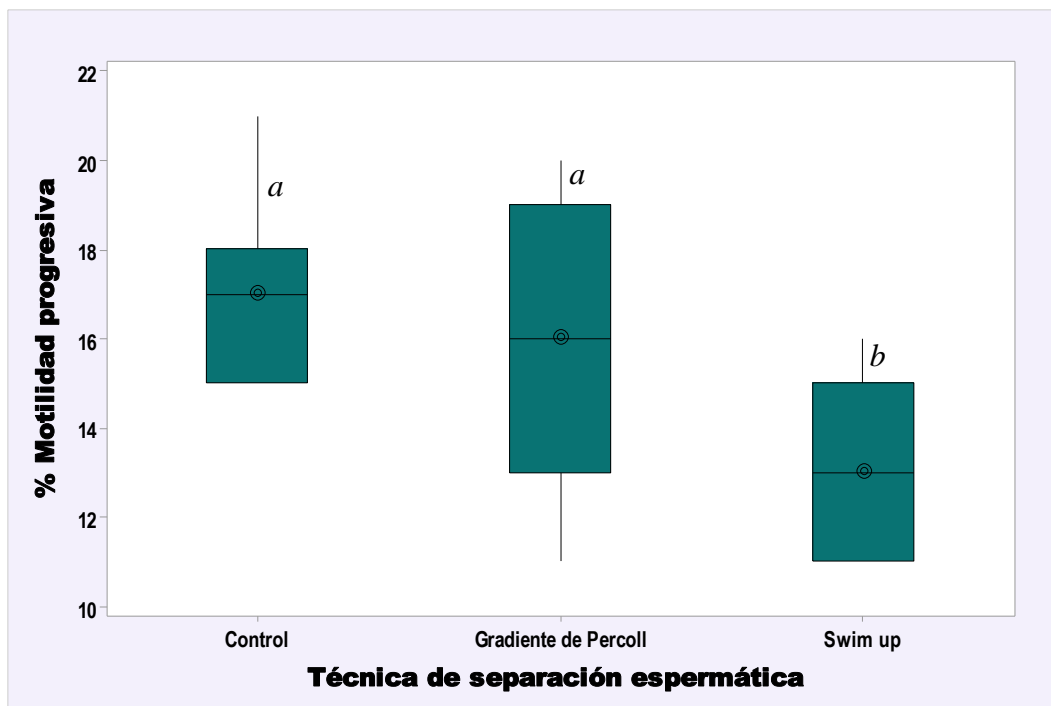


Figura 10. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides de “alpaca”. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Tabla 3. Vitalidad de los espermatozoides de “alpaca” (Media \pm DS) según las técnicas de separación espermática. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

Técnica de separación espermática	N	Media \pm DS (%)	Mínimo	Máximo
Control*	15	51,74 \pm 16,77 ^a	23,59	87,99
Gradiente de Percoll	15	53,45 \pm 6,29 ^a	44,95	68,96
Swim up	15	54,19 \pm 12,57 ^a	36,12	85,93

^{a,b} letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

*Semen descongelado.

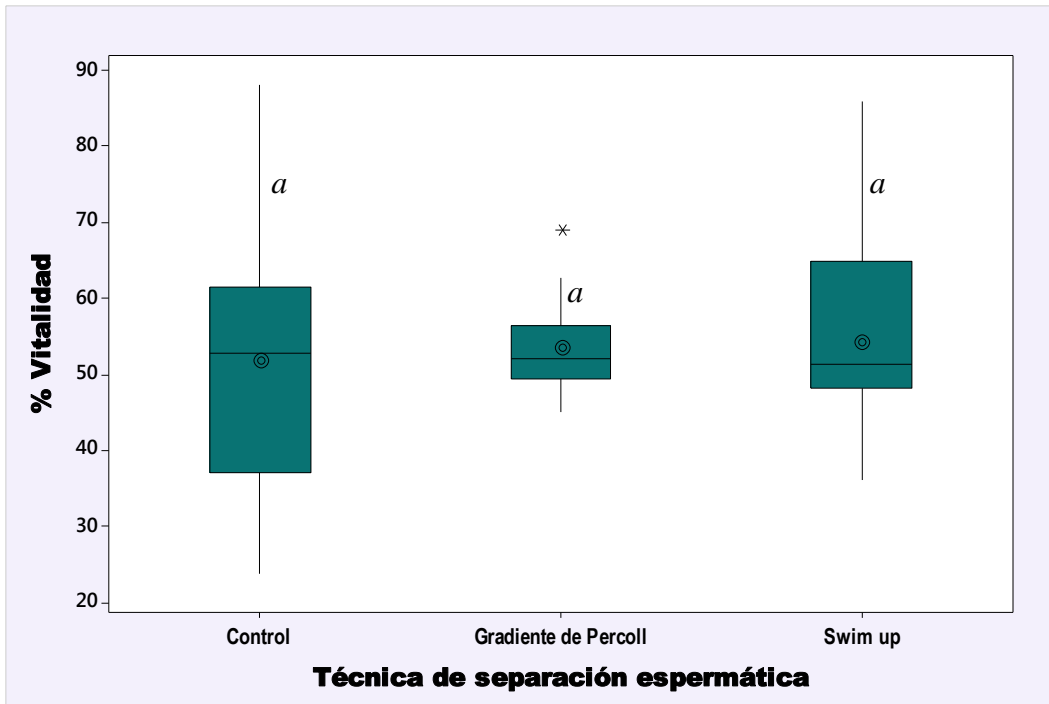


Figura 11. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la vitalidad de los espermatozoides de “alpaca”. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017). Letras diferentes en la parte superior de las barras indican que hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Tabla 4. Concentración de espermatozoides de “alpaca” (Media \pm DS) según las técnicas de separación espermática. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

Técnica de separación espermática	N	Media \pm DS (millones/ml)	Mínimo	Máximo
Control*	15	103,40 \pm 51,60 ^a	58,50	248,30
Gradiente de Percoll	15	80,51 \pm 34,53 ^a	33,00	152,13
Swim up	15	36,67 \pm 17,33 ^b	16,25	74,00

^{a,b} letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

*Semen descongelado.

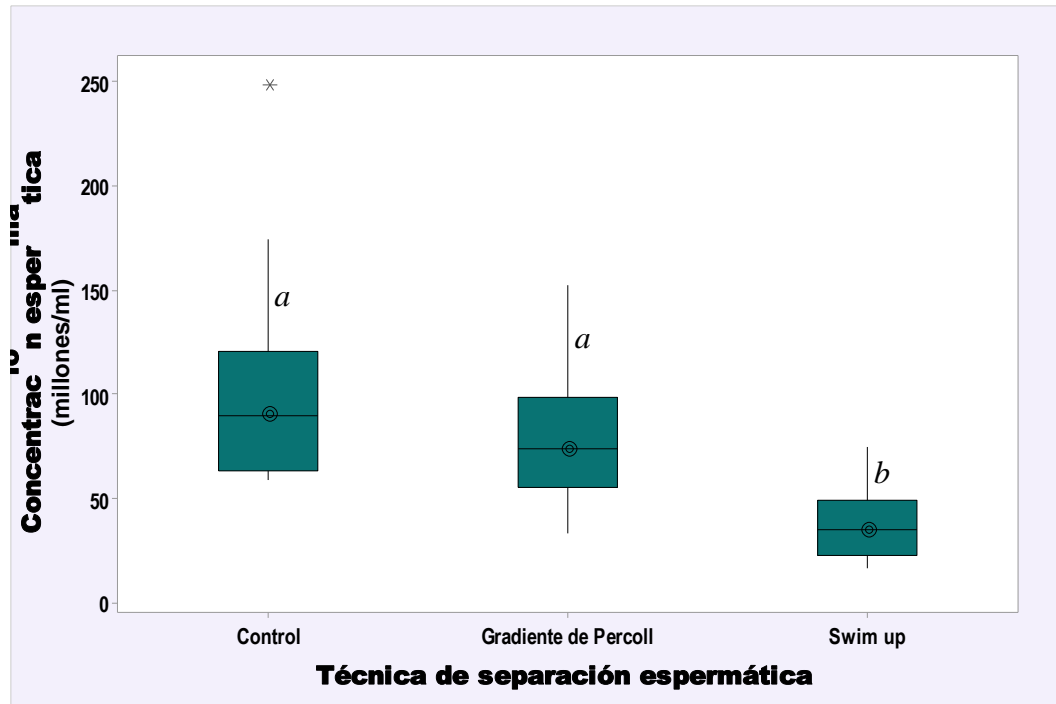


Figura 12. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la concentración de los espermatozoides de “alpaca”. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

Tabla 5. Prueba de integridad de membrana plasmática en espermatozoides de “alpaca” (Media \pm DS) según las técnicas de separación espermática. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

Técnica de separación espermática	N	Media \pm DS (%)	Mínimo	Máximo
Control*	15	55,69 \pm 12,13 ^a	34,37	75,81
Gradiente de Percoll	15	57,18 \pm 11,50 ^a	40,00	79,77
Swim up	15	56,30 \pm 13,58 ^a	37,26	78,76

^{a,b} letras diferentes en la misma columna indican que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

*Semen descongelado.

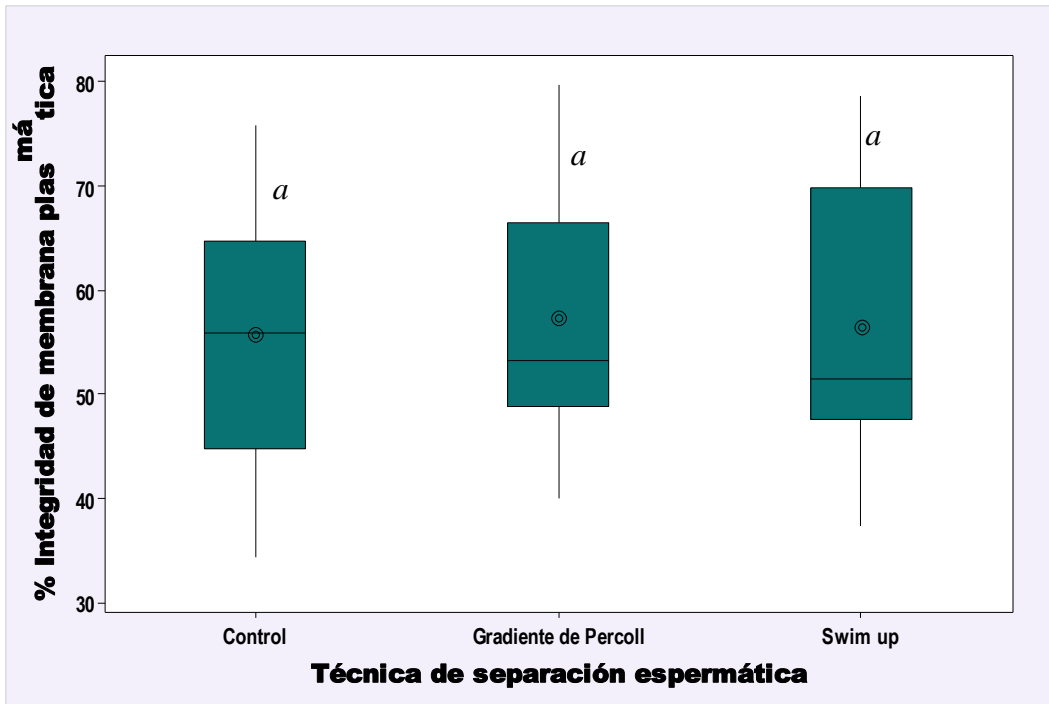


Figura 13. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad de membrana plasmática de los espermatozoides de “alpaca”. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017). Letras diferentes en la parte superior de las barras indican que hay diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

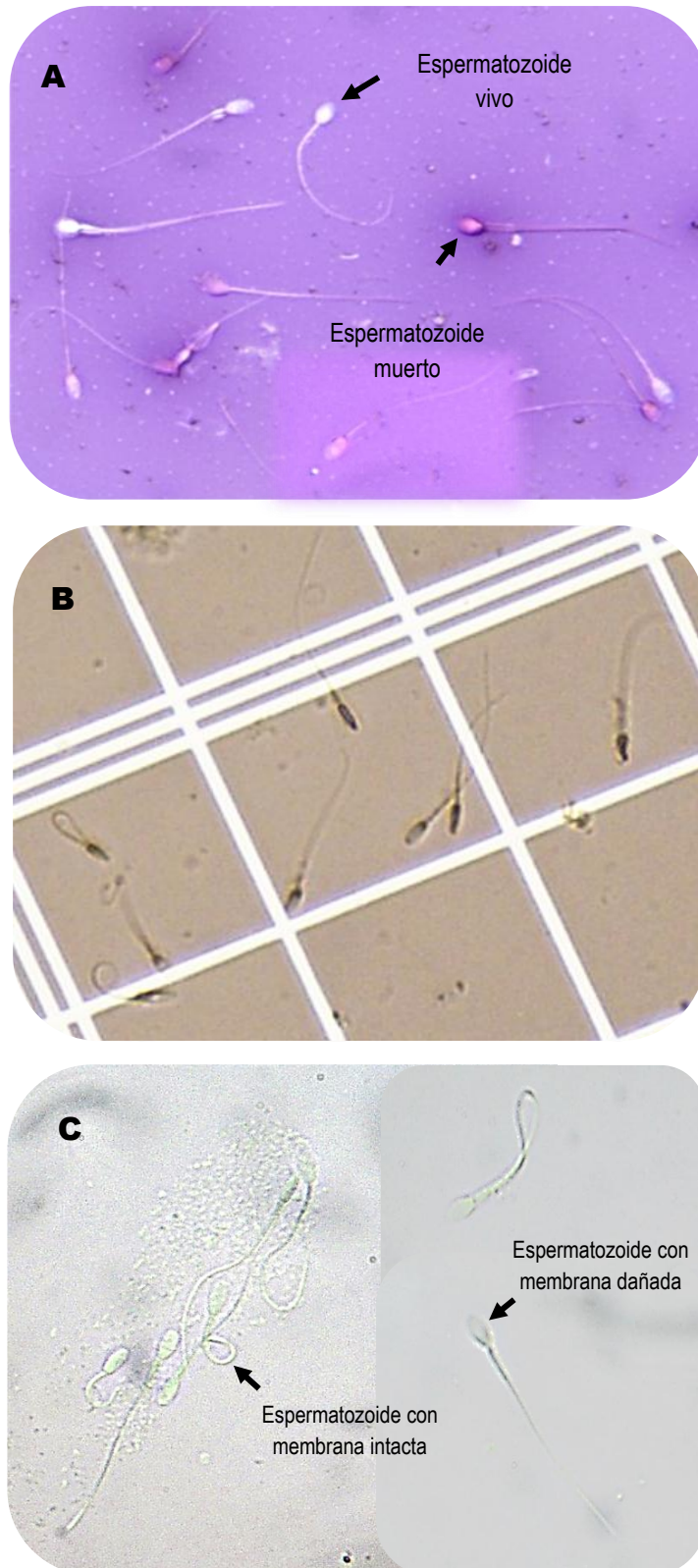


Figura 14: (A) Vitalidad, (B) concentración e (C) integridad de membrana plasmática de espermatozoides de alpaca, 40X. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

Tabla 6. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca” (Media \pm DS) según la técnica del Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

Estado de la cromatina espermática	Técnica de separación espermática (Media \pm DS)			
	N	Control*	Swim up	Gradiente de Percoll
Sin alteración	15	93,05 \pm 0,88 ^c	97,83 \pm 2,02 ^a	95,28 \pm 2,44 ^b
Algún grado de descondensación	15	4,70 \pm 0,70 ^a	2,07 \pm 1,89 ^b	3,62 \pm 1,71 ^a
Alto grado de descondensación	15	2,25 \pm 0,29 ^a	0,10 \pm 0,24 ^c	1,10 \pm 0,96 ^b

^{a,b,c} letras diferentes en la misma fila indican que hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

*Semen descongelado.

Sin alteración = color azul

Algún grado de descondensación = color violeta claro

Alto grado de descondensación = violeta oscuro

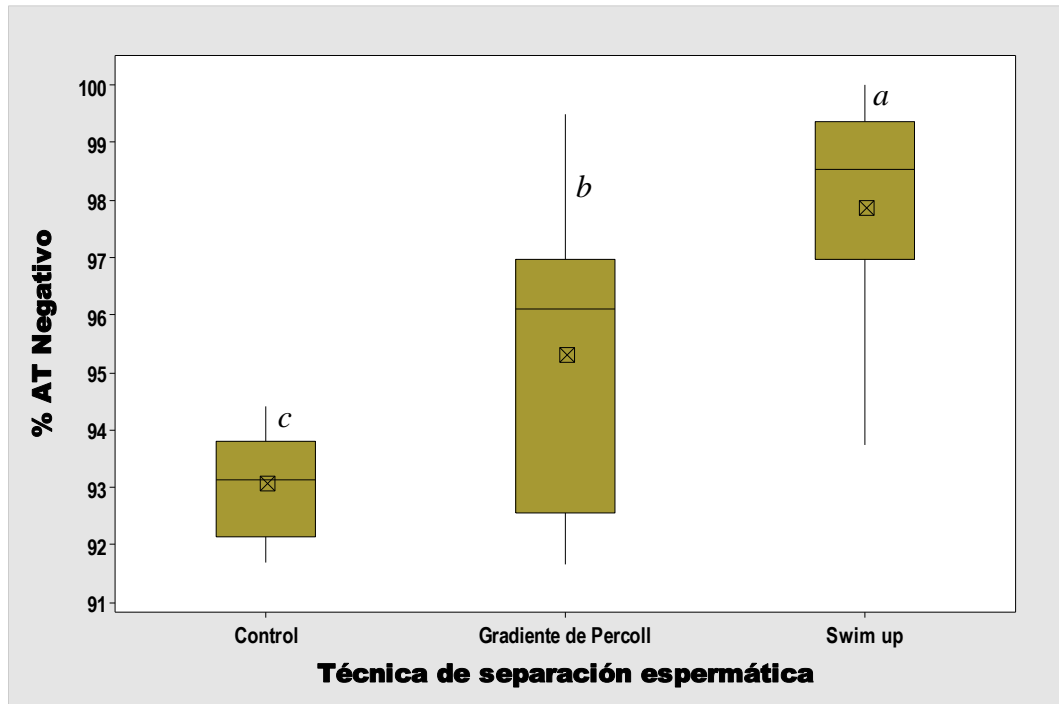


Figura 15. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca”, negativos a la coloración con Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

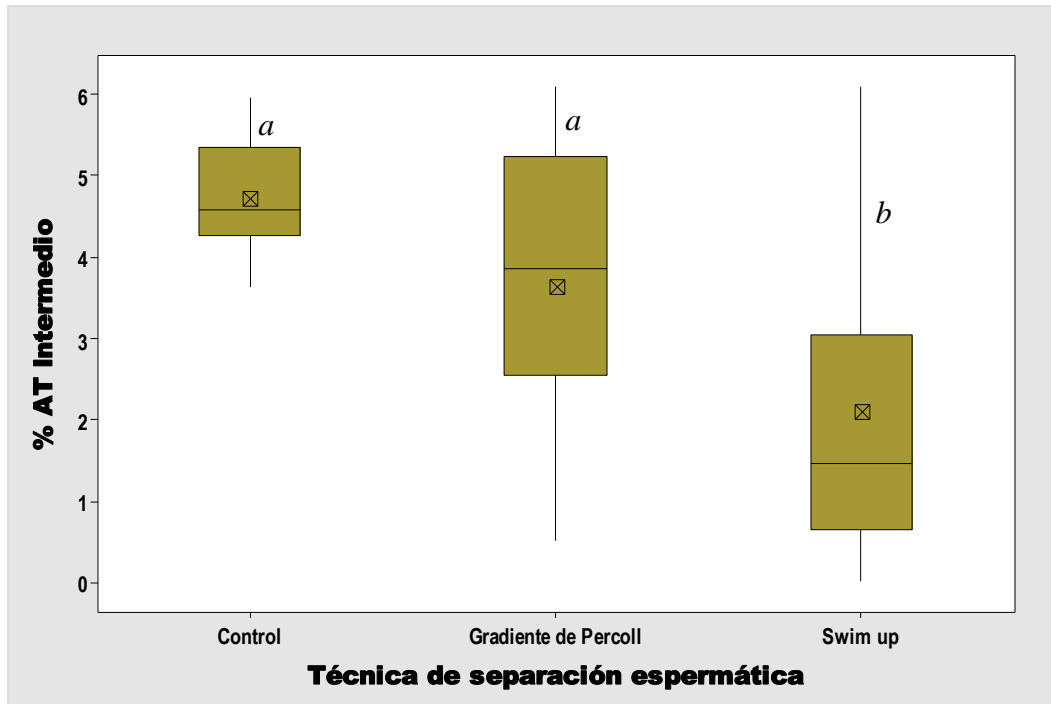


Figura 16. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca”, intermedios a la coloración con Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

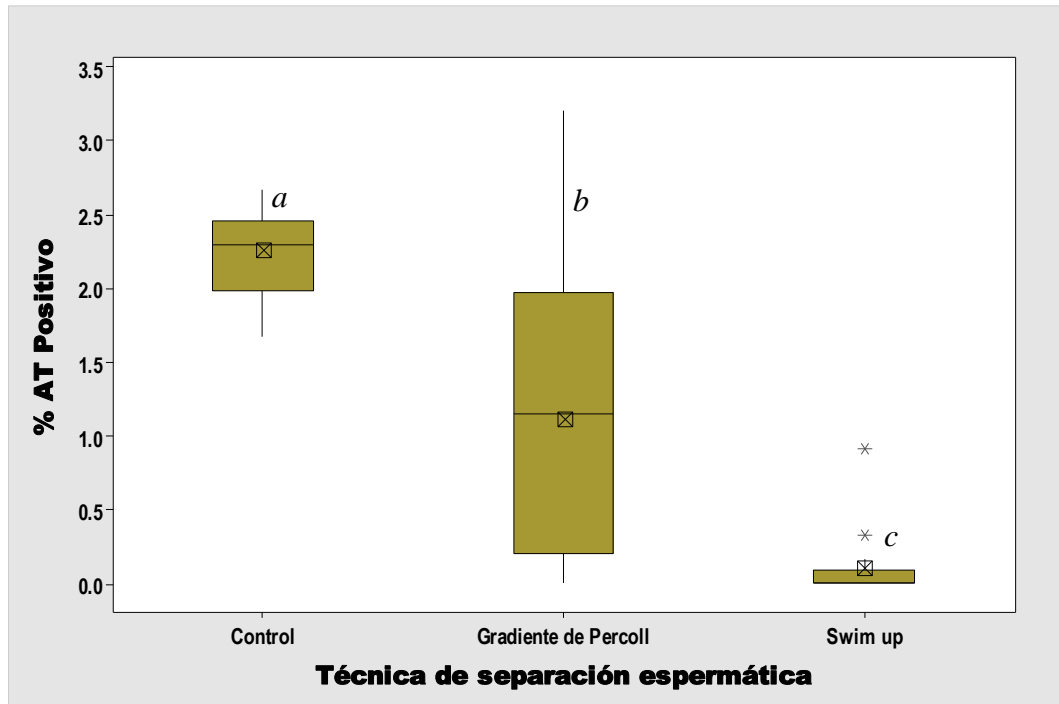


Figura 17. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca”, positivos a la coloración con Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

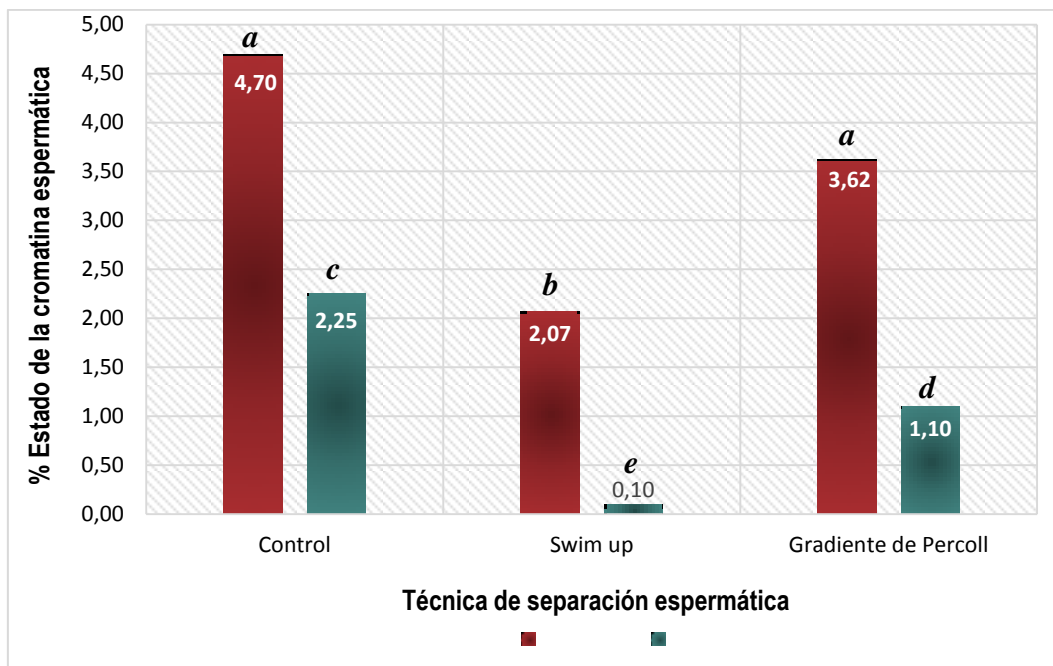


Figura 18. Efecto de las técnicas de separación espermática sobre la integridad del DNA en espermatozoides de “alpaca”, con Azul de Toluidina. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017). Diferentes letras en la parte superior de las barras indican diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$).

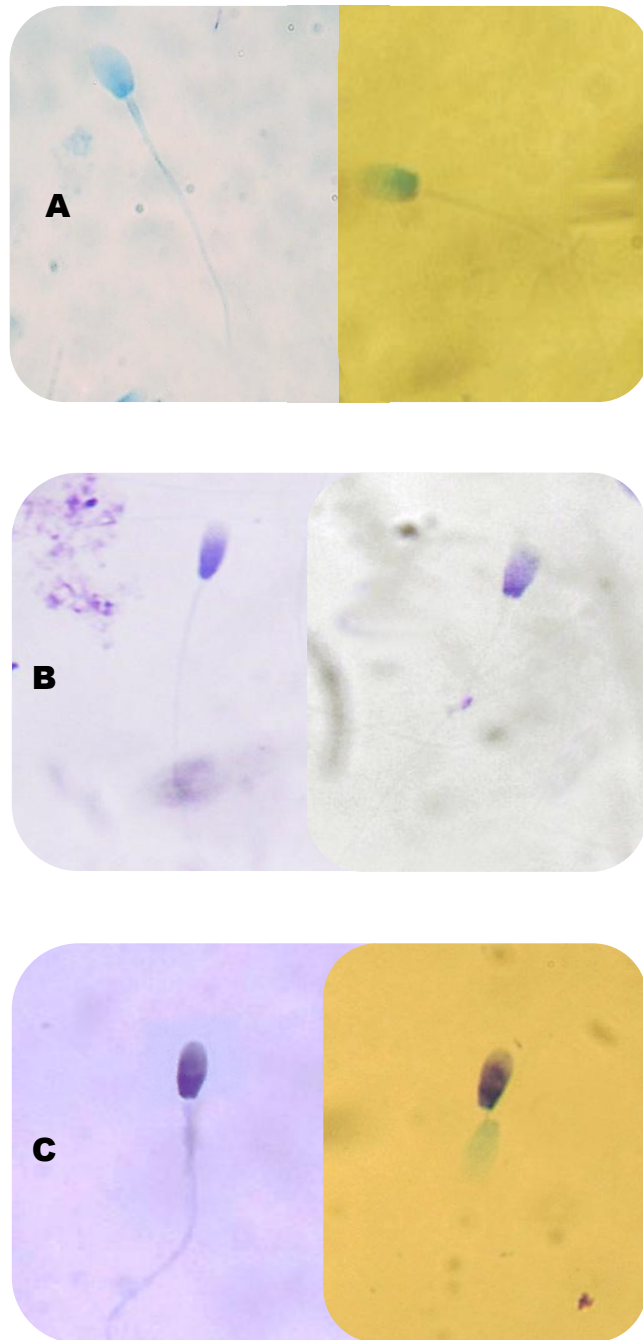


Figura 19. Patrones de coloración de los espermatozoides de “alpaca”, mediante la coloración del Azul de Toluidina: (A) Negativos: color azul, sin alteración de la condensación de la cromatina, (B) Intermedios: violeta claro, algún grado de descondensación, (C) Positivos: violeta oscuro, alto grado de descondensación a 100X. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA-Ayacucho (julio-setiembre, 2017).

V. DISCUSIÓN

En la Tabla 2, se muestran los resultados del notable descenso de la motilidad después de los procesos de separación espermática. Comparando las dos técnicas de separación, mediante Gradiente de Percoll se obtuvieron mejores resultados ($15,60 \pm 2,75\%$); mientras que con la técnica de Swim up la motilidad se vió más reducida ($13,13 \pm 1,69\%$), sin duda ambos valores menores a los encontrados en la muestra post descongelamiento ($17,20 \pm 2,11\%$). En la Figura 10 se muestran los resultados del análisis estadístico post hoc HSD de Tukey, en el que se muestra que existen diferencias estadísticas significativas entre las técnicas de separación espermática ($p \leq 0.05$). En teoría, la motilidad espermática de semen post descongelación varían alrededor del 10-20%.¹³ Se reportaron valores del 60-98% en semen fresco que descendieron hasta 15-20%,³⁹ en otros trabajos reportaron 46,7%,²² 16,96%,⁸² y 26,18% de motilidad post descongelación.⁸³ Estos datos fueron superiores a los encontrados en el presente trabajo; sin embargo también hay reportes del 22,8% que descendieron hasta el 8,52%⁸⁴ y otro bastante significativo del 0,00%.²³

En la Tabla 3, se muestran los resultados de la vitalidad espermática y comparando ambas técnicas de separación, se encontraron valores similares mediante Swim up ($54,19 \pm 12,575\%$) y Gradiente de Percoll ($53,45 \pm 6,29\%$) respectivamente, que no vendrían a ser determinantes para una técnica. En la Figura 11 se muestra el análisis estadístico post hoc HSD de Tukey, en el cual no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambas técnicas de separación espermática ($p \leq 0.05$). El porcentaje de vitalidad más alto encontrado en semen fresco de alpaca fue 74.9% mediante vagina artificial,¹⁵ aunque normalmente varían entre los 40 y 50%.²³ Se han reportado valores del 15%⁸⁵ y 20% en semen post descongelación,²⁴ resultados inferiores en comparación con los encontrados en el presente trabajo 51,74%.

En la Tabla 4, se muestran los resultados de la concentración espermática, mediante la técnica Gradiente de Percoll se recuperaron mayor cantidad de espermatozoides ($80,51 \pm 34,53\%$) ya que la misma metodología permite conglomerar gran cantidad espermática; mientras que con la técnica de Swim up solo se obtuvo el ($36,67 \pm 17,33\%$), debido a que pocos espermatozoides pueden vencer las dificultades y llegar a la parte superior para ser recuperados. En la Figura 12 se muestra el análisis estadístico post hoc HSD de Tukey, en el que se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambas técnicas de separación espermática ($p \leq 0.05$). La concentración espermática en semen fresco de alpaca varían entre los 30 y 150 millones por mililitro,²⁶ aunque hay trabajos que reportaron 134,5 millones/ml,⁴⁶ 112,36 millones/ml,⁴⁷ 152,98 millones/ml,²⁶ 80,48 millones/ml⁸⁶ y 65,43 millones/ml;⁸⁷ incluso se reportó hasta 339,4 millones/ml de espermatozoides.⁵⁰ En comparación con el presente trabajo, el valor encontrado estuvo dentro del rango normal no siendo bajo 103,40%.

En la Tabla 5, se muestran los resultados de integridad de la membrana plasmática y comparando ambas técnicas de separación espermática, los valores obtenidos fueron similares mediante Gradiente de Percoll ($57,18 \pm 11,50\%$) y Swim up ($56,30 \pm 13,58\%$), no siendo determinante para una técnica. En la Figura 13 se muestra el análisis estadístico post hoc HSD de Tukey, donde no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambas técnicas de separación espermática ($p \leq 0.05$). En semen fresco de alpaca, se encontraron respuestas endosmóticas del 55,80%,⁴⁶ 62%⁴⁷ y 53,34%;⁴⁸ mientras que en espermatozoides epididimarios post descongelación, se reportaron 24,3%,²⁴ 50,93%³⁴ y 83,4%.⁸⁸ Estos últimos resultados con distintos dilutores y crioprotectores, sin duda necesarios para poder obtener una gran cantidad de espermatozoides con membrana plasmática intacta. En el presente trabajo, se encontraron valores por encima de los 50%, parecidos a los resultados mencionados; dentro del grupo de espermatozoides viables, existe un conjunto de ellos que a pesar de no poseer movilidad muestran membranas plasmáticas intactas, los denominados “espermatozoides viables no móviles”, que están desestabilizadas pero sin llegar a la muerte.⁸⁹ De forma similar en otras especies, sólo alrededor del 40-50% de los espermatozoides sobreviven al proceso de criopreservación aun usando protocolos optimos.⁸⁸

En el procedimiento de separación por centrifugación de las muestras de semen, no ocurre una “selección natural” de espermatozoides de mayor motilidad, existe una separación incompleta, debido a la forma, tamaño y densidad de las partículas presentes.⁹⁰ En términos de calidad espermática (motilidad y vitalidad), la técnica de Swim up implica un periodo relativo (alrededor de 60 minutos), produciendo estrés y alteración en los patrones del desplazamiento de los espermatozoides⁹¹ y mediante Gradiente de Percoll (alrededor de 10 minutos) que es más fácil de realizar, pero al utilizar más de una centrifugación, puede causar daño a la membrana plasmática y sus componentes (DNA y proteínas), consecuentemente afectar su motilidad, viabilidad y habilidad fecundante demostrada en bovinos y en humanos.⁹² Son escasos los trabajos que comparan las técnicas del Percoll con Swim up; no obstante, en bovinos se observaron que ambas técnicas eran satisfactorias para su utilización en la FIV.⁹³ Estas diferencias en la eficacia de selección entre ambas técnicas podrían probablemente ser debidas a que los espermatozoides no móviles o incluso muertos pueden ser forzados a bajar hacia la solución de Percoll de mayor densidad, mientras que con la técnica del Swim up, solo los móviles pueden migrar hacia la parte superior.⁹⁴ Trabajos donde se han utilizado diferentes fuerzas de centrifugación, buscando una máxima recuperación celular, han demostrado que los incrementos en dicha fuerza, pueden conducir a pérdidas entre el 15% y 20% de los espermatozoides⁹⁵ y estudios donde se han evaluado bajas fuerzas de centrifugación, han permitido mantener niveles de vitalidad espermática, superiores al 75%.⁹⁶

En el presente trabajo no se observó el efecto perjudicial de la centrifugación, independientemente de la técnica utilizada, ya que los porcentajes obtenidos fueron similares en cuanto a vitalidad e integridad de membrana y no se encontraron diferencias estadísticas; mientras que la motilidad se vio más afectada, mostrando una reducción porcentual en comparación incluso con el semen descongelado (antes del proceso de separación). La centrifugación genera daños mecánicos sobre los espermatozoides, los cuales dependen de la duración y la fuerza con el que se ejecuta.⁸⁶ Otros autores aseguran que el Percoll no mejora la calidad espermática como en eyaculado de equinos.⁹⁷ De acuerdo a lo anterior, es importante continuar evaluando alternativas de centrifugación que conduzcan a una máxima recuperación celular, condicionada a la mayor funcionalidad de los espermatozoides.

En la Tabla 6, se muestran resultados de los estados de la cromatina espermática clasificados en tres grupos. En la muestra descongelada se encontraron más porcentaje de espermatozoides con alto grado de descondensación de la cromatina espermática ($2,25 \pm 0,29\%$) y después de la separación espermática comparando ambas técnicas, tanto en Swim up como en Gradiente de Percoll se encontraron diferencias notables, siendo ($0,10 \pm 0,24\%$) y ($1,10 \pm 0,96\%$) respectivamente. En las Figuras 15, 16 y 17 se muestran los resultados de los análisis estadísticos realizados mediante Kruskal-Wallis, en los cuales se determinaron que existen diferencias estadísticas significativas entre ambas técnicas de separación en los tres casos: AT negativo, AT intermedio y AT positivo ($p \leq 0,05$). En la Figura 18, se muestra la comparación de los espermatozoides intermedios y positivos a la coloración con Azul de Toluidina, claramente se observan los efectos de los procesos de separación espermática sobre la integridad del DNA espermático. En el presente trabajo se observaron las coloraciones de las cabezas espermáticas: violeta oscuro (positivos, alto grado de descondensación), violeta claro (intermedios, algún grado de descondensación) y azul (negativos, sin alteración de la condensación de la cromatina espermática), iguales a los encontrados en semen de llama,⁶ guanaco y esperma equino, cabe mencionar que estas coloraciones ya se habían determinado en semen fresco de alpaca encontrando los siguientes resultados: AT positivos 7,55%, AT intermedios 21,67% y AT negativos 70,78%;⁵ sin duda valores superiores en comparación con el presente trabajo.

Basándose en estudios anteriores; en el presente trabajo, teniendo en cuenta la fuerza y los tiempos empleados para las centrifugaciones, ambas técnicas de separación espermática causaron daño en el DNA espermático, visualizados mediante la coloración de las cabezas espermáticas, con la técnica de Swim up se encontraron menores porcentajes de descondensación de la cromatina espermática 0,10%, mientras que con Gradiente de Percoll 1,10%; sin embargo ambos resultados fueron menores en comparación con el control (muestra post descongelación), estos resultados se estarían atribuyendo principalmente al protocolo utilizado. Trabajos con semen de bovinos, mencionan que la centrifugación a 700 g durante 10, 30 y 45 min mediante Gradiente de Percoll, causaron daño significativo al DNA de forma gradual.⁴ En trabajos con semen fresco de humanos, encontraron una disminución significativa en la tasa de fragmentación en el DNA espermático mediante Gradiente de Densidades (GD)

respecto a las muestras antes de procesar; no obstante comparando técnicas de separación espermática Swim up y GD obtuvieron resultados beneficiosos, espermatozoides con menor grado de fragmentación,⁹ resultados parecidos a los del presente trabajo. Si bien es cierto, lo ideal sería que las técnicas de separación espermática mejoren los parámetros espermáticos clásicos (motilidad, vitalidad, concentración e integridad de membrana plasmática), también debería ocurrir lo mismo con la integridad del DNA espermático; sin embargo una fracción de los espermatozoides recuperados presentan daños en su DNA y en distinto grado como se puede evidenciar en los resultados del presente trabajo. El procesado de las muestras de semen se realiza bajo un protocolo que depende del centro y es una técnica totalmente manual, los resultados pueden variar en función del laboratorio y de lo selectivos que sean recuperando las fracciones. El daño al DNA puede ocurrir durante el procesamiento de los espermatozoides, se ha descrito que los protocolos que centrifugan repetidamente estarían induciendo daño iatrogénico,⁹⁸ por otro lado estudios previos demostraron que aumentando en el tiempo de incubación de semen a temperatura ambiente o a 37°C después de su aislamiento mediante centrifugación por GD, estaría incrementando significativamente el daño en el DNA.⁹⁹ Tanto la centrifugación como la incubación inducen la apoptosis a través de la acción de las altas concentraciones de las EROs,¹⁰⁰ causando una disminución drástica de la motilidad y un aumento en la fragmentación del DNA.² Los espermatozoides inmóviles tienen más probabilidad de presentar el DNA fragmentado que los espermatozoides móviles.⁸

Se conoce que la centrifugación es intrínsecamente nociva, y puede generar alteraciones celulares; en general, puede considerarse que una alta fuerza de centrifugación, es perjudicial para la integridad de los espermatozoides.¹⁰¹ El uso biotecnológico del semen involucra la manipulación excesiva y el sometimiento de los espermatozoides a condiciones estresantes, los resultados exitosos en FIV dependen de los espermatozoides seleccionados ya que necesariamente deben tener material genético íntegro para así garantizar el desarrollo embrionario normal.

VI. CONCLUSIONES

1. La motilidad espermática fue el parámetro más afectado luego de someter a técnicas de separación espermática tanto por Swim up como por Gradiente de Percoll, incluso bajos niveles de fuerza de centrifugación alteraron la motilidad, es por ello que se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambas técnicas y también en la concentración espermática; mientras que en vitalidad y funcionalidad de la membrana plasmática, parece indicar una mayor tolerancia al estrés originado por la centrifugación, no encontrándose diferencias estadísticas significativas entre ambas técnicas.
2. Según la coloración espermática con Azul de Toluidina luego de la separación espermática por Swim up y Gradiente de Percoll se encontraron: AT positivo ($0,10 \pm 0,24\%$) y ($1,10 \pm 0,96\%$), AT intermedio ($2,07 \pm 1,89\%$) y ($3,62 \pm 1,71\%$), AT negativo ($97,83 \pm 2,02\%$) y ($95,28 \pm 2,44\%$) respectivamente para cada técnica; mediante la técnica de Swim up se generó menor daño en el DNA espermático, en comparación con la técnica de Gradiente de Percoll. Se observaron las mismas coloraciones en esperma de llama, guanaco y equino: violeta oscuro (positivo, alto grado de descondensación), violeta claro (intermedio, algún grado de descondensación) y azul (negativo, sin alteración de la condensación de la cromatina espermática).

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar trabajos de investigación en épocas de reproducción de estos animales (diciembre a marzo), para tener mayor disponibilidad de muestras seminales y sobretodo mayor motilidad espermática.
2. Estudiar más a fondo la dinámica de la integridad del DNA espermático, para conocer mejor la resistencia del DNA nuclear, evaluar alternativas de centrifugación en tiempos y revoluciones que conduzcan a una máxima recuperación celular luego de los procesos de separación espermática, una mayor cantidad de ensayos serían necesarios para ajustar los procedimientos y mejorar los índices de eficiencia de la técnica en esta especie antes de utilizarla en prácticas de FIV.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aitken RJ, Clarkson S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Androl.* 1988; 9:367-376.
2. Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2000; 74:1200-1207.
3. Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci.* 2003; 77:33-49.
4. Urrego R, Ríos A, Olivera ÁM, Camargo O. Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2008; 21:19-26.
5. Carretero MI, Arraztoa CC, Casaretto CI, Huanca W, Neild DM, Giuliano MS. Alpaca sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue. *Research Gate.* [revista en Internet] 2012 January. [accessed 24 May 2017]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/226177727>.
6. Carretero MI, Giuliano SM, Casaretto CI, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *InVet.* 2009; 11(1): 55-63.
7. Nava-Trujillo H, Hernández-Fernández A, Quintero-Moreno A. Integridad de la cromatina y forma de la cabeza del espermatozoide de toro: Evaluación simultánea con la tinción de Azul de Toluidina. *Rev Cientif.* 2012; 22(3): 211-216.
8. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989; 41:183-197.
9. Amiri I, Ghorbani M, Heshmati S. Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim up Methods. *J Clin Diagn Res.* 2012; 6: 1451-1453
10. Fernandez-Baca S. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal Reproduction Science.* 1993; 33: 307-323.
11. Brown, BW. A review on reproduction in South American camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 58:169–195.
12. Aguilar M, Torres D, Murillo R, Zeballos J. Buenas prácticas de manejo en la producción de alpacas: Manual Técnico. Perú: Desco y Minsur; 2014
13. Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepulveda N, Sánchez R. Effects of the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama paco*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.* 2005; 7(3): 303-309.
14. Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology.* 1997; 47: 619-626.
15. Bravo P, Ccallo M, Garnica J. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Rumin. Res.* 2000; 38: 91–95
16. Cervantes M, Huanca W, González M, Palomino J, Leyva V. Relación entre día de colección y la recuperación de embriones en alpacas superovuladas. *Rev Inv. Vet Perú.* 2011; 22(2): 125-132.
17. Brackett B. Aplicaciones de la fertilización *in vitro*: Avances en Zootecnia. Zaragoza: Acribía; 1988.
18. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress DNA damage and the y chromosome. *Reproduction.* 2001; 122: 497-506.

19. Canorio Pariona N. Efecto del proceso de criopreservación sobre las proteínas antioxidantes GPX1 Y GPX4 de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis doctoral]. Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
20. Agca Y, Gilmore J, Byers M, Woods E, Critser J. Osmotic Characteristics of Mouse Spermatozoa in the Presence of Extenders and Sugars. *Biology of Reproduction*. 2002.; 67: 1493-1501.
21. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 62: 142-172.
22. Bravo PW, Ordoñez C, Alarcón V. Semen processing and freezing of alpacas and llamas. 13th ed. Sydney: ICAR; 1996.
23. Ordoñez C, Ampuero E, Alarcón V, Franco E, Hanzen Ch, Cucho H. Evaluación de tres dilutores en la criopreservación de semen de alpaca *Vicugna pacos*, en pelets. *ASPRA*. 2015; 5(1): 119-123.
24. Banda R, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y Leche Descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet (Perú)*. 2010; 21 (2): 145-53.
25. Bustinza V. La alpaca: Crianza, manejo y mejoramiento. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2001.
26. Garnica J, Achata R, Bravo PW. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*. 1993; 32: 85-90.
27. Memorias del IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). Punta Arenas; 1981.
28. Garner DL, Hafez ES. Spermatozoa and seminal plasma: Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
29. Buendia P, Soler C, Paolicchi F, Gago G, Urquieta B. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer computer-assisted system. *Theriogenology*. 2002; 57: 1207-1218.
30. Santiani Acosta A. Uso de dos Análogos de Superóxido Dismutasa para prevenir la Desestabilización Espermática Prematura durante la Criopreservación y Vitriificación en espermatozoides de Alpaca [Tesis doctoral]. Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
31. Hafez E. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 6^{ta} ed. México: McGraw Hill Interamericana; 1996.
32. Evangelista Vargas O. Caracterización y Morfometría de los Espermatozoides en alpacas macho (*Vicugna pacos*) de fertilidad comprobada [Tesis doctoral]. Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
33. Torres R. Evaluación de la fertilidad en alpacas (*Vicugna pacos*) de la raza Huacaya a través de inseminación artificial con 2-3 siembras usando un dilutor, en el distrito de Palca, provincia de Lampa, Puno. Universidad Católica de Santa María. Perú; 2006
34. Canorio Pariona N. Criocapacitación del espermatozoide de Alpaca (*Lama pacos*) [Tesis de magister]. Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2009.
35. Saacke RG. Factors affecting fertilization in estrous synchronized cattle. *The Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. Kansas State Univ Manhattan. 2002; 163.
36. Sorensen A. Evaluación de la aptitud reproductiva: Reproducción animal, principios básicos y prácticas. McGraw-Hill; 1991.

37. Centola G, Ginsburg K. Evaluation and treatment of infertile male. Cambridge University Press. Cambridge United Kingdom. 1996; 263-276.
38. Raymundo F, Huanca W, Huertas S, Gauly M. Influence of different extenders on the motility in alpaca (*Lama pacos*) semen: Proceedings of the 2nd Int Camelid Conference Agro-economics of Camelid Farming Almaty. Kazakhstan: 2000
39. Bravo PW, Flores D, Ordoñez C. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biology of Reproduction*. 1997b; 57: 520-524.
40. Kershaw Y, Maxwell WMC. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 2011; 64: 13–38.
41. Lubos H. Bases de la reproducción bovina. México: Editorial Diana; 1983.
42. Guanaluiza AP. Cámara de Neubauer. Universidad Central del Ecuador. Clinical Lab Zaehlammern. 2017; 05.
43. Resúmenes X Reunión Científica Anual Asociación Peruana de producción Animal. Comparativo de dos métodos de colección de semen en alpacas: 1987.
44. Pérez B, Yenes P, García P. Four subpopulations of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypoosmotic swelling test and acrosome status during incubation at 37°C. 2003; 1401-1407.
45. Quintero A, Miro J, Teresa A, Rodríguez JE. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. 2003; 1973-1990.
46. Resúmenes del XXXIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de producción Animal: Evaluación de la respuesta del test hipoosmótico en espermatozoides frescos de alpaca. Trujillo: APPA; 2011.
47. Giuliano S, Casaretto C, Moran M, Huanca W. III Simposium Internacional de Investigaciones sobre Camélido: Electroeyaculación Características Seminales de Alpaca. Perú. 2010.
48. Rodríguez Llano, CV. Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis de Magister], Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2009.
49. Henkel R, Schill W. Sperm preparation for ART. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2003; 1: 108.
50. Ávila C, Bartolomé M, Aguilera A, González S, López V. Utilización de técnicas Swim up en la mejora de semen de ganado vacuno. 1993; 42 (158): 229-236..
51. Somfai T, Bodo S, Nagy S, Papp AB, Ivancsics J, Baranyai B. Effect of swim up and percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozenthawed bull spermatozoa. *Reprod Dom Anim*. 2002; 37: 285-290.
52. Esbert Algam M. Estudio de la fragmentación en el ADN espermático en pacientes sometidos a técnicas de reproducción asistida [Tesis doctoral]. Barcelona, Universidad Autonoma de Barcelona; 2014.
53. Boomsma CM, Heineman MJ, Cohlen BJ, Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007; 17.
54. Pogany G, Corzett M, Weston S, Balhorn R. DNA and protein content of mouse sperm: Implications regarding sperm chromatin structure. *Experimental Cell Research*. 1981; 136: 127- 36.
55. Meistrich ML, Mohapatra B, Shirley CR, Zhao M. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*. 2003; 111: 483-8.
56. García A, Martínez J, Oliver M, Abad C, Amengual MJ, Navarro J *et al*. Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil. Steril*. 2011; 95:105-109.

57. Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Experimental Cell Research*. 1993a; 207: 202-5.
58. Marushige Y, Marushige K. Phosphorylation of sperm histone during spermiogenesis in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1978; 518: 440-9.
59. Ward WS, Coffey DS. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biology of Reproduction*. 1991; 44: 569-74.
60. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod*. 2010; 16: 30-36.
61. McPherson S, Longo F. Localization of DNase I-hypersensitive regions during rat spermatogenesis: stage-dependent patterns and unique sensitivity of elongating spermatids. *Molecular Reproduction and Development* 1992; 31: 268-79.
62. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implication in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972; 26: 239-57.
63. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol. Reprod*. 2004; 71(1): 28.
64. De Iulii GN, Thomson LK, Mitchell LA, Finnie JM, Koppers AJ, Hedges A *et al*. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. *Biol Reprod*. 2009; 81:517-524.
65. Halliwell B. Antioxidants: The Basics-What they are and how to evaluate them. In. *Antioxidants in disease mechanisms and therapy*. Academic Press. 1997; 4.
66. Morrel JM, Winblad C, Georgakas A, Stuhmann G, Humblot P, Johannisson A. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Animal reproduction science*. 2013; 140: 62-69.
67. Álvarez Goncalvez C, Pérez Carrera A. Técnicas de estudio para la evaluación del daño al ADN y su aplicación en la producción animal. 7^{ma} ed. SNA: Publicación periódica científico. 2015.
68. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg J, Milne P, *et al*. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1998; 59:1037-146.
69. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 1992; 119: 493-501.
70. Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*. 2008; 44 (3): 250-254.
71. Singh J, Rao MR. Interaction of rat testis protein, TP, with nucleosome core particle *Biochemistry International*. 1988; 17: 701-10.
72. Fernández JL, Gosálvez J, Santiso R, Goyanes V, López C. Adaptation of the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test to Determine DNA Fragmentation from Bull Sperm. *Nova Biochemical Books*. 2007; 69-84.
73. Cortes EL, Dávila MI, López C, Fernández JL, Gosálvez J. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urol. Esp*. 2007; 31(2): 120-131.
74. Ward W, Zalensky A. The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1996; 6(23): 139-147.

75. Barrera C, Mazolli AB, Pelling C, Stockert C. Metachromatic staining of human sperm nuclei after reduction of disulphide bonds. *Acta histochem*, (Jena). 1993; 94: 141-149.
76. Derijck A, Van der Heijden G, Giele M, Philippens M, De Boer P. DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum Mol Genet*. 2008; 17: 1922-37.
77. Bordignon V, Smith L. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation Development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol. Reprod*. 1999; 61:1513-1520.
78. Tomsu M, Sharma V, Miller D. Embryo quality and IVF treatment outcomes may correlate with different Sperm comet assay parameters. *Hum. Reprod*. 2002; 17: 1856-62.
79. Gobierno Regional de Ayacucho. Gerencia de Recursos Naturales y Gestión del Medio Ambiente. SENAMHI; 2012. <http://www.senamhi.gob.pe/site/tesis/>
80. Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim. Reprod. Sci*. 2008; 104: 359–369.
81. Erenpreiss J, Bars J, Lipatnikova V, Erenpreisa J, Zalkalns J. Comparative study of cytochemical tests for sperm chromatin integrity. *J. Androl*. 2001; 22(1): 45-53.
82. Mendoza Alacuta E. Evaluación de dos protocolos para la congelación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*) a 2736 msnm Ayacucho-2013 [Tesis de licenciatura]. Perú, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2015.
83. Naveros ML, Contreras M. Evaluación de dos dilutores comerciales en la congelación de semen con fines de inseminación artificial en alpacas (*Vicugna pacos*). *Reu científ an*. 2014; 244.
84. Delgado-Callisaya P, Fernández R, González V, Maceda E, Copa S, Medina J. III Congreso mundial de camélidos: Técnicas de colección de semen en llamas. Potosí Bolivia. 2003.
85. Gonzales H. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia*. 2008;10: 223-234.
86. Ramires-Neto C, Monteiro GA, Soares RF, Pedrazzi C, Dell'AQUA JR, Papa FO *et al*. New seminal plasma removal method for freezing stallion semen. *Theriogenology*, 79; 2013: 1120-1123
87. Love CC, Blanchard TL, Varner DD, Brinsko SP, Voge J, Bliss S *et al*. Effect of daily semen centrifugation and resuspension on the longevity of equine sperm quality following cooled storage. *Theriogenology*, 77; 2012: 1911-1917.
88. Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate, Tris and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev*. 2007; 19: 792-796.
89. Drobni EZ, Zhong CQ, Overstreet JW. Separation of cryopreserved human semen using Sephadex columns, washing, or percoll gradients. *J. Androl*. 1991; 12: 201-208.
90. Chauhan M, Nadir S, Bailey T, Pryor A, Butler S, Notter D *et al*. Bovine follicular dynamics, oocyte recovery, and development of oocytes microinjected with a green fluorescent protein construct. *Journal of Dairy Science*. 1999; 82: 918–926.

91. Correa JR, Zavos PM. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology*. 1996; 46: 1225-1232.
92. Conrad M, Ingold I, Buday K, Kobayashi S, Angeli JPF. ROS, thiols and thiolregulating systems in male gametogenesis. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subj.* 2015
93. Seidel GE Jr, Leipold SD, Shawki H. Preparation of bovine sperm for in vitro fertilization by Swim up or centrifugation through Percoll or BSA *Theriogenology*. 1995; 43(1): 319.
94. Ng FLH, Liu DY, Baker HWG. Comparison of Percoll, mini-Percoll and Swim up methods for sperm preparation from anormal semen samples. *Human Reprod.* 1992; 7(2): 261-266.
95. Alvarenga MC, Papa FO, Carmo TM, Kievitsbosch T, Castro MM, Ramírez C. Methods of concentrating stallion semen. *Journal of equine veterinary science*. 2012; 32: 424-429.
96. Ferrer MS, Lyle SK, Eilts BE, Eljarrah AH, Paccamonti DL. Factors affecting sperm recovery rates and survival after centrifugation of equine semen. *Theriogenology*. 2012; 78: 1814–1823.
97. Sieme H, Martinsson G, Rauterberg H, Walter K, Aurich C, Petzoldt R. Application of techniques for sperm selection in fresh and frozenthawed stallion semen. *Reprod Dom Anim.* 2003; 38: 134-140.
98. Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ. Latrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4: 439-445.
99. Cárdenas H, Vivanco W, Bravo F. Comparativo de dos métodos de colección de semen en alpacas. *Asoc Peruana. Prod. Anim.* 1987: 86
100. Jayaraman V, Upadya D, Narayan PK, Adiga SK. The sperm processing by Swim up and density gradient is effective in the elimination of the sperm with DNA damage. *J assist Reprod Genet.* 2012; 29: 557-563.
101. Mari G, Bucci D, Love CC, Mislei B, Rizzato G, Giaretta E. Effect of cushioned or single layer semen centrifugation before sex sorting on frozen stallion semen quality. *Theriogenology*. 2015; 83: 953-958.

ANEXOS

Anexo 1: Composición del medio hipoosmótico.

COMPONENTE	CANTIDAD
Fructuosa	0,0450 g
Citrato de sodio	0,0245 g
completar con agua destilada hasta 20 ml	

Anexo 2: Composición del medio Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato: TALP-Sperm 10X

COMPONENTE	CANTIDAD
NaCl	0.2308 g
KCl	0.0024 g
NaHCO ₃	0.0840 g
NaH ₂ PO ₄	0.0017 g
lactato de sodio	14.8 µl
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.0118 g
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.0089 g
HEPES	0.1041 g
pH	7.4
Disolver en 40 ml de agua destilada y filtrar	

Anexo 3: Composición del medio Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato: TALP-FIV

COMPONENTE	CANTIDAD
NaCl	0.2665 g
KCl	0.0095 g
NaHCO ₃	0.0840 g
NaH ₂ P0 ₄	0.0015 g
Lactato de sodio	74.4 µl
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.0118 g
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.0041 g
Rojo fenol	0.0004 g
pH	7.4
Disolver en 40 ml de agua destilada y filtrar	

Anexo 4: Composición del Percoll 90%

COMPONENTE	CANTIDAD
Talp sperm 10X	4 ml
NaHCO ₃	0.084 g
lactato de sodio	90 µl
Percoll	36 µl
MgCl ₂ (6H ₂ O)	158 µl
CaCl ₂ (H ₂ O)	78 µl
Disolver en 40 ml de agua destilada y filtrar	

Anexo 5: Composición del Percoll 45%

COMPONENTE	CANTIDAD
Percoll 90%	20 ml
Talp sperm 10X	20 ml

Anexo 6: Análisis estadístico realizado usando como variables (técnicas de separación espermática) entre los grupos de estudio (parámetros espermáticos) mediante la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, ($p \leq 0.05$).

Parámetros espermáticos	Técnicas de separación espermática	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Motilidad	Control	,182	15	,196	,872	15	,036
	Swim up	,164	15	,200 [*]	,908	15	,124
	Gradiente de Percoll	,175	15	,200 [*]	,942	15	,411
Vitalidad	Control	,192	15	,141	,949	15	,508
	Swim up	,185	15	,177	,918	15	,181
	Gradiente de Percoll	,129	15	,200 [*]	,959	15	,678
Integridad de la membrana plasmática	Control	,108	15	,200 [*]	,977	15	,948
	Swim up	,238	15	,022	,918	15	,178
	Gradiente de Percoll	,165	15	,200 [*]	,946	15	,459
Concentración espermática	Control	,194	15	,133	,804	15	,006
	Swim up	,148	15	,200 [*]	,918	15	,179
	Gradiente de Percoll	,176	15	,200 [*]	,929	15	,262

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Anexo 7: Análisis estadístico realizado usando como variables (motilidad, vitalidad, concentración e integridad de la membrana plasmática) mediante la prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey.

Motilidad

HSD Tukey^a

Técnica de separación espermática	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Swim up	15	13,1333	
Gradiente de Percoll	15		15,6000
Control	15		17,2000
Sig.		1,000	,132

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

Vitalidad

HSD Tukey^a

Técnica de separación espermática	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Control	15	51,7367
Gradiente de Percoll	15	53,4473
Swim up	15	54,1900
Sig.		,828

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

Integridad de la membrana plasmática

HSD Tukey^a

Técnica de separación espermática	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	
Control	15	55,6907	
Swim up	15	56,3033	
Gradiente de Percoll	15	57,1807	
Sig.		,942	

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

Concentración espermática

HSD Tukey^a

Técnica de capacitación espermática	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Swim up	15	36,6767	
Gradiente de Percoll	15		80,5093
Control	15		103,4167
Sig.		1,000	,222

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15,000.

Anexo 8: Análisis estadístico realizado usando como variables (técnicas de separación espermática) entre los grupos de estudio (descondensación de la cromatina espermática) mediante la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk, ($p \leq 0.05$).

Descondensación de la cromatina espermática	Técnica de separación espermática	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Negativo	Control	,166	15	,200*	,940	15	,383
	Swim up	,202	15	,103	,876	15	,042
	Gradiente de Percoll	,163	15	,200*	,945	15	,445
Intermedio	Control	,166	15	,200*	,948	15	,497
	Swim up	,187	15	,169	,889	15	,066
	Gradiente de Percoll	,119	15	,200*	,956	15	,621
Positivo	Control	,097	15	,200*	,965	15	,780
	Swim up	,392	15	,000	,489	15	,000
	Gradiente de Percoll	,177	15	,200*	,922	15	,204

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Anexo 9: Análisis estadístico realizado usando como variables (descondensación de la cromatina espermática: negativo, intermedio, positivo) mediante la prueba Kruskal-Wallis, ($p \leq 0.05$).

Rangos

Técnica de separación espermática		N	Rango promedio
Negativo	Control	15	12,00
	Swim up	15	34,67
	Gradiente de Percoll	15	22,33
	Total	45	

Estadísticos de prueba^{a,b}

Negativo	
Chi-cuadrado	22,396
gl	2
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Técnica de capacitación espermática

Rangos

Técnica de separación espermática		N	Rango promedio
Intermedio	Control	15	30,93
	Swim up	15	14,13
	Gradiente de Percoll	15	23,93
	Total	45	

Estadísticos de prueba^{a,b}

Intermedio	
Chi-cuadrado	12,387
gl	2
Sig. asintótica	,002

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Técnica de capacitación espermática

Rangos

Técnica de separación espermática		N	Rango promedio
Positivo	Control	15	35,93
	Swim up	15	10,23
	Gradiente de Percoll	15	22,83
	Total	45	

Estadísticos de prueba^{a,b}

	Positivo
Chi-cuadrado	29,610
gl	2
Sig. asintótica	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Técnica de
capacitación espermática

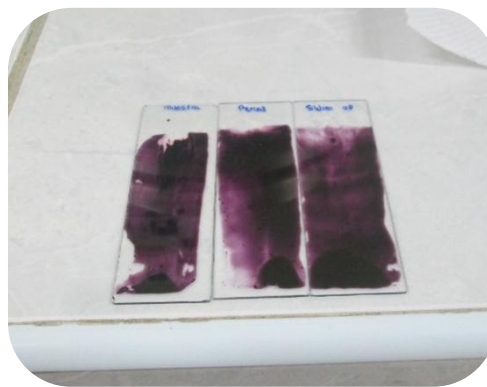
Anexo 10: Fotografías preparado y fijado de muestras espermáticas de alpaca para su posterior evaluación.



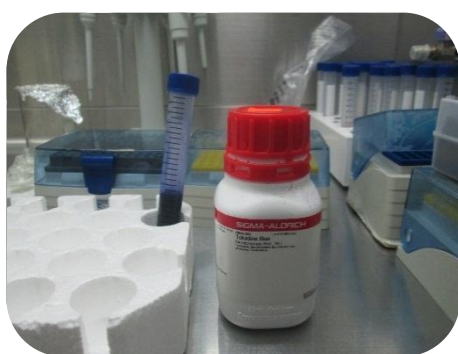
A. Preparación de medios.



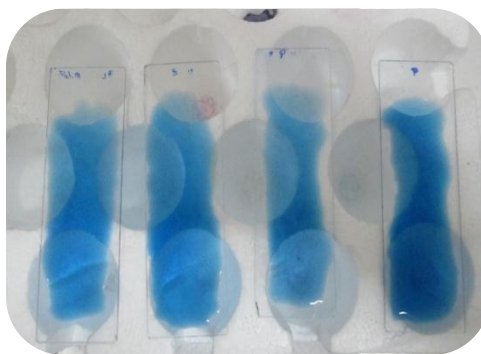
B. Solución Eosina- Nigrosina.



C. Frotis en lámina para evaluar vitalidad.



D. Solución Azul de Toluidina.



E. Fijación de muestra con Azul de Toluidina

Anexo 11: Matriz de consistencia

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
Efecto de los procedimientos de separación sobre la integridad del DNA espermático de Vicugna Pacos “alpaca”, Ayacucho 2017.	¿En qué medida los procedimientos de separación alteran la integridad del DNA espermático de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”?	<p>General: Evaluar el efecto de los procedimientos de separación sobre la integridad del DNA espermático en alpacas previo a la Fertilización <i>In Vitro</i> (FIV).</p> <p>Específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Evaluar los parámetros fisiológicos de motilidad, vitalidad, integridad de la membrana plasmática y concentración de espermatozoides seminales post descongelación y luego del proceso de separación espermática en alpacas. 2. Evaluar la integridad del DNA de espermatozoides seminales post descongelación luego de la separación espermática por Swim up y Gradiente de Percoll, utilizando la Prueba del Azul de Toluidina. 	<p>2.1. Antecedentes. 2.2. Reproducción asistida en Camélidos Sudamericanos. 2.3. Criopreservación de espermatozoides en técnicas de reproducción Asistida. 2.4. Características del semen de alpaca 2.5. Evaluación de la función espermática. 2.6. Técnicas de separación espermática. 2.7. DNA del espermatozoide. 2.8. Orígenes de la fragmentación en el DNA espermático. 2.9. Técnicas para evaluar el daño en el DNA espermático.</p>	<p>H₁: Los procedimientos de separación espermática alteran la integridad del DNA de los espermatozoides de alpaca.</p> <p>H₀: Los procedimientos de separación espermática no alteran la integridad del DNA de los espermatozoides de alpaca.</p>	<p>Variable independiente: -Procedimientos de separación espermática.</p> <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Swim up. • Gradiente de Percoll. <p>Variable dependiente - Integridad del DNA espermático.</p> <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Parámetros espermáticos • Grado de condensación del DNA espermático según coloración: -Azul (sin alteración). -Violeta claro (algún grado de descondensación). -violeta oscuro (alto grado de descondensación). 	<p>Muestra biológica Pajillas de semen de alpaca.</p> <p>Tamaño muestra: Grupo experimental: 15 pajillas de alpaca. Control: semen descongelado. Tratamiento 1: Swim up Tratamiento 2: Gradiente de Percoll</p> <p>Control positivo: Semen fresco de alpaca.</p> <p>Método: Básica – Experimental</p> <p>Análisis estadístico Prueba de normalidad mediante Kolmogorov-Smirnov, ANOVA y Tukey para datos con distribución normal, datos sin distribución normal prueba de Kruskal-Wallis.</p>