

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Establecimiento *in vitro* de células espermatogoniales  
de *Vicugna pacos* “alpaca” Ayacucho - 2016.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGO, EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. PILLACA POMA, Marcial Antonio**

**ASESOR:**

**Dr. MUJICA LENGUA, Fidel Rodolfo**

**AYACUCHO - PERÚ**

**2023**

A mis padres Maximiliana Poma Cáceres  
y Raúl Pillaca Medrano.

A mis abuelos y hermanos Irma, Alfredo,  
Rene, Roger, Esther y Rubén.

A Rockín y a todos los que ya no están,  
cuyas presencias fueron muy importantes  
e incondicionales.

## **AGRADECIMIENTOS**

Especial agradecimiento a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Alma Mater de mi formación profesional y a todos sus docentes por su gran labor de brindar conocimientos y compartir experiencias.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología y a la Especialidad de Biotecnología, por la grata acogida en sus ambientes.

Al Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua docente principal de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por su apoyo esmerado en la asesoría, ejecución y revisión del presente trabajo.

A la Dra. Martha Esther Valdivia Cuya, del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, agradecido por su gentileza al procurar de material necesario.

Por su apoyo incondicional en el análisis de datos al Mg. Reynán Cóndor Alarcón, docente auxiliar de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Al Dr. Luis Arturo Rodríguez Zamora, docente asociado de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi agradecimiento por su disposición a la accesibilidad de equipos necesarios.

De igual manera al Dr. Jaime Antonio Ruiz Béjar, docente principal de la Universidad Nacional de Huancavelica, por la misma disposición en facilitar el uso de los equipos en el laboratorio a su cargo.

Al Dr. Pedro Ayala Gómez y a la Mg. Sonia Palomino Felices, miembros de la comisión de jurados y docentes de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por su apoyo en la revisión y corrección del presente trabajo de tesis.

A los trabajadores del Matadero Municipal de Huancavelica, por su gentileza y disposición al acceso y obtención de las muestras de testículos de alpaca.

A todos los amigos y compañeros que de algún modo me apoyaron de manera desinteresada en las distintas etapas de la ejecución de la tesis.

Agradecimiento a los que propiciaron e hicieron posible el Convenio de Subvención de Tesis de Pregrado N°006-2017-OGII-VRI-FOCAM-UNSCH del Vicerrectorado de Investigación, convenio por el cual fue posible la financiación y ejecución del presente trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLA	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Bases teóricas	6
2.2.1. Importancia socioeconómica de la alpaca	6
2.2.2. Fisiología reproductiva del macho y sus limitaciones	7
2.2.3. Avances en la aplicación de biotecnologías reproductivas	8
2.2.4. Diversidad de células testiculares en mamíferos	9
2.2.5. Aislamiento de espermatogonias por digestión enzimática	11
2.2.6. Espermatogénesis en mamíferos no primates	12
2.2.7. Espermiogénesis	13
2.2.8. Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de espermatogonias	13
2.2.9. Condiciones para el cultivo <i>in vitro</i> de espermatogonias	14
2.2.10. Biomarcadores e identificación de SSC	16
III. MATERIALES Y METODOS	17
3.1. Ubicación	17
3.2. Población y muestra	17
3.3. Metodología	17
3.3.1. Obtención de las muestras y aislamiento de espermatogonias	17
3.3.2. Determinación de la concentración, recuento total y viabilidad de espermatogonias	19
3.3.3. Cultivo de células espermatogoniales	19
3.3.4. Tripsinización de las células espermatogoniales en cultivo	20
3.4. Diseño experimental	21
3.5. Análisis estadístico	21
IV. RESULTADOS	23

V.	DISCUSIÓN	37
VI.	CONCLUSIONES	41
VII.	RECOMENDACIONES	43
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
	ANEXOS	49

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Población de ganado alpaquero en el Perú según departamento.	7
Tabla 2. Condiciones de Temperatura y concentración de SFB para el cultivo in vitro de células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	21
Tabla 3. Concentración y viabilidad de las células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” después de los aislamientos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	25
Tabla 4. Concentración total de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” después de siete días de cultivo a 32°C ( $\times 10^6$ cel/ml). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	27
Tabla 5. Concentración total de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” después de siete días de cultivo a 38°C ( $\times 10^6$ cel/ml). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	28
Tabla 6. Concentración total de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” después de 15 días de cultivo a 32°C ( $\times 10^6$ cel/ml). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	32
Tabla 7. Concentración total de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” después de 15 días de cultivo a 38°C ( $\times 10^6$ cel/ml). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Pellet de tejido testicular de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” después del aislamiento celular de espermatogonias. Lab. de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	18
Figura 2. Cultivo de células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” en multiplacas de poliestireno medio de cultivo DMEM. Lab. de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	19
Figura 3. Cultivo de células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” en atmosfera húmeda con 5 % de CO <sub>2</sub> . Lab. de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	20
Figura 4. Células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” teñidas con colorante de exclusión azul de tripán (no viables, flechas negras), y las no coloreadas (viables, flechas rojas). Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	25
Figura 5. Células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” recién cultivadas en medio DMEM suplementado con antibióticos. Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	26
Figura 6. Formación de agregados celulares de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” en siete días de cultivo a 38°C y 5% de SFB. Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	29
Figura 7. Formación de agregados celulares de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” en cultivo a 32°C y 2,5% de SFB a los siete días. Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	30
Figura 8. Células somáticas (flechas rojas) en el cultivo de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” a 38°C con 10% de CO <sub>2</sub> . Células espermatogoniales (flechas negras). Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	31
Figura 9. Colonias de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” a los 15 días de cultivo a 38°C y 2,5% de SFB. Observación a 400	33



aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

Figura 10. Colonias de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" a los 15 días de cultivo a 32°C con 2,5% de SFB. Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017. 34

Figura 11. Interacción de la temperatura y SFB, que influyen en la sobrevivencia de las células totales de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca", después de siete días de cultivo. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018. 35

Figura 12. Interacción de la temperatura y SFB que influyen en la sobrevivencia de las células totales de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" después de 15 días de cultivo. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018. 36

## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Viabilidad de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” expresado en porcentaje, después de siete días de cultivo a 32 °C. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	51
Anexo 2. Viabilidad de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” expresado en porcentaje después de siete días de cultivo a 38 °C. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	52
Anexo 3. Viabilidad de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” expresado en porcentaje después de 15 días de cultivo a 32 °C. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	53
Anexo 4. Viabilidad de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” expresado en porcentaje después de 15 días de cultivo a 38 °C. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	54
Anexo 5. Prueba de hipótesis para concentración total de células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” mediante el análisis de varianza después de los primeros siete días de cultivo, existe diferencia significativa dentro de las dos variables, así como también hay interacción entre ambas ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	55
Anexo 6. Información agrupada por el método de Tukey con un nivel de confianza de 95 %, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Siete días de cultivo de espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	56
Anexo 7. Prueba de hipótesis para concentración total de células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” mediante el análisis de varianza después de 15 días de cultivo, existe diferencia significativa dentro de las dos variables, así como también hay interacción entre ambas ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	57
Anexo 8. Información agrupada por el método de Tukey con un nivel de confianza de 95 %, son significativamente diferentes las medias que no comparten una letra. 15 días de cultivo de	58

	espermatogonias de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.	
Anexo 9.	Antibióticos para suplementar 250 ml de medio de cultivo DMEM. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2017.	59
Anexo 10.	Preparación de solución Stock de Penicilina. (Penicilina G actividad de 1,668 UI/mg).	60
Anexo 11.	Adición de Gentamicina y estreptomina para 250 ml de medio de cultivo DMEM.	61
Anexo 12.	Adición de enzimas para 250 ml de medio de cultivo DMEM. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2017.	62
Anexo 13.	Preparación de enzima DNasa I.	63
Anexo 14.	Descripción de medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle modificado de Dulbecco) SIGMA D5796 – 500 ml.	64
Anexo 15.	Descripción de SFB SIGMA F4135 – 100 ml.	65
Anexo 16.	Testículos de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” sacrificados en el Matadero Municipal de Huancavelica. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	66
Anexo 17.	Procedimiento para el aislamiento de espermatogonias. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.	67
Anexo 18.	Matriz de consistencia.	68

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue aislar y cultivar *in vitro* células espermatogoniales de *vicugna pacos* "alpaca" durante 15 días a partir de muestras testiculares de animales beneficiados en el Matadero Municipal de Huancavelica, cuyas edades oscilaron de entre 2 y 3 años aproximadamente, el tiempo transcurrido desde la obtención de las muestras hasta el procesamiento en el laboratorio fue de aproximadamente ocho horas. El procesamiento para aislar las células se inició con disgregaciones mecánicas de descapsulación y trituración del tejido testicular y seguidamente sometido a digestión enzimática utilizando cuatro enzimas: colagenasa, tripsina, hialuronidasa y DNAsa I. El promedio de concentración celular obtenido fue de  $25,5 \times 10^6$  cel/ml y las viabilidades por encima de 93 %. Fueron cultivados en multiplacas en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, por sus siglas en inglés) suplementado con antibióticos, en una incubadora de atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Las variables de estudio fueron las diferentes concentraciones de Suero Fetal Bovino (SFB) al 2,5 %, 5 %, 10 %, 20 % y un grupo control al 0 %, así mismo dos temperaturas: 32 °C y 38 °C. A los siete días de cultivo el número de células espermatogoniales disminuyeron, y sólo un grupo de ellas se mantenían viables y con indicios de proliferación mediante la formación de pequeñas colonias. Al finalizar los 15 días La condición óptima de cultivo fue a la temperatura de 38 °C con una concentración de SFB al 2,5 %, en este se observó el incremento de las colonias de espermatogonias. Concentraciones de SFB altas favorecieron el crecimiento de células somáticas.

**Palabras clave:** alpaca, células espermatogoniales, cultivo *in vitro*, SFB.

## I. INTRODUCCIÓN

Los rápidos avances en las biotecnologías reproductivas han permitido mejorar la eficiencia reproductiva en los animales, así como el avance de su mejoramiento genético, contribuyendo no sólo al desarrollo de la producción ganadera, sino que también a la conservación de especies en peligro de extinción y el almacenaje de los recursos genéticos. Cada vez se disponen de técnicas e instrumentos más eficaces que permiten el desarrollo e innovación. La producción ganadera de alpacas no es ajena a estos avances biotecnológicos, actualmente distintos grupos de investigación vienen realizando experimentos básicos y aplicados, con el fin de estandarizar metodologías que permitan la mejora de la producción. La aplicación de las herramientas biotecnológicas en las alpacas y en los Camélidos Sudamericanos (CSA) en general son justificados por las limitaciones reproductivas que presentan éstas, tales como las características seminales como baja concentración de espermatozoides, alto porcentaje de espermatozoides anormales, filancia extrema y un plasma seminal con alta viscosidad que dificulta el buen desplazamiento progresivo de los espermatozoides (Casaretto et al., 2012), además se observan problemas de malformaciones congénitas del aparato reproductor que de no llevar un control estricto, pone en riesgo la eficacia de su productividad. Estos defectos van desde testículos que presentan hipoplasia testicular, criptorquidismo y ectopia (Sumar, 1983). Las biotecnologías aplicadas a la reproducción apuntan a resolver estas limitaciones, las más utilizadas son la inseminación artificial y la transferencia de embriones, que son herramientas ya conocidas para el mejoramiento genético, permiten la diseminación masiva de características deseables y mejoran la producción, a esto se suman nuevas técnicas que hacen el esfuerzo de afianzar las biotecnologías reproductivas, una de ellas se centra en el aislamiento y cultivo de células madre espermatozonales (SSC). La disgregación mediante hidrólisis enzimática es una técnica efectiva

requerida para liberar las espermatogonias de la matriz extracelular de modo que estén viables y funcionales para luego poder ser estudiadas *in vitro* mediante su cultivo en condiciones que ofrezcan su mantenimiento y proliferación. Estas técnicas a diferencia de otras ofrecen nuevas ventajas como la disposición de poder estudiarlas y manipularlas, restablecer la fertilidad masculina, dilucidar las cuestiones básicas sobre el funcionamiento de las células madre, como también realizar modificaciones genéticas empleando vectores, y la aplicación de técnicas de trasplante.

### **Objetivo general**

Evaluar las condiciones para cultivar *in vitro* células espermatogoniales de *Vicugna pacos* aisladas de testículo.

### **Objetivos específicos**

1. Aislar espermatogonias de alpaca por digestión enzimática.
2. Cultivar *in vitro* las espermatogonias aisladas de alpaca.
3. Evaluar la influencia de la temperatura y el suero fetal bovino en el cultivo de espermatogonias *in vitro*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

(Reyes, 2018) realizó comparaciones posdescongelamiento del porcentaje y calidad de SSC de alpaca, previamente proliferadas *in vitro* y otras proliferadas después de la criopreservación, para lo cual aisló células testiculares mediante digestiones enzimáticas. Un grupo de suspensión celular fue previamente cultivado *in vitro* para luego ser criopreservado y posteriormente descongelado mediante un protocolo termocontrolado lento; otro grupo fue criopreservado inmediatamente después del aislamiento y que después del descongelamiento fuera cultivado. Las células fueron evaluadas mediante citometría de flujo con marcadores específicos para células madre espermatozonales (DBA-FITC) y Flow Collect Mitopotential Red Kit para la calidad celular (potencial mitocondrial activo y apoptosis). Obtuvo como resultado que el porcentaje de SSC en las muestras previamente proliferadas a la criopreservación fue de  $6,3 \% \pm 1,2$ , el cual fue mayor a las que fueron proliferadas después de la criopreservación el cual fue de solo  $1,5 \% \pm 0,3$  ( $p < 0,05$ ). En cuanto a la calidad de SSC se obtuvieron mejores resultados también en las previamente proliferadas, el cual fue de un 72,6 % de células con potencial mitocondrial activo (PMA), 7,8 % de células apoptóticas y 8,1 % de células en apoptosis temprana, a diferencia de las que primero fueron criopreservadas y posteriormente proliferadas en el cual el porcentaje de PMA fue de 59,7 %, y valores de 21,3 % de apoptosis y 11,5 % de apoptosis temprana, que difieren significativamente entre ambos. El autor concluye que el cultivo de células testiculares de alpaca previo a la criopreservación permite conservar un mayor porcentaje de SSC que la criopreservación sin cultivo previo; asimismo conserva la calidad de las SSC a diferencia de las células criopreservadas sin cultivo. En otro trabajo aislaron SSC de testículos de alpaca adultos y evaluaron su proliferación en cultivo *in vitro*. En dicho estudio evalúan el efecto de dos medios

de cultivos sobre la proliferación de las SSC, para lo cual trabajaron con el medio DMEM y el medio STEMPRO. Ambos medios de cultivo se complementaron con L-glutamina, solución de aminoácidos esenciales MEM, penicilina, tomicina, insulina-sodio selenito-transferrina, ácido pirúvico, ácido láctico, albúmina de suero bovino al 0,5 %, suero fetal bovino al 1 % y 1 % de suero de leche humana y se cultivaron en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>, las muestras se analizaron a los 14 y 21 días, para evaluar la proliferación y el estado de diferenciación de las SSC utilizaron el FITC-DBA por citometría de flujo, en el cual las catalogadas como SSC fueron los que fueron marcados como fuertemente positivo (sDBA+), mientras los débilmente positivos (wDBA+) fueron consideradas como células en diferenciación temprana, en tanto las que no fueron marcados fueron considerados como células ya diferenciadas (DBA negativo). Antes del cultivo el 4,16 % de las células fueron identificadas como SSC, el 37,61 % como wDBA +, mientras que el 54,12 % fueron identificados como DBA-. A los 14 días del cultivo celular, se observó que en el medio DMEM el 42,28 % eran SSC, 44,68 % wDBA + y 11,07 % DBA-, mientras que en el medio STEMPRO el 47,09 % de SSC, 32,57 % wDBA + y 18,48 % DBA-. Y ya al término del cultivo; Después de 21 días, las SSC representaban el 38,66 %; 52,78 % wDBA y 7,65 % como DBA-, esto en el medio DMEM mientras que en el medio STEMPRO el 47,92 % fue catalogado como SSC, el 44,20 % wDBA + y finalmente el 4,93 % como DBA-. Los autores observan que existe una diferencia significativa entre el número de SSC al inicio del cultivo y los SSC después del cultivo, así como también entre las células DBA- y finalmente sugieren que los 2 medios de cultivo son apropiados para La proliferación in vitro de SSC de alpacas (Valdivia et al., 2019).

Suarez (2020) cultivó SSC de alpaca en presencia de la matriz extracelular gelatina, y otra en presencia de la molécula DBA, evaluó cuál de estos métodos provee un mayor soporte para la proliferación de las SSC y para este fin primero obtuvo suspensiones celulares que luego del aislamiento pasaron por el proceso de purificación mediante la técnica de gradientes de Percoll y evaluó las SSC marcándolos con DBA - FITC por Microscopía de Fluorescencia (MF) y Citometría de Flujo (CF), obtuvo porcentajes de SSC post Percoll de 49,68 ± 10,9 % por MF y 83,72 ± 8,5 % por CF, los cuales mostraron ser mucho mayor a sus respectivos iniciales de 22 ± 5,45 % (MF) y 46,52 ± 17,84 % (CF), siendo esta diferencia estadísticamente significativa por ambas metodologías, Las células que obtuvo antes y después de la purificación fueron puestos a cultivar en placas normales



(Grupo control y Grupo Percoll) y en placas cubiertas con gelatina y DBA (Grupo gelatina y Grupo DBA). Al día tres del cultivo observó la formación de colonias de SSC en todos los grupos de cultivo, excepto en el Grupo control, donde tuvo una mínima formación de colonias. Después al día seis del cultivo estas colonias comenzaron a desaparecer. Al día ocho de cultivo evaluó el porcentaje de SSC en los tratamientos por MF y CF, obtuvo un mayor porcentaje de SSC en el Grupo DBA ( $63,28 \pm 5,61$  % y  $66,9 \pm 10,34$  %) y uno menor para el Grupo Control ( $44,48 \pm 6,34$  % y  $52,60 \pm 23,44$  %), teniendo como porcentajes intermedios al Grupo Percoll ( $52,38 \pm 5,64$  % y  $57,5 \pm 20,2$  %) y Gelatina ( $46,36 \pm 4,14$  % y  $53,05 \pm 17,73$  %). Obtuvo el primer porcentaje por MF y el segundo por CF, y demostró que el Grupo DBA muestra diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos por Microscopía de Fluorescencia. Concluyó que el empleo del método de gradiente de Percoll es adecuado para purificar SSC y que el empleo de la lectina DBA puede permitir la proliferación In vitro de SSC de alpaca.

En otra investigación se estableció un protocolo que permitió enriquecer SSC utilizando gradientes discontinuos de Percoll y desarrolló cocultivos con células de Sertoli. Para tal objetivo primero aisló células espermatogoniales, mediante digestión enzimática, al cual llamó Grupo Control (GC), seguidamente purificó otro grupo de suspensión mediante gradientes discontinuos de Percoll al cual lo denominó Grupo Post Percoll (GPP). Evaluó a las muestras mediante Citometría de Flujo (CF) y Microscopía de Fluorescencia (MF) utilizando el conjugado DBA-FITC con el que identificó a las SSC como el que presentó mayor intensidad de fluorescencia (sDBA+). La evaluación por CF de las muestras y el análisis por MF de las otras restantes demostraron una mayor media porcentual de la población de SSC en el GPP en comparación a la del GC, observando con esto el enriquecimiento de las SSC mediante la técnica de percoll. Estas suspensiones celulares iniciales (GC y GPP) fueron puestos en cultivo durante ocho días en medio DMEM, llamándose Grupo Cultivo Control (GCC) y Grupo Cultivo Post Percoll (GCP) que fueron evaluados por CF y MF, observando un incremento de la población de SSC en los post - cultivos. El análisis por citometría de flujo no mostró diferencia significativa entre los grupos iniciales y sus respectivos cultivos (GC:  $37,02 \pm 29,21$  % vs GCC:  $44,80 \pm 19,63$  % y GP:  $62,46 \pm 33,15$  % vs GCP:  $53,16 \pm 14,49$  %); situación contraria observó en la evaluación por microscopia de fluorescencia que sí mostró un incremento significativo de la población sDBA+ en los cultivos (GC:  $13,33 \pm 18,88$  % vs GCC:  $50,36 \pm 8,07$  % y GP:  $30,85 \pm 21,98$  %

vs GCP:  $60,46 \pm 7,31$  %). Seguido a esta experimentación también aisló células de Sertoli empleando la lectina DSA para luego cultivarlo en medio DMEM suplementado con 10 % de SBF, llegado a la confluencia, las cocultivar con las SSC enriquecidas en medio DMEM. Observó que en los primeros tres días una rápida proliferación de las SSC y la formación de quistes sincitiales luego de aproximadamente dos semanas; este aspecto no pudo observar en los cultivos de SSC enriquecidos que no fueron sometidos al cocultivo. Concluyó que el empleo de la técnica de gradientes de Percoll es adecuado para el enriquecimiento de SSC, y que el cocultivo con células de Sertoli pudo promover la proliferación de las SSC en cultivos de corto plazo (Sulca, 2021).

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Importancia socioeconómica de la alpaca**

Se estima que existen aproximadamente ocho millones de CSA a nivel mundial, de ellos, el 54 % se encuentran en el Perú donde es posible encontrar las cuatro especies: Llama, Alpaca, Vicuña y Guanaco (Foronda et al., 2004). En los resultados del IV Censo Nacional Agropecuario muestra que el Perú tiene una población total de 3 685 516 cabezas, de los cuales 2 909 212 corresponde a la raza Huacaya y 442 013 a la raza Suri y según su localización aproximadamente el 55 % de las alpacas se encuentran en el departamento de Puno; y el resto se localiza en 12 departamentos: Cusco, Apurímac, Huancavelica, Arequipa, Ayacucho, Ancash, Cajamarca, Junín, Lima, Pasco, Moquegua y Tacna (INEI, 2012). El Perú posee la ventaja de ocupar el primer lugar en la población de alpacas, su crianza representa un componente fundamental en la economía de los pobladores altoandinos donde no es posible la crianza de otros animales domésticos y tampoco se puede llevar a cabo la agricultura de desarrollo y lucha contra la pobreza de los pequeños productores que los crían, constituye el 80 % de los ingresos económicos de 82 459 productores alpaqueros, principalmente situados en Puno, Arequipa, Cusco, Huancavelica, Ayacucho, Pasco, Apurímac, Junín, Tacna, Moquegua y Lima (sierra), asimismo el 50 % de los ingresos de pequeños criadores proviene de la venta de fibra, el 45 % de la venta de carne y el 5 % restante de la venta de reproductores y otros. Durante el 2020, la producción nacional de fibra alcanzó 4 352 toneladas y de carne alrededor de 12 363 toneladas (MIDAGRI, 2022).

**Tabla 1.** Población de ganado alpaquero en el Perú según departamento

<b>DEPARTAMENTO</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Puno</b>	1 459 903
<b>Cusco</b>	545 454
<b>Arequipa</b>	468 392
<b>Huancavelica</b>	308 586
<b>Ayacucho</b>	230 910
<b>Apurímac</b>	219 113
<b>Pasco</b>	145 687
<b>Moquegua</b>	129 250
<b>Junín</b>	61 398
<b>Tacna</b>	59 905
<b>Lima</b>	39 046
<b>Huánuco</b>	5 580
<b>La Libertad</b>	5 098
<b>Ancash</b>	5 066
<b>Cajamarca</b>	1 370
<b>Lambayeque</b>	610
<b>Piura</b>	98
<b>Ica</b>	50

*Fuente:* IV Censo Nacional Agropecuario. INEI. 2012.

### **2.2.2. Fisiología reproductiva del macho y sus limitaciones**

Los CSA, en general presentan características reproductivas propias y diferentes a la de otros rumiantes, la actividad sexual ocurre solamente durante la estación lluviosa que comprende de diciembre a marzo, tiempo en el cual las condiciones climáticas son favorables, y hay una mayor disponibilidad de forrajes verdes, que garantizan la buena nutrición y la condición física de los animales, en consecuencia las pariciones también ocurrirán en la estación lluviosa del año siguiente, garantizando así la supervivencia de los nacidos (Huanca, 1996). Anatómicamente los testículos están presentes desde el nacimiento, a los seis meses descienden al escroto, son normalmente del mismo tamaño siendo el epidídimo pequeño y pegado al testículo y con un conducto deferente con 35 a 40 cm de longitud y un diámetro de 2 a 3 mm (Bravo et al., 2000). Poseen como glándulas anexas a la próstata en forma de H que son encargadas de producir secreciones que ayudan a la capacidad de movilizarse al espermatozoide, dos glándulas bulbouretrales ovoides de 1 cm de diámetro, y carecen de vesículas seminales (T. Huanca, 1996; Sumar, 1983). El pene es fibroelástico y en erección

llega a medir de 35 a 40 cm, con forma de “S”, y el glande en forma de gancho curvo que le permite pasar al cérvix y depositar el semen en el útero, el prepucio tiene forma triangular y está orientado hacia atrás, pero cuando el pene entra en erección los músculos protractores lo desvían hacia adelante para que la cópula sea posible (Huanca, 1996), la pubertad llega cuando el pene comienza a separarse progresivamente de la mucosa prepucial, momento en el cual también comienza la producción de testosterona, aproximadamente el 8 % de alpacas de un año de edad comienzan con la liberación pene – prepucial, a los dos años el 70 % y a los tres años el 100 % de los machos están listos para la reproducción (Huanca, 1996).

Los machos, así como las hembras, presentan algunas limitaciones reproductivas relacionadas con las malformaciones congénitas del aparato reproductivo que son desfavorables para la reproducción, y limitan su gran productividad. Los principales defectos descritos en testículos son la hipoplasia testicular (9,9 %), criptorquidismo (5,6 %) y ectopia (2,5 %) (Sumar, 1983) a esto sumamos las características seminales limitantes particulares propias, tales como baja concentración de espermatozoides, alto porcentaje de espermatozoides anormales, extrema filancia y un plasma seminal con alta viscosidad que dificulta el desplazamiento progresivo y veloz de los espermatozoides (Casaretto et al., 2012), por lo que es necesario realizar un examen completo reproductivo para una adecuada selección de machos reproductores.

### **2.2.3. Avances en la aplicación de biotecnologías reproductivas**

A la actualidad se dispone de varias tecnologías reproductivas desarrolladas o en proceso de desarrollo a las cuales se le puede agrupar en tres grupos: Primero están las que pueden denominarse “clásicas”, que se encuentran bien desarrolladas en animales domésticos, de compañía, y en humanos, como también se están aplicando a especies silvestres desde hace ya varios años, estas tecnologías vienen a ser la obtención y congelación de semen; inseminación artificial; obtención, conservación y transferencia de embriones, y finalmente la fecundación *in vitro*. Luego están aquellas denominadas “nuevas” biotecnologías: Preselección de sexo mediante separación de espermatozoides X e Y; microinyección de espermatozoides y congelación de oocitos, maduración *in vitro* de las mismas, estas tecnologías están en desarrollo en animales domésticos, y tienen un gran potencial en otras especies. Finalmente se puede hablar de tecnologías “futuras” las cuales están en una etapa experimental en animales de

laboratorio o domésticos y que, posiblemente también sean de utilidad en la conservación de especies amenazadas; las tecnologías de futuro más relevantes son la obtención (aislamiento), conservación (cultivo), trasplante de espermatogonias, Espermatogénesis *in vitro* y la clonación por transferencia de núcleo (Roldan & Garde, 2004).

La aplicación de alguna de estas tecnologías reproductivas en alpacas ha tenido un avance lento supeditado casi exclusivamente a esfuerzos individuales y aislados. Requiriendo siempre la mejora del conocimiento sobre la fisiología reproductiva de esta especie, tal es así que se propusieron como técnicas de reproducción asistida para el mejoramiento genético a la inseminación artificial, transferencia de embriones y fertilización *in vitro*, los cuales han tenido un lento desarrollo y hasta a veces fueron vistas con cierto recelo por los resultados poco alentadores (W. Huanca et al., 2007). Por otro lado, recientemente algunos grupos de investigación han dirigido su línea a otras alternativas como el aislamiento de SSC, su identificación molecular y cultivo, con el fin de ampliar las propuestas biotecnológicas y desarrollar herramientas que permitan el progreso genético de los camélidos domésticos y sirva como una primera fase para la aplicación de biotecnologías reproductivas en los camélidos no domésticos (Huamaní, 2018; Mujica, 2018; Valdivia et al., 2019).

#### **2.2.4. Diversidad de células testiculares en mamíferos**

##### **a) Células de Sertoli**

Son células con extensiones apicales y laterales grandes que se fusionan por medio de uniones herméticas, que le permite envolver a las células espermatogoniales contiguas y ocupar los espacios entre éstas, esta conformación le permite dar una organización estructural a los túbulos porque se extienden por todo el espesor del epitelio seminífero (Ross & Pawlina, 2004), las células de Sertoli son importantes para la formación de los testículos y la espermatogénesis, Mantienen contacto directo con las células germinales, y controlan el entorno ambiente dentro de los túbulos seminíferos por lo que intervienen activamente en la progresión de las células germinales a espermatozoides (Griswold, 1998).

Existen dos maneras en la que se da la división celular de las SSC, dando lugar cada uno de ellos a diferentes destinos, El primer tipo da lugar a dos células madre que van a conservar su carácter pluripotente, también conocido como una división simétrica, y el segundo tipo da lugar a una célula madre y a una célula

susceptible a entrar en el proceso de diferenciación, esta división es conocida también como asimétrica (Stewart et al., 2008), por lo que El número de células madre presentes al inicio del proceso de diferenciación, puede mantenerse estable cuando la homeostasis de cada célula madre sufre divisiones asimétricas o cuando las divisiones son simétricas dentro de un pool celular (Watt & Hogan, 2000).

#### **b) Células mioides peritubulares**

Son consideradas como células musculares lisas organizadas en multicapas, capaces de poder diferenciarse en respuesta a una mayor producción de andrógenos cuando inicia la pubertad su función es dar soporte estructural y contribuir a la contracción de los túbulos seminíferos (Palombi et al., 1992) secretan algunas sustancias componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento, algunos de los cuales estimulan en forma paracrina la secreción de las células de Sertoli, expresan proteínas de verdaderas células musculares lisas tales como  $\alpha$ -isoactina y miosina y forman prominentes haces de microfilamentos (Fernandez, 2008). La función contráctil de estas células es responsable de la contracción de los túbulos seminíferos para el transporte de espermatozoides y fluido testicular, y por lo menos parcialmente, para la liberación de espermatozoides durante la espermiación (Virtanen et al., 1986).

#### **c) Células de Leydig**

Llamadas células intersticiales, se encuentran normalmente dentro del tejido conectivo que rodea los túbulos seminíferos (donde residen las células de Sertoli) y son encargadas de producir hormonas esteroideas, siendo de gran importancia en el proceso de espermatogénesis (Hafez & Hafez, 2002), secretan testosterona desde las primeras etapas de la vida fetal, El producto de la secreción primaria de las células de Leydig, la testosterona, es responsable ya sea directa o indirectamente, de la diferenciación embrionaria a lo largo de las líneas masculinas de los genitales externos e internos del desarrollo sexual secundario masculino en la pubertad y del mantenimiento de la libido y la potencia en los machos adultos (Roos & Pawlina, 2004).

#### **d) Células Madre Espermatogoniales (SSC)**

Las SSC (del inglés: *Spermatogonial Stem Cell*) son células madres adultas ubicadas en los testículos, en la periferia de los túbulos seminíferos y bordeados por las células de Sertoli, tienen su origen durante el desarrollo embrionario a partir de las células madre primordiales los cuales a su vez derivan de las células

epiblasticas pluripotentes (Ellen y Herman, 2007), cumplen funciones de autorrenovación, proliferación y la producción de células hijas diferenciadas (Oatley et al., 2004), responsables en última instancia de la formación de espermatozoides (Aponte, 2015), después del nacimiento se mantienen quiescentes hasta la etapa de la madurez sexual donde empiezan su diferenciación, y formación de espermatozoides, esto tendrá continuidad durante toda la vida del individuo (Ellen & Herman, 2007), mantienen su potencialidad gracias al nicho testicular en el que se encuentran, el cual está compuesto principalmente por células adyacentes diferenciadas (células de Sertoli), y por una matriz extracelular que las rodea y aporta factores solubles e interacciones importantes para su correcto desarrollo. Además, se encuentra asociado al sistema vascular y a las células del intersticio, ya que muchos factores son transportados por la sangre o por las células intersticiales (incluidas las células de Leydig) y posibilitan el mantenimiento y la diferenciación de las SSC (Hofmann, 2008).

#### **2.2.5. Aislamiento de espermatogonias por digestión enzimática**

Las SSC representan solo del 0,01 al 0,03 % de total de células testiculares de un individuo adulto (Nagano et al., 2003), por lo que la técnica adecuada para su obtención es la disgregación enzimática. Para lograr la disociación tisular es necesario romper la malla de proteínas que forman la matriz extracelular que las mantiene unidas, esto mediante procesos que separen las moléculas proteicas y manteniendo la viabilidad celular, la técnica de digestión enzimática se basa en el uso de enzimas en dos etapas de digestión con procedimientos intermedios de lavados y centrifugaciones, en un medio buffer o en el medio de cultivo, manteniendo siempre la temperatura ideal constante, para finalmente obtener células mucho más purificadas y disgregadas; las enzimas que se utilizan son: colagenasa, tripsina hialuronidasa y DNAsa (Izadyar et al., 2003). La misma metodología fue empleada con éxito en la obtención de espermatogonias de alpaca salvo ligeras variaciones en el procedimiento (Huamaní, 2018), y posteriormente fue posible su cultivo *in vitro*, crio preservación, caracterización y expresión de biomarcadores específicos, cultivo en presencia de matrices extracelulares y cocultivos con células de Sertoli (Mujica, 2018; Reyes, 2018; Suarez, 2020; Sulca, 2021; Valdivia et al., 2019). Estos avances en el estudio del comportamiento *in vitro* de espermatogonias de alpaca servirán de ayuda y soporte a las nuevas biotecnologías reproductivas.

### 2.2.6. Espermatogénesis en mamíferos no primates

La espermatogénesis comienza en los túbulos seminíferos de los testículos en la pubertad, es un proceso de divisiones sucesivas por el cual las células madre espermatogoniales (diploides) producen espermatozoides maduros (haploides) (Hess & de Franca, 2009), para esto se requiere de una eficiente regulación del proceso en los túbulos seminíferos debido a que se necesita de un constante suministro de espermatogonias para garantizar la continua producción de espermatozoides (Caires et al., 2010), Este proceso se divide en tres fases diferenciadas: proliferativa o mitótica, meiótica y espermiogénesis (Riboldi, 2012).

#### a) Fase mitótica

El modelo mejor estudiado es el murino, en el cual las espermatogonias denominadas  $A_s$  (espermatogonias de tipo A simples) son las consideradas células madre espermatogoniales, ya que estas al hacer la división, originan dos nuevas  $A_s$ , o también pueden originar las llamadas espermatogonias  $A_{pr}$ , que son las células destinadas a originar el resto de células que conformarán todo el proceso de la espermatogonia, así, cada célula  $A_{pr}$  dará lugar, a su vez, dos nuevas células unidas por un puente intercelular, el cual se mantendrá en su descendencia, para finalmente originar las espermatogonias  $A_{al}$  o espermatogonias de tipo A alineadas (Huckins, 1971).

En el estadio VIII están presentes las espermatogonias  $A_s$ ,  $A_{pr}$  y  $A_{al}$ , esta última en un menor número, sin embargo, a partir del estadio X, comienzan a proliferar de manera que las dos primeras permanecen más o menos constantes mientras que las espermatogonias alineadas aumentan en número. Alrededor de los estadios II-III, la proliferación se detiene y las células entran en fase G1-G0. En los estadios VII-VIII, la mayoría de las  $A_{al}$  comienzan una diferenciación al tipo espermatogonia  $A_1$ , el cual entra en la fase S del ciclo celular, y en el estadio IX se divide a  $A_2$ , para luego originar las  $A_3$ ,  $A_4$ , indiferenciada y B (de Rooij, 1998).

Por otro lado, en el caso de bovinos se sugiere una clasificación diferente para las espermatogonias tipo A, a las cuales se les denomina en BSC (basal stem cell), ASPC (agregated spermatogonial stem cell) y CSPC (committed spermatogonial precursor cell). Las BSC son células redondas con tres nucleolos irregulares y se podrían comparar con las espermatogonias  $A_s$  y  $A_{pr}$  del modelo murino, las ASPC son células de diferentes tamaños. Las CSPC son las espermatogonias más grandes, presentan un nucleolo central grande, y se corresponden con las espermatogonias  $A_1$ - $A_4$  diferenciadas del modelo murino (Izadyar et al., 2003).



## **b) Fase meiótica**

Las células espermatogoniales del Tipo B son las que inician el proceso de la meiosis, el cual está caracterizado por el alejamiento del contacto con la membrana basal de los túbulos seminíferos y la aparición de los cromosomas, estos pasan a convertirse en espermatocitos primarios, luego pasan por numerosas divisiones las cuales originan subetapas que pertenecen a la fase más larga de la profase: leptoteno, zigoteno, paquiteno y diploteno que al final resultan en espermatocitos secundarios, los cuales al dividirse originan a las espermátidas. Esas divisiones resultan en la conversión de células diploides a células haploides, con 23 cromosomas (de Kretser et al., 1998).

### **2.2.7. Espermiogénesis**

También llamada como fase post meiótica, proceso en el cual las espermátidas redondas haploides, se convierten en espermatozoides, mediante un proceso de diferenciación celular el cual implica la elongación del núcleo, la formación del acrosoma en el polo apical, el cual deriva del aparato de Golgi y contiene enzimas necesarias para poder penetrar en la zona pelúcida del ovocito; la reducción del citoplasma y redistribución alrededor de la hélice mitocondrial de la pieza intermedia, el desplazamiento de los centriolos y la formación de la cola a partir del centriolo distal que tiene una función energética por la presencia de mitocondrias que se encuentran rodeando el axonema. Los espermatozoides producidos son finalmente liberados a la luz tubular (Vendrell, 2003).

### **2.2.8. Sistemas de cultivo *in vitro* de espermatogonias**

Varios sistemas de cultivo de SSC han sido descritos, pero hasta principios del año 2000 no existía un sistema de cultivo a largo plazo bien definido y existían muchas deficiencias (de Rooij & Russell, 2000). En 2003 investigadores desarrollaron en bovinos un sistema de cultivo al largo plazo para espermatogonias de tipo A (SSC y sus descendientes directos en vías de diferenciación). Se aisló SSC y las cultivaron a 37 °C y una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub> en Medio Mínimo Esencial (MEM) que contenía distintas cantidades de suero fetal bovino (FCS), lo que favorecía la proliferación celular, y dependiendo de la concentración, favorecía el crecimiento de células germinales o de células somáticas. Este equipo logró con éxito cultivar espermatogonias tipo A y su supervivencia en cultivo (Izadyar et al., 2003).

Otro sistema de cultivo aplicado es el cocultivo con células de Sertoli, en el cual las células espermatogoniales crecen sobre células de Sertoli previamente

cultivadas, estas secretan factores que promueven la autorrenovación, proliferación y diferenciación de las SSC, tales como el GDNF (factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales) (Oatley et al., 2004), el EGF o Factor de Crecimiento Epidermal (Kubota et al., 2004) y la proteína SCF o Stem Cell Factor (Loveland y Schlatt, 1997), también se ha observado que las células de Sertoli pueden producir el IGF-I (Factor de Crecimiento Insulínico), TGF- $\alpha$  o Factor de Crecimiento Transformante Alpha (Tajima et al., 1995), activina A y BMP4 o Proteína Morfogénica Ósea 4 (Nagano et al., 2003).

El cultivo en presencia de moléculas como el DBA y matrices extracelulares (MEC) resultan también ser útil; incentivan la interacción célula – MEC y célula – célula, asemejándose a un sistema *in vivo*, promoviendo así la secreción paracrina de citoquinas y una consecuente mayor supervivencia celular, las moléculas que se utilizan son la laminina, presente en la membrana de los gonocitos y participa en la adhesión de las células de Sertoli (El Ouali et al., 1991), también se emplea la gelatina forma desnaturalizada del colágeno.

Sistemas de cocultivo con células de Sertoli y cultivo en presencia de DBA y matriz de gelatina fueron empleados por primera vez en cultivos de SSC de alpacas, observándose que tanto el cocultivo con células de Sertoli, así como la utilización de DBA y gelatina como matriz, son capaces de promover la proliferación en cultivos de corto plazo (Suarez, 2020; Sulca, 2021). Para tener cultivos de células madre exitosos se debe caracterizarlos adecuadamente; y una forma en la que se comprueba que un cultivo celular contiene SSC es mediante pruebas de funcionalidad mediante el trasplante a testículos de ratón desprovistos de espermatogénesis endógena para así observar si estas células son capaces de producir espermatogénesis (Izadyar et al., 2003). Esto toma mucho tiempo, y mucha experiencia en trasplante y cuidados en la asepsia en cada uno de los pasos; por lo que resulta costoso y difícil de realizar. Lo más práctico consiste en el uso de marcadores moleculares específicos para SSC.

#### **2.2.9. Condiciones para el cultivo *in vitro* de espermatogonias**

En el testículo las SSC se encuentran en un microambiente o nicho testicular, en el cual las condiciones son adecuadas y específicas que le permiten sobrevivir. En dicho ambiente los factores de crecimiento y los nutrientes son óptimos para que éstas células mantengan su estado de no diferenciación (Aponte & Rooij, 2008). En él se mantiene la homeostasis en el tejido, la Evidencia funcional y genética demuestra que el nicho es crítico para las SSC de los mamíferos

(Yoshida et al., 2007), esto es una de las razones por las que se hace difícil su cultivo como células disociadas; aparte que es muy difícil de distinguirlas entre sí a nivel morfológico las SSC y su primera hija comprometida a la vía de la diferenciación, lo que dificulta su aislamiento, cultivo y posterior caracterización (Aponte & Rooij, 2008). Las células de Sertoli ofrecen los nutrientes para las SSC y las células germinales diferenciadas mediante la producción del factor neurotrófico derivado de una línea de células gliales (GDNF) y también del factor de crecimiento fibroblasto básico (bFGF), los cuales son parámetros muy importantes para la autorrenovación de las SSC *in vitro* (Hofmann, 2008; Takashima et al., 2015). Por otro lado las células mioides peritubulares y las células de Leydig generan el factor estimulante de colonias (CSF1) que exhibe un efecto sinérgico con GDNF, Además de generar la CSF1 las células de Leydig también estimulan el desarrollo de las gónadas y mantienen la espermatogénesis a través de la producción de testosterona (Zheng et al., 2014). Todos estos factores de crecimiento y sistemas de señales intercelulares deben de tomarse en cuenta cuando se diseña un sistema de cultivo de células germinales.

Estudios pioneros determinaron que el cultivo en atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y temperatura corporal del animal en estudio, son ideales para el crecimiento y mantenimiento de SSC, además de adicionar concentraciones bajas de SFB al medio de cultivo (Izadyar et al., 2003). El SFB se suele suplementar a los medios de cultivo celular, resulta ser una mezcla compuesta de un variado número de factores como glucosa, proteínas, oligoelementos, vitaminas, hormonas y factores de crecimiento importantes para el mantenimiento, crecimiento y proliferación de las células (Lee et al., 2003). Se tiene cierta discusión sobre su utilización debido a que es un medio cuya composición no es bien definida y que algunos elementos pueden inhibir el desarrollo de las células, así como ser un potencial fuente de contaminación para el cultivo celular (van der Valk et al., 2010). Su adición en concentraciones elevadas en cultivos de SSC induce a un crecimiento acelerado de células somáticas, en tanto en concentraciones bajas permite la proliferación de las SSC (Izadyar et al., 2003). En el cultivo de SSC de alpacas han sido utilizados en concentraciones de 1 % en medio de cultivo DMEM y que junto a otras moléculas adicionados al medio se tuvo resultados positivos en cuanto a su proliferación *in vitro* (Reyes, 2018; Suarez, 2020; Sulca, 2021; Valdivia et al., 2019). El pH adecuado para el cultivo es de 7,4 y está equilibrado por la concentración de bicarbonato presente en la atmosfera de la incubadora el cual deberá fluir en 5 % de CO<sub>2</sub> (Izadyar et al., 2003).

### **2.2.10. Biomarcadores e identificación de SSC**

La identificación de las células madre espermatozonales representa un reto que se tiene en cuanto a su aislamiento, debido a que las SSC son morfológicamente iguales a las primeras generaciones de sus células hijas, lo que hace difícil una identificación morfológica, además dentro de las células germinales la población de SSC representan un pequeño porcentaje, lo que hace su identificación aún más difícil (Aponte y Rooij, 2008). Los biomarcadores son de gran utilidad para una adecuada identificación, estos se pueden categorizar en tres tipos diferentes de biomarcadores: marcadores morfológicos, de superficie celular e intracelulares (Ebata et al., 2008).

Para la identificación de espermatozonias de tipo A en ratas con marcadores morfológicos por Microscopía Nomarski de Interferencia, se toma en cuenta algunos criterios citológicos: células grandes, redondas, con un núcleo esférico; proporción alta núcleo: citoplasma; membrana nuclear fuerte; varios nucléolos relativamente grandes; y muchas inclusiones citoplasmáticas concentradas principalmente en un lado de la célula (van Pelt et al., 1996). Los marcadores de superficie celular son de mayor importancia y brindan mayor confianza en la caracterización de SSC, debido a que su expresión está directamente asociada con la actividad de las SSC se aplican Utilizando métodos inmunológicos, como inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Los biomarcadores intracelulares utilizan métodos moleculares y son mucho más precisos, la PCR convencional, niveles de expresión transcripcional por PCR en tiempo real son alguna de las técnicas más utilizadas. La identificación de estas moléculas marcadoras brinda la oportunidad de explorar más la caracterización funcional de las SSC debido a que las moléculas que se analizan, pueden estar implicadas en el mecanismo de regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de las SSC.

En cuanto a estudios realizados con SSC de alpaca se tiene referencia de un trabajo realizado donde ha sido posible por primera vez detectar a nivel transcripcional la expresión de cinco biomarcadores específicos para SSC en tejido gonadal durante el desarrollo testicular posnatal de alpacas de 10 a 12 meses de edad, dos de estos biomarcadores detectados fueron los relacionados con la autorrenovación (Nanos 2 y Lin 28), uno de diferenciación (Ckit), y dos genes de referencia conocidos como Rpl0 (Proteína Ribosomal Grande P0) y Actb (Actina Beta). Además, también se reportó por primera vez la reactividad de la SSC al conjugado del fluorocromo isotiocianato de fluoresceína con la lectina de *Dolichos biflorus*, FICT-DBA (Mujica, 2018).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación**

El presente estudio se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho – Perú.

#### **3.2. Población y muestra**

La población para el presente estudio estuvo constituida por testículos de alpacas faenadas en el Matadero Municipal de Huancavelica. Para la obtención de muestras se consideró la técnica de muestreo no probabilístico por conveniencia, donde las muestras seleccionadas fueron los testículos de alpacas de 2 a 3 años de edad.

#### **3.3. Metodología**

##### **3.3.1. Obtención de las muestras y aislamiento de espermatogonias**

La recolección de las muestras testiculares fue realizada entre las 9 a.m. y 11 a.m. Se ha procurado garantizar el mayor número de muestras posibles, las cuales fueron transportadas al laboratorio en frascos con solución salina fisiológica al 0,9 % (SSF), dentro de una caja isotérmica provista de hielo en gel, a unos 4 - 5°C, fueron necesarios la obtención de dos tomas de muestra para realizar el aislamiento (aislamiento I y aislamiento II), y su posterior cultivo en dos temperaturas distintas, el tiempo transcurrido desde la obtención de las muestras hasta el procesamiento en el laboratorio fue de aproximadamente ocho horas. Para aislar las células espermatogoniales, se realizó utilizando la metodología que describe (Izadyar et al., 2003) con algunas modificaciones que se detallan a continuación: Bajo condiciones asépticas se seleccionaron las muestras de testículos más grandes y sin ningún tipo de defecto, se lavó dos veces con SSF y se procedió a realizar la descapsulación mediante la liberación de la túnica albugínea. Luego se pesaron 20 g de tejido descapsulado los cuales fueron cortados en pequeños trozos con una tijera quirúrgica, triturados en un mortero y

filtrados a través de un colador metálico de malla fina, con lo cual se obtuvo un líquido denso que se recepcionó en un frasco conteniendo medio de cultivo DMEM suplementado y atemperado a 32°C. Luego el filtrado se distribuyó en tubos cónicos estériles de 10,0 ml con tapa de rosca, donde se añadió medio DMEM suplementado y atemperado a 32°C, en una proporción de 1:2 (filtrado: medio), para luego centrifugar a 300 x g durante tres min, por tres veces. Para la primera digestión enzimática, se agregó al pellet de tejido testicular lavado de cada tubo, un volumen de DMEM suplementado, a 32°C conteniendo cuatro enzimas (1 mg/ml de colagenasa, 1 mg/ml de tripsina, 1 mg/ml de hialuronidasa II y 5 Ug/ml DNasa I) a una proporción de 1:2 (pellet: medio). Los tubos se incubaron a 32°C durante 60 min en agitación continua en el rotador de tubos, luego se sometió a lavados por centrifugación a 300 x g por tres min, tres veces con DMEM suplementado, a 32°C, hasta que el sobrenadante fue transparente.

Para la segunda digestión enzimática, se añadió a cada tubo, un volumen de medio DMEM suplementado a 32°C, conteniendo solo tres enzimas (hialuronidasa, colagenasa y DNasa), en concentraciones iguales a las anteriormente mencionadas, a una proporción de 1:2 (pellet: medio), Se incubó a 32°C por un tiempo de 45 min, en agitación continua en el rotador de tubos. Después se sometió a lavados por centrifugación a 300 x g por tres min, tres veces con medio DMEM suplementado y atemperado a 32°C, hasta que el sobrenadante fue transparente, desechándose el sobrenadante. Las espermatogonias obtenidas fueron resuspendidas en medio DMEM a 32°C, trasvasadas a un solo tubo y completando a 5 ml con medio DMEM suplementado.



**Figura 1.** Pellet de tejido testicular de *Vicugna pacos* “alpaca” después del aislamiento celular de espermatogonias. Lab. de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

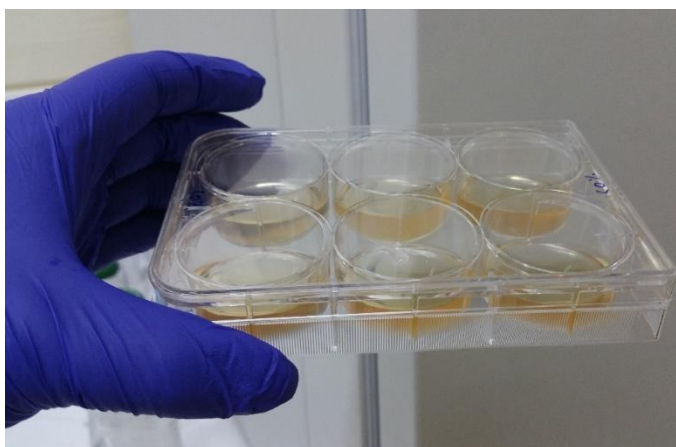
### 3.3.2. Determinación de la concentración, recuento total y viabilidad de espermatogonias

Una vez obtenida la suspensión de espermatogonias, se preparó una dilución sucesiva de suspensión celular con SSF, para lo cual primero se tomó con una micropipeta, 900  $\mu$ l de SSF el cual se colocó en un microtubo Eppendorf y se agregó 100  $\mu$ l de la suspensión celular, seguidamente en la segunda dilución se tomó 100  $\mu$ l de suspensión celular ya diluida anteriormente, a la cual se agregó 900  $\mu$ l de SSF. Luego se cargó en la Cámara de Neubauer y se realizó el recuento en cada uno de los cuadrantes de los extremos, estableciéndose el promedio entre los cuatro cuadrantes de los extremos para luego determinar la concentración y el recuento total de espermatogonias obtenidas.

La viabilidad fue determinada, primero combinando en un microtubo 25  $\mu$ l de azul de tripán al 0,4 % y 25  $\mu$ l de la suspensión celular, luego se tomó 15  $\mu$ l de la mezcla para cargar en la Cámara de Neubauer y se observó al microscopio a 400 aumentos, determinándose el porcentaje de células viables, teniendo en cuenta las que tomaron el colorante de exclusión (no viables) y no coloreadas (viables).

### 3.3.3. Cultivo de células espermatogoniales

Las variables manejadas fueron dos temperaturas y cinco concentraciones diferentes de suero fetal bovino. Se sembraron  $1 \times 10^6$  cel/ml en multiplacas de seis pocillos en un total de 5 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con diferentes concentraciones de suero fetal bovino (0 %, 2,5 %, 5 %, 10 %, y 20 %) y se llevaron a una incubadora con 5 % de CO<sub>2</sub> a dos temperaturas, 32 °C y 38 °C, haciendo un total de cinco multiplacas por cada temperatura. El medio fue reemplazado cada tres días; la concentración y viabilidad fue determinada a los 7 y 15 días de cultivo.



**Figura 2.** Cultivo de células espermatogoniales de *Vicugna pacos* "alpaca" en multiplacas de poliestireno medio de cultivo DMEM. Lab. de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

### 3.3.4. Tripsinización de las células espermatozonias en cultivo

Para tener un adecuado conteo de las espermatozonias en cultivo, se les sometió a un proceso de disociación celular (Urbaneja et al., 1975), con algunas modificaciones. Así, las células cultivadas fueron sometidas a una solución de Tripsina-EDTA en proporción 1:1 y concentración 0,125 % - 0,02 % respectivamente, se incubó a una atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 32 °C y 38 °C (según sea el caso a la que fueron cultivadas las espermatozonias) durante 5 a 10 min. Luego de observar bajo el microscopio de luz invertido que las células se disociaron completamente, se inactivó la tripsina agregando a la mezcla medio DMEM adicionado con SFB y la suspensión celular se centrifugó a 300 x g por 3 min, se descartó el sobrenadante, seguidamente se homogenizó el pellet agregando medio DMEM y finalmente se realizó el recuento total de las células utilizando la metodología descrita anteriormente.



**Figura 3.** Cultivo de células espermatozonias de *Vicugna pacos* “alpaca” en atmosfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. Lab. de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.



### 3.4. Diseño experimental

**Tabla 2.** Condiciones de Temperatura y concentración de SFB para el cultivo in vitro de células espermatozonales de *Vicugna pacos* "alpaca". Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Concentración de SFB (%)
1	32	0
2	32	2,5
3	32	5
4	32	10
5	32	20
6	38	0
7	38	2,5
8	38	5
9	38	10
10	38	20

### 3.5. Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos obtenidos en la presente investigación, se empleó el diseño factorial el cual permitió estudiar el efecto de cada factor sobre la variable respuesta, así como el efecto de las interacciones entre factores sobre dicha variable. Se consideraron dos factores: factor A (temperatura) con dos niveles cuyas unidades experimentales fueron 32°C y 38°C, por otro lado, el factor B (concentración de SFB) con cinco niveles de experimentación: 0%, 2,5%, 5%, 10% y 20%. Las unidades experimentales cubrieron todas las posibles combinaciones entre los niveles en todos los factores, luego se agrupó la información obtenida utilizando la prueba de Tukey con una confianza de 95 % con el fin de comparar las medias individuales.

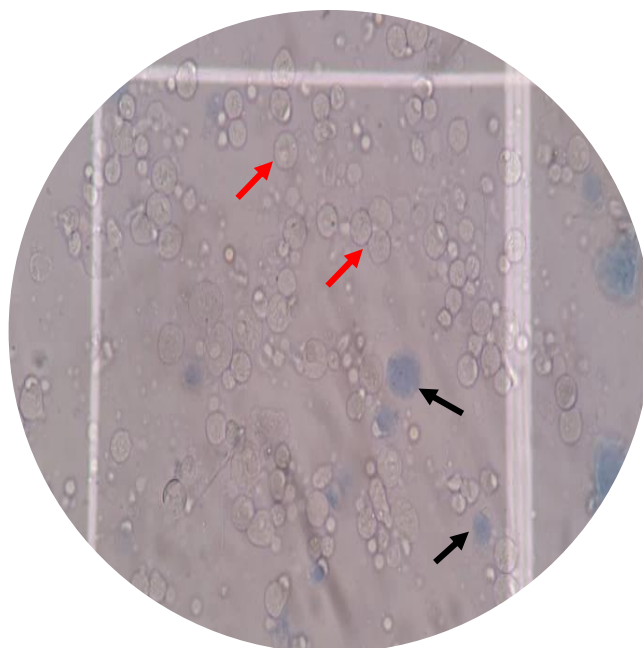
#### **IV. RESULTADOS**

#### 4.1. Determinación de la concentración y viabilidad de las células espermatogoniales.

**Tabla 3.** Concentración y viabilidad de las células espermatogoniales de *Vicugna pacos* “alpaca” después de los aislamientos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

Aislamiento	Concentración celular ( $\times 10^6$ cel/ml)	Concentración celular total ( $\times 10^6$ cel/5 ml)	Viabilidad celular (%)
I	28,0	140,0	95
II	23,0	115,0	93

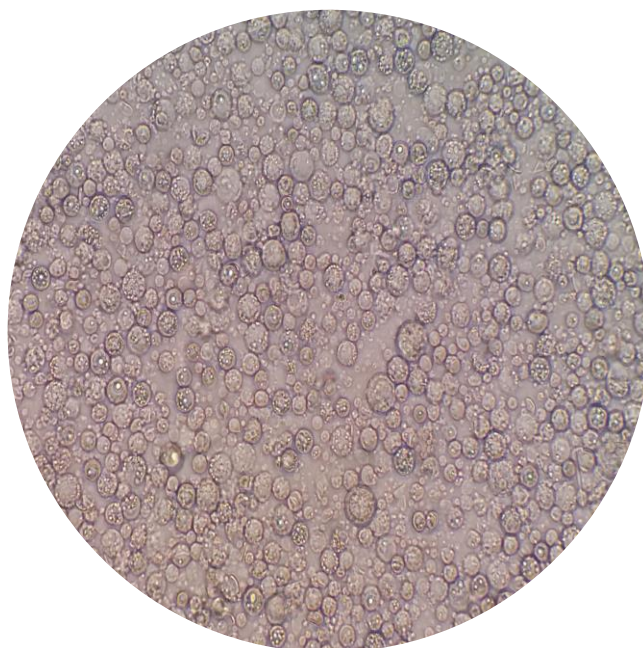
En el Aislamiento I, se obtuvo una concentración de  $28 \times 10^6$  cel/ml de suspensión y un total de  $140 \times 10^6$  cel/5 ml, con una viabilidad celular de 95 %. En el Aislamiento II, se obtuvo una cantidad ligeramente menor de células, correspondiente a  $23 \times 10^6$  cel/ml y un total de  $115 \times 10^6$  cel/5 ml, con una viabilidad celular del 93 % (ver Tabla 3).



**Figura 4.** Células espermatogoniales de *Vicugna pacos* “alpaca” teñidas con colorante de exclusión azul de tripán (no viables, flechas negras), y las no coloreadas (viables, flechas rojas). Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

#### 4.2. Evaluación del cultivo celular

Las suspensiones de células madre espermatogoniales, que además contenían células del linaje espermático y otras células somáticas fueron diluidas, sembradas y cultivadas en multiplacas de seis pocillos a razón de  $1 \times 10^6$  cel/5 ml, en medio de cultivo DMEM suplementado con antibióticos de acuerdo al Anexo 1. Las muestras procedentes de los dos aislamientos fueron cultivadas en distintos tiempos en una incubadora de atmosfera húmeda a 32 °C y 38 °C, con 5 % de CO<sub>2</sub> y con las diferentes concentraciones de SFB tal como se detalla en la Tabla 1. El recambio del medio y seguimiento del cultivo se realizó cada tres días usando un microscopio invertido, evaluando posibles contaminaciones. El tiempo de cultivo fue por un total de 15 días, no obstante, la mitad de las muestras fueron evaluadas a los siete días. La evaluación del cultivo consistió en determinar el efecto de la temperatura y concentración de SFB sobre el número total de células.



**Figura 5.** Células espermatogoniales de *Vicugna pacos* “alpaca” recién cultivadas en medio DMEM suplementado con antibióticos. Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

En todos los tratamientos, en los primeros siete días de cultivo, se observó la disminución de la cantidad total de células espermatogoniales en relación a las sembradas inicialmente. Así se pudo observar que el cultivo a concentraciones de 20 % de SFB a 32 °C es el menos favorecido y presenta la sobrevivencia más baja. De manera contraria el más alto correspondió a una concentración de 2,5 % de SFB (ver Tabla 4).

**Tabla 4.** Concentración total de espermatogonias de *Vicugna pacos* “alpaca” después de siete días de cultivo a 32 °C (x 10<sup>6</sup> cel/ml). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

<b>Suero Fetal Bovino (%)</b>	<b>Concentración (x 10<sup>6</sup> cel/ml)</b>		
	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>
0	0,450	0,395	0,410
2,5	0,660	0,655	0,680
5	0,600	0,590	0,560
10	0,530	0,515	0,490
20	0,310	0,345	0,375

De forma similar fue observado en los tratamientos a 38 °C, donde el número total de células espermatogoniales también disminuyeron, el tratamiento con menor sobrevivencia se observó a una concentración de 20 % de SFB; y el más alto correspondió al cultivo con 5 % de SFB (ver Tabla 5). Se puede observar que a los siete días de cultivo las células redondas correspondientes a las espermatogonias, tuvieron mayor sobrevivencia a condiciones donde el cultivo es con concentraciones bajas de SFB.

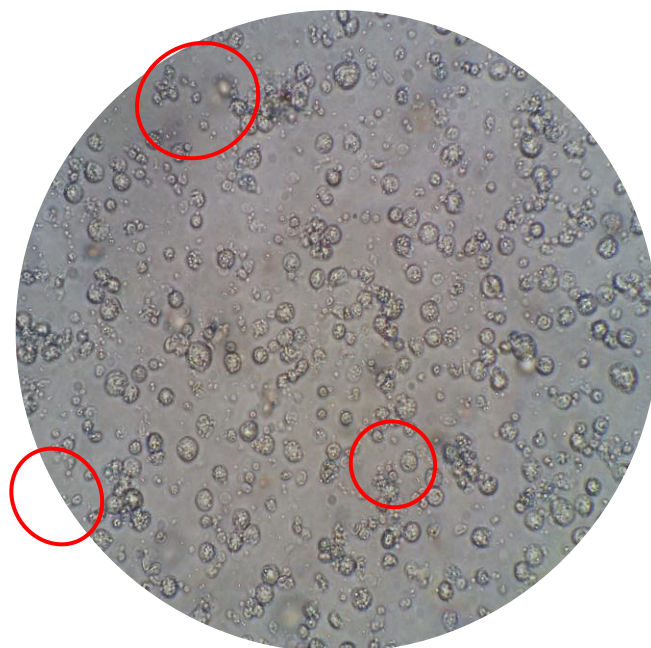
**Tabla 5.** Concentración total de espermatogonias de *Vicugna pacos* “alpaca” después de siete días de cultivo a 38 °C (x 10<sup>6</sup> cel/ml). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

<b>Suero Fetal Bovino (%)</b>	<b>Concentración (x 10<sup>6</sup> cel/ml)</b>		
	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>
0	0,290	0,310	0,320
2,5	0,675	0,645	0,630
5	0,680	0,705	0,670
10	0,420	0,380	0,405
20	0,285	0,330	0,275

Por otra parte, a los siete días de cultivo y en las dos temperaturas (32 y 38°C), se observa indicios de proliferación celular con la formación de colonias o agregados de células espermatogoniales, especialmente en concentraciones de 2,5 y 5 % de SFB y en sus respectivos grupos control, estos agregados celulares fueron posibles de observar hasta el día 15 de cultivo. También se observó en los tratamientos con 10 y 20 % de SFB, pero de una manera más reducida y poco frecuente.



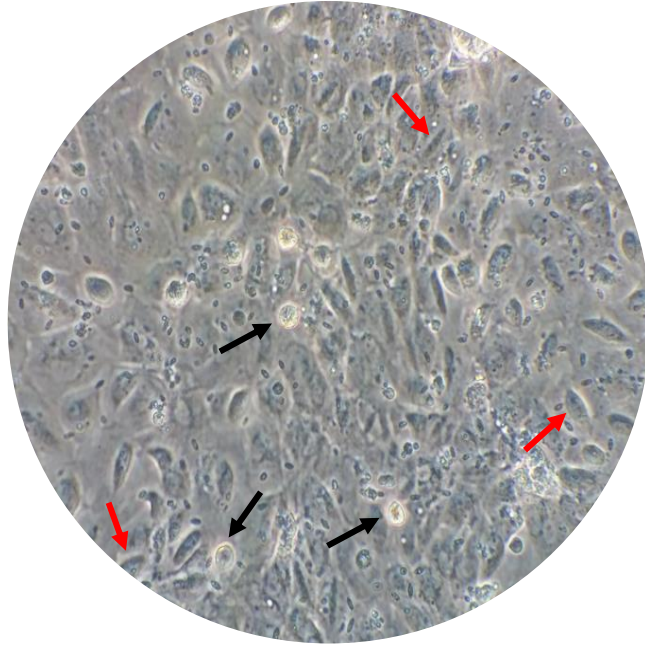
**Figura 6.** Formación de agregados celulares de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" en siete días de cultivo a 38 °C y 5 % de SFB. Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.



**Figura 7.** Formación de agregados celulares de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" en cultivo a 32 °C y 2,5 % de SFB a los siete días. Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

Se observó también que a partir del día siete de cultivo, se formaron células delgadas y alargadas, alcanzando una mayor confluencia celular en el día 13 del cultivo, y siendo su crecimiento mucho más lento en concentraciones bajas de SFB.





**Figura 8.** Células somáticas (flechas rojas) en el cultivo de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" a 38 °C con 10 % de CO<sub>2</sub>. Células espermatogoniales (flechas negras). Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

En la evaluación del día 15 de cultivo, se observó un considerable incremento celular, tanto a 32°C como a 38°C, únicamente en las concentraciones de SFB al 2,5% y 5%; en los demás tratamientos, hubo una disminución en relación a la concentración total que se tenía en el día siete del cultivo. Se puede observar que las células tienen un mejor mantenimiento e incremento celular a la temperatura de 38°C y una concentración de 2,5% de SFB.

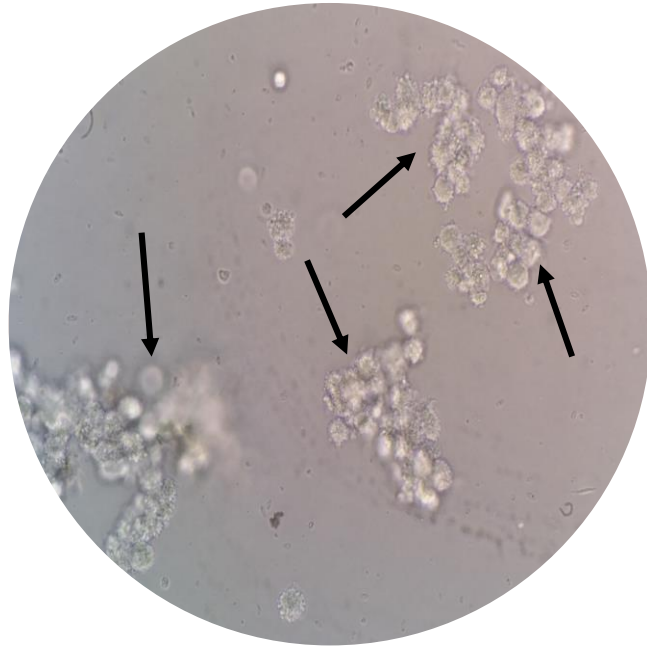
**Tabla 6.** Concentración total de espermatogonias de *Vicugna pacos* “alpaca” después de 15 días de cultivo a 32 °C (x 10<sup>6</sup> cel/ml). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

<b>Suero Fetal Bovino (%)</b>	<b>Concentración (x 10<sup>6</sup> cel/ml)</b>		
	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>
0	0,385	0,340	0,365
2,5	0,790	0,780	0,750
5	0,645	0,670	0,695
10	CONTAMINADO	0,330	0,325
20	0,120	0,170	0,100

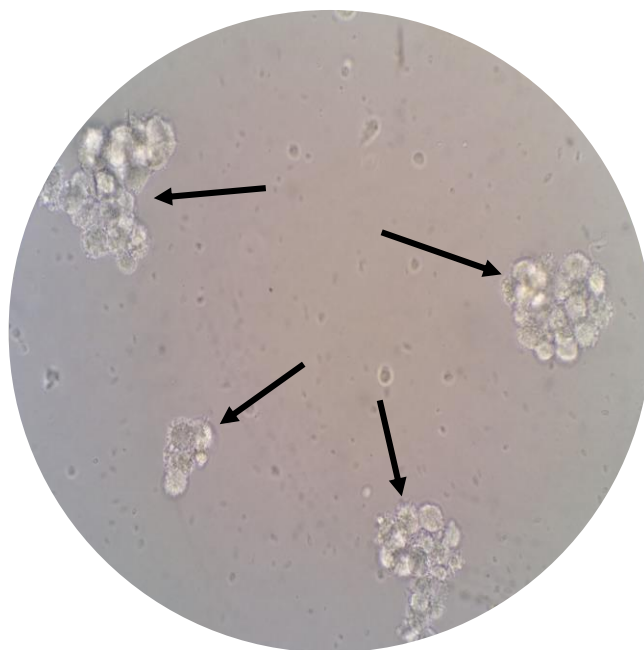
**Tabla 7.** Concentración total de espermatogonias de *Vicugna pacos* “alpaca” después de 15 días de cultivo a 38 °C (x 10<sup>6</sup> cel/ml). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

<b>Suero Fetal Bovino (%)</b>	<b>Concentración (x 10<sup>6</sup> cel/ml)</b>		
	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>
0	0,380	0,390	0,350
2,5	0,910	0,905	0,870
5	0,760	0,800	0,745
10	0,295	0,325	0,270
20	CONTAMINADO	0,205	0,180

Los agregados de espermatogonias se mantuvieron y tuvieron mayor incidencia y conformación para el día 15 de cultivo en concentraciones de 2,5 y 5 % de SFB (en ambas condiciones de temperatura), siendo el más notable en el cultivo a 2,5 % de SFB. Fue muy escaso para el grupo control y aún más para las concentraciones de 10 y 20 % de SFB en donde sólo aumentaron y llegaron a la confluencia las células somáticas aparentemente correspondientes a las células de Sertoli.

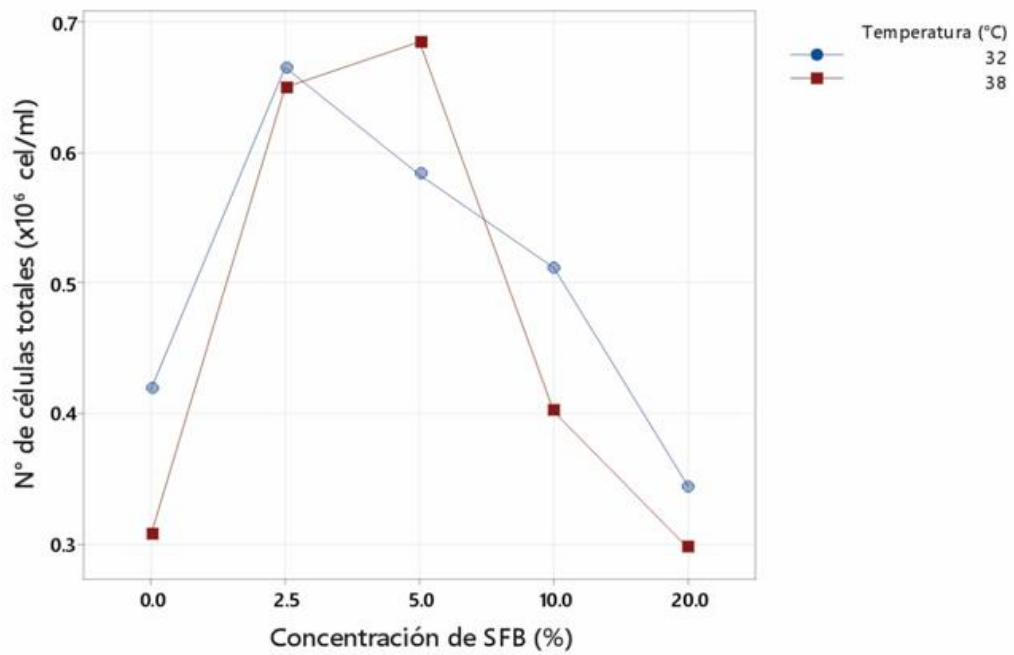


**Figura 9.** Colonias de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" a los 15 días de cultivo a 38°C y 2,5% de SFB. Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

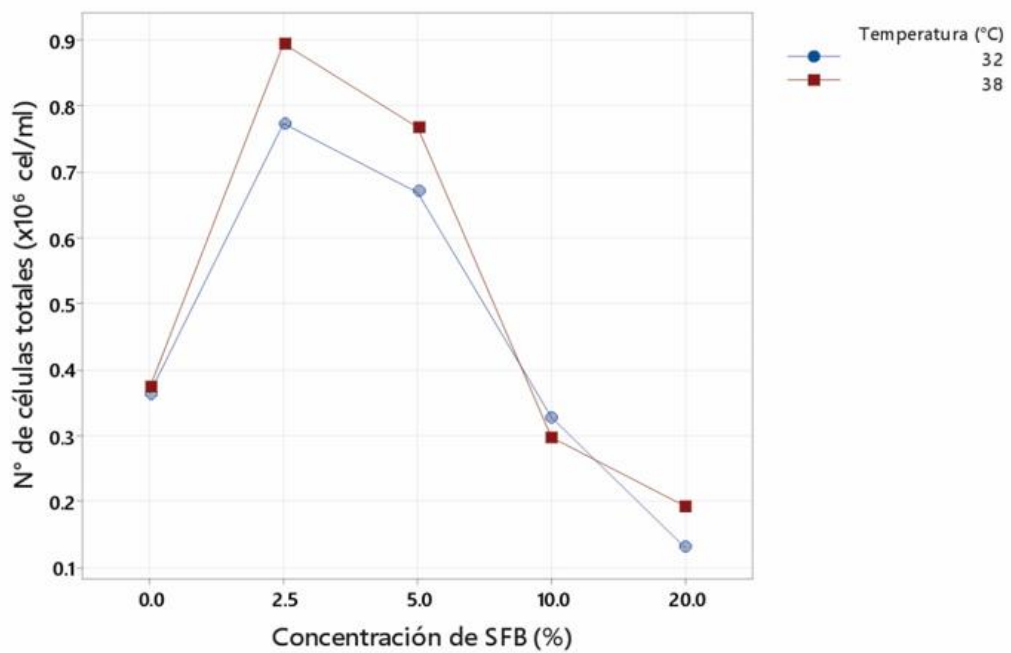


**Figura 10.** Colonias de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" a los 15 días de cultivo a 32 °C con 2,5 % de SFB. Observación a 400 aumentos. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

Se realizó la prueba de hipótesis a los datos obtenidos después de los 7 y 15 días de cultivo para ambas variables, mostrando una diferencia significativa para los promedios de la concentración total de células espermatogoniales ( $p < 0,05$ ); por otro lado, estadísticamente también existe interacción entre ambas variables ( $p < 0,05$ ). Al agrupar la información utilizando la Prueba de Tukey a una confianza del 95 %, se observa que las interacciones: 38 °C (5,0 % SFB), 32 °C (2,5 % SFB) y 38 °C (2,5 % SFB) no son significativamente diferentes y dan como resultado una mayor concentración total de las células a los primeros siete días de cultivo. Por otro lado, en las interacciones 32 °C (20,0 % SFB), 38 °C (0,0 % SFB) y 38 °C (20,0 % SFB), que también no fueron significativamente diferentes, pero presentaron una menor sobrevivencia celular.



**Figura 11.** Interacción de la temperatura y SFB, que influyen en la sobrevivencia de las células totales de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca", después de siete días de cultivo. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.



**Figura 12.** Interacción de la temperatura y SFB que influyen en la sobrevivencia de las células totales de espermatogonias de *Vicugna pacos* “alpaca” después de 15 días de cultivo. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

## V. DISCUSIÓN

El presente trabajo tuvo como objetivo principal establecer el cultivo *in vitro* de células espermatogoniales de alpaca y describir las características de su establecimiento a los 7 y 15 días de cultivo, a diferentes condiciones de temperatura y diferentes porcentajes de SFB en el medio de cultivo DMEM suplementado con antibióticos. El aislamiento de las células espermatogoniales se hizo por digestión enzimática, así como las condiciones para establecer el cultivo *in vitro* se hicieron de acuerdo a lo reportado por Izadyar et al. (2003). La concentración promedio de los aislamientos I y II de células germinales obtenidas por digestión enzimática, fue de  $25,5 \times 10^6$  cel/ml, a partir de 20 g de parénquima testicular; expresado esto en promedio de células espermatogoniales por gramo es de  $1,3 \times 10^6$  cel/g, resultado similar al reportado por (Mujica, 2018), que en su estudio utilizó el mismo procedimiento de digestión enzimática en la obtención de espermatogonias de alpaca en el cual obtuvo concentraciones celulares desde  $30,5$  a  $52 \times 10^6$  cel/ml a partir de 20 g de parénquima testicular, obteniendo una relación de células por gramo de tejido de  $1,5$  a  $2,6 \times 10^6$  cel/g. Sin embargo, se reportaron resultados diferentes por otros autores, en cuanto a la relación del peso de tejido testicular y la concentración celular obtenida, en estos casos los pesos de los tejidos testiculares para el aislamiento de espermatogonias fue de 2,4 a 3 gramos y la relación de la concentración de células espermatogoniales por gramo fue aproximadamente  $15$  a  $29 \times 10^6$  cel/g (Reyes, 2018; Suarez, 2020; Sulca, 2021), esta gran diferencia de la concentración por gramo de parénquima testicular puede ser debido a las diferencias que presentan en la metodología de aislamiento celular, ambos son modificaciones de la metodología descrita para bovinos (Izadyar et al., 2003). Por otra parte, las viabilidades de las células germinales obtenidas fueron de 93 y 95 %, para los aislamientos I y II, respectivamente (ver Tabla 3). Estos resultados son ligeramente superiores en

comparación al promedio que se reporta en otros estudios similares en donde también se utiliza la digestión enzimática como método de aislamiento celular de espermatogonias de alpaca, en el cual reportan viabilidades desde 70 % hasta 94 % (Huamaní, 2018; Mujica, 2018; Reyes, 2018; Suarez, 2020; Sulca, 2021; Valdivia et al., 2019). En el presente trabajo el tiempo transcurrido desde la obtención de las muestras testiculares hasta el aislamiento celular en el laboratorio fue más corto (en promedio 8 h) en comparación a lo reportado en las investigaciones mencionadas en los cuales el tiempo transcurrido fueron de hasta 24 h, estos valores siguen siendo altos, ya que la digestión enzimática como método de aislamiento celular ofrece una disgregación homogénea y con menor daño a la integridad celular (Kubota et al., 2004). Sin embargo, con sólo esta metodología no es posible obtener una población celular pura y homogénea dado que en nuestra suspensión de células espermatogoniales aisladas, se observaron también algunas células somáticas que conforman el microambiente testicular, razón por la cual en otros trabajos en donde también aíslan y cultivan espermatogonias de alpaca recurren a su purificación mediante el método gradiente de densidad en Percoll, el cual les ayudó a disminuir la cantidad de células somáticas en el cultivo (Suarez, 2020; Sulca, 2021).

A los siete días del cultivo, la concentración total de células espermatogoniales vivas en relación a la cantidad sembrada queda disminuida en todos los tratamientos (ver tablas 4 y 5), no obstante se resalta una mayor supervivencia a concentraciones bajas de SFB (2,5 % y 5 %), este resultado se observa para ambas condiciones de temperatura; mientras que los cultivos sin la adición de SFB, así como aquellos con concentraciones elevadas no favorecen a la supervivencia inicial observándose una elevada muerte celular. De forma general se ha observado la tendencia a la disminución del número de células, el cual es entendido como supervivencia celular del cultivo primario de las espermatogonias frente a condiciones *in vitro*, en los cuales también se puede diferenciar a aquellas que son capaces de proliferar, otras que se mantienen y sólo sobreviven sin incrementar su número y otras células que no son capaces de sobrevivir a las condiciones *in vitro* a las que se les enfrenta, así pues se puede observar tres tipos de poblaciones celulares (Freshney, 2010). Reportes similares al presente estudio se registran al cultivar células espermatogoniales de bovino a 32 °C y 37 °C, en el cual tras una semana de cultivo en ausencia de suero, el 20 % de las células presentan viabilidad favorable, sin embargo en presencia de 2,5 % de SFB



aproximadamente 80 % de las células estaban vivas y con indicios de proliferación, de todos modos se observa la disminución de la concentración total de células vivas (Izadyar et al., 2003).

La formación de colonias es posible en el cultivo de espermatogonias de alpaca, pues nos muestra los primeros indicios de proliferación celular el cual fue observado el día siete del cultivo, pudiéndose ver agregados celulares que permanecieron incluso en el día 15. Estas colonias tienen una mejor conformación en los cultivos con concentraciones de 2,5 % y 5 % de SFB en ambas condiciones de temperatura a diferencia de los cultivos con concentraciones altas de SFB (10 % y 20 %) incluido el grupo control que tienen una menor formación de estos agregados celulares. Estas colonias pueden tener su origen a partir de una célula madre espermatogonial que comenzó su división y que las células que se encuentran en las zonas más periféricas de la colonia son las que entraron al proceso de diferenciación (Izadyar et al., 2003). Se tienen reportes de la observación de colonias en estudios similares, donde también se aislaron y cultivaron células espermatogoniales de alpaca, siendo posible su observación desde el día tres de cultivo, estando su permanencia sujeta a las condiciones que se les brinda (Suarez, 2020; Sulca, 2021; Valdivia et al., 2019).

A los 15 días, en el cultivo con 2,5 % de SFB y 38 °C se tiene un mayor incremento del número total de células espermatogoniales, esto puede ser debido a que 38°C es la temperatura más cercana al promedio reportado en investigaciones donde determinan la temperatura corporal de la alpaca en diferentes condiciones (Ascue et al., 2018; Bligh & Sumar, 1988; Parraguez et al., 1993; Vilela & Eduardo, 2021); sin embargo, se tiene también resultados en otros trabajos en donde la temperatura de cultivo *in vitro* de las espermatogonias de alpaca fue de 37 °C, reportándose un favorable mantenimiento y proliferación celular (Reyes, 2018; Suarez, 2020; Sulca, 2021; Valdivia et al., 2019), no obstante que en el presente trabajo también se tienen resultados similares a 32 °C con 2,5 % de SFB. Debido a que no se cuenta con información respecto a la temperatura intratesticular en alpacas, en el presente trabajo se tomó en cuenta esta temperatura teniendo como referencia a la temperatura testicular en toros, en los cuales es de 2 a 6 °C menor que su temperatura corporal central en donde se puede llevar a cabo la espermatogénesis (Waites, 1970). Por otra parte se puede observar que en la primera semana de cultivo, se forman pequeñas colonias de espermatogonias en todas las concentraciones de SFB, pero al transcurrir el tiempo, a los 15 días de

cultivo estas disminuyen y sólo se enriquecen considerablemente a una concentración de 2,5 %, mayores concentraciones de SFB sólo favorecen el crecimiento acelerado de células somáticas; mientras que en el grupo control al no estar el medio DMEM adicionado con SFB, ofrece una escasa proliferación. Este resultado es similar al reportado en el cultivo de células espermatogoniales de bovinos en medio MEM (Medio Esencial Mínimo) y KSOM (medio rico en potasio) en donde las condiciones de temperatura son de 32 °C y 37 °C y con concentraciones de SFB que van desde 0 %, 2,5 %, 5 % y 10 %, resultando adecuado para el mantenimiento y proliferación el cultivo en medio MEM a 37 °C con 2,5 % de SFB. Los cultivos con concentraciones de SFB de 5 % y 10 % propiciaron el crecimiento de las células somáticas (Izadyar et al., 2003), en tanto que otra investigación difiere en los resultados frente a la concentración de SFB y sus resultados obtenidos, en ella se cultivaron espermatogonias de bovino en medio MEM con SFB con 0,25 %; 1 % y 10 % a 37 °C, obteniendo resultados favorables tanto a 1 % y 10 % de SFB, no existiendo diferencias significativas entre ambos (Erazo, 2017). Por otro lado, se tienen resultados de investigaciones importantes que se realizaron cultivando células espermatogoniales de alpaca en medios de cultivo DMEM y en algunos casos en el medio STEMPRO, a una temperatura de 37 °C, en los cuales la concentración de SFB que utilizaron fue de uno, resultando favorable para el establecimiento y proliferación no presentándose así el crecimiento desmedido de las células somáticas (Reyes, 2018; Suarez, 2020; Sulca, 2021; Valdivia et al., 2019). El SFB es objeto de muchos debates debido en parte a la variación en su composición, que puede inhibir el crecimiento celular en el cultivo, así como también el riesgo que se tiene a una contaminación biológica proveniente de la línea de producción del SFB (van der Valk et al., 2010). A pesar de esto,- es utilizado en muchas investigaciones en donde se cultivan células debido a que favorece el establecimiento del cultivo primario, otorga un gran número de factores nutricionales y macromoleculares esenciales para la proliferación y supervivencia celular (Mucci et al., 2006).

## VI. CONCLUSIONES

1. Se cultivó *in vitro* células espermatogoniales de *Vicugna pacos* "alpaca", logrando determinar las interacciones de dos temperaturas (32 °C y 38 °C) con diferentes concentraciones de suero fetal bovino (0 %, 2,5 %, 5 %, 10 % y 20 %) sobre la sobrevivencia y proliferación de las espermatogonias.
2. Bajo las condiciones de los experimentos, se logró determinar cómo interacción óptima, la temperatura de cultivo a 38 °C con una concentración de suero fetal bovino al 2,5 %.

## VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda evaluar la sobrevivencia y proliferación celular de las espermatogonias, en cultivos cuyas concentraciones de SFB sean igual y menores a 2,5 %.
2. Evaluar el cocultivo de espermatogonias, utilizando como matriz células de Sertoli previamente aisladas y cultivadas *in vitro*.
3. Aplicar técnicas de enriquecimiento y purificación de espermatogonias, para luego poder estudiar *in vitro* el efecto de otros factores que promuevan el crecimiento, la renovación y diferenciación celular.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aponte, P., & Rooij, D. (2008). Biomanipulation of bovine spermatogonial stem cells. *Anim Reprod*, 5.
- Ascue, Callán, Goycochea, Jauregui, Miranda, Montalvo, Sandoval, Serna, Solis, Veramendi, F. H., & Vilela, J. (2018, noviembre 21). *Estudio comparativo preliminar de la medición de temperatura corporal vía rectal y vía infrarroja en alpacas*.
- Bligh, J., & Sumar, J. (1988). *Patrones de temperatura corporal en camelidos sudameridcanos*. 6, 37-39.
- Bravo, P. W., Skidmore, J. A., & Zhao, X. X. (2000). Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 173-193. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00158-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00158-5)
- Caires, K., Broady, J., & McLean, D. (2010). *Maintaining the male germline: Regulation of spermatogonial stem cells*. 205:133-45.
- Casaretto, C., Martínez, M., Giuliano, S., Rubin, E., Gambarotta, M., & Carretero, I. (2012). *Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer*. 44:335-41.
- de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction*, 13(suppl 1), 1-8. [https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl\\_1.1](https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.1)
- de Rooij, D. G. (1998). Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*, 79(2), 67-80. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.1998.00057.x>
- de Rooij, D. G., & Russell, L. D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, 21(6), 776-798.
- Ebata, K. T., Yeh, J. R., Zhang, X., & Nagano, M. C. (2008). The application of biomarkers of spermatogonial stem cells for restoring male fertility. *Disease Markers*, 24(4-5), 267-276. <https://doi.org/10.1155/2008/536020>
- El Ouali, H., Leheup, B. P., Gelly, J. L., & Grignon, G. (1991). Laminin ultrastructural immunolocalization in rat testis during ontogenesis. *Histochemistry*, 95(3), 241-246. <https://doi.org/10.1007/BF00744995>
- Erazo, S. (2017). *Aislamiento, cultivo e identificación molecular de células madre espermatogoniales en bovinos*. Universidad San Francisco De Quito.
- Fernandez, D. (2008). *Aracterísticas de la contracción de células mioides peritubulares de los túbulos seminíferos de testículo de rata*. Universidad Nacional de San Luis.
- Freshney, R. I. (2010). Primary Culture. En *Culture of Animal Cells* (pp. 163-186). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470649367.ch11>
- Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 9(4), 411-416. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0203>
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2002). *Reproduccion e inseminacion artificial en animales* (7.ª ed.). editorial interamericana McGraw-Hill.

- Hess, R., & de Franca, L. (2009). *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 63:1-15.
- Hofmann, M.-C. (2008). Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 288(1-2), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2008.04.012>
- Huamaní, J. (2018). *Determinacion de viabilidad y rendimiento durante el aislamiento de espermatogonias de Vicugna pacos «alpaca» a diferentes edades*. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga.
- Huanca, T. (1996). *Manual del alpaquero*. Instituto Nacional de Innovacion Agraria.
- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T., & Adams, G. (2007). *Biotechnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: Avances y perspectivas*. 15, 195-201.
- Huckins, C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *The Anatomical Record*, 169(3), 533-557. <https://doi.org/10.1002/ar.1091690306>
- INEI. (2012). *Resultados Definitivos: IV Censo Nacional Agropecuario - 2012* [Text]. SINIA | Sistema Nacional de Información Ambiental. <https://sinia.minam.gob.pe/documentos/resultados-definitivos-iv-censo-nacional-agropecuario-2012-0>
- Izadyar, F., Spierenberg, G. T., Creemers, L. B., den Ouden, K., & de Rooij, D. G. (2003). Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 124(1), 85-94.
- Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2004). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(47), 16489-16494. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407063101>
- Lee, J. A., Parrett, B. M., Conejero, J. A., Laser, J., Chen, J., Kogon, A. J., Nanda, D., Grant, R. T., & Breitbart, A. S. (2003). Biological alchemy: Engineering bone and fat from fat-derived stem cells. *Annals of Plastic Surgery*, 50(6), 610-617. <https://doi.org/10.1097/01.SAP.0000069069.23266.35>
- Loveland, K. L., & Schlatt, S. (1997). Stem cell factor and c-kit in the mammalian testis: Lessons originating from Mother Nature's gene knockouts. *The Journal of Endocrinology*, 153(3), 337-344. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1530337>
- MIDAGRI. (2022). *MIDAGRI: El 87% de la población mundial de alpacas se encuentra en el Perú*. <https://www.gob.pe/institucion/midagri/noticias/636546-midagri-el-87-de-la-poblacion-mundial-de-alpacas-se-encuentra-en-el-peru>
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G. G., Hozbor, F., Cabodevila, J., & Alberio, R. H. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65(8), 1551-1562. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.020>
- Mujica, F. R. (2018). *Caracterización de células germinales testiculares de Vicugna pacos (alpaca) y expresión de biomarcadores específicos en tejido gonadal*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- Nagano, M., Ryu, B.-Y., Brinster, C. J., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2003). Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biology of Reproduction*, 68(6), 2207-2214. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014050>
- Oatley, J., Reeves, J., & McLean, D. (2004). *Biological Activity of Cryopreserved Bovine Spermatogonial Stem Cells During In Vitro Culture*. 71, 942-947.
- Palombi, F., Farini, D., Salanova, M., De Grossi, S., & Stefanini, M. (1992). Development and cytodifferentiation of peritubular myoid cells in the rat testis. *The Anatomical Record*, 233(1), 32-40. <https://doi.org/10.1002/ar.1092330106>
- Parraguez, V., Raggi, L., & Crossley, J. (1993). Variación circadiana de temperatura rectal en alpacas (*Lama Pacos*) mantenidas en el altiplano y en el valle central de Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.5354/acv.v8i1.6111>
- Reyes, J. G. (2018). *Proliferación de células madre espermatogoniales (SSC) de alpaca (Vicugna pacos) y su posterior criopreservación*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Riboldi, M. (2012). *Aislamiento, cultivo, caracterización y maduración de células indiferenciadas desde biopsias testiculares humanas*. Universidad de Valencia.
- Roldan, E., & Garde, J. (2004). Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. En *Los retos medioambientales del siglo XXI* (pp. 283-303). Fundación BBVA.
- Roos, H., & Pawlina, W. (2004). *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular* (4.ª ed.). Editorial Panamerica.
- Ross, H., & Pawlina, W. (2004). *Histología texto y atlas color con biología celular y molecular* (4.ª ed.). Editorial Panamericana.
- Suarez, M. del P. (2020). *Proliferación de células madre espermatogoniales de alpaca (Vicugna pacos) en presencia de matrices extracelulares*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Sulca, C. C. (2021). *Aislamiento y enriquecimiento de células madre espermatogoniales de alpaca (Vicugna pacos) y caracterización de cocultivos con células de Sertoli*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Sumar, J. (1983). *Studies on reproductive pathology in alpacas*. Swedish University of Agrarian Sciences.
- Tajima, Y., Watanabe, D., Koshimizu, U., Matsuzawa, T., & Nishimune, Y. (1995). Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- $\alpha$  stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes. *International Journal of Andrology*, 18(1), 8-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1995.tb00928.x>
- Takashima, S., Kanatsu-Shinohara, M., Tanaka, T., Morimoto, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Jijiwa, M., Takahashi, M., Ogura, A., & Shinohara, T. (2015). Functional Differences between GDNF-Dependent and FGF2-Dependent Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports*, 4(3), 489-502. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.01.010>

- Urbaneja, M., Gugig, M., & Bello, R. (1975). *Cultivo de tejidos animales. Trabajos de laboratorio* (U.C.V.).
- Valdivia, M., Reyes, J., Bravo, Z., Cancho, C., Castañeda, S., Limaymanta, O., Woll, P., Santiani, A., & Gonzales, G. (2019). *In vitro culture of spermatogonial stem cells isolated from adult alpaca (Vicugna pacos) testes analysed with Dolichos biflorus by flow cytometry*. <https://doi.org/10.1111/and.13269>
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, A., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L., & Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media—Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 24(4), 1053-1063. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
- van Pelt, A. M., Morena, A. R., van Dissel-Emiliani, F. M., Boitani, C., Gaemers, I. C., de Rooij, D. G., & Stefanini, M. (1996). Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biology of Reproduction*, 55(2), 439-444. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.2.439>
- Vendrell, J. (2003). *Patrones espermatogénicos basales y desarrollo embrionario temprano tras ICSI en oligoastenozoospermia secretora severa*.
- Vilela, J., & Eduardo, N. (2021). *Prediction-of-body-temperature-using-infrared-thermometer-in-an-alpaca-herd-Arequipa-Peru* *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 18944.
- Virtanen, I., Kallajoki, M., Näurväunen, O., Paranko, J., Thornell, L.-E., Miettinen, M., & Lehto, V.-P. (1986). Peritubular myoid cells of human and rat testis are smooth muscle cells that contain desmin-type intermediate filaments: Desmin in testicular myoid cells. *The Anatomical Record*, 215(1), 10-20. <https://doi.org/10.1002/ar.1092150103>
- Waites, G. M. H. (1970). Chapter 4- Temperature Regulation and the Testis. En A. D. Johnson, W. R. Gomes, & N. L. Vandemark (Eds.), *Development, Anatomy, and Physiology* (pp. 241-279). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386601-1.50010-X>
- Yoshida, S., Sukeno, M., & Nabeshima, Y.-I. (2007). A vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5845), 1722-1726. <https://doi.org/10.1126/science.1144885>
- Zheng, Y., Zhang, Y., Qu, R., He, Y., Tian, X., & Zeng, W. (2014). Spermatogonial stem cells from domestic animals: Progress and prospects. *Reproduction*, 147(3), R65-R74. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0466>



## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Viabilidad de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" expresado en porcentaje, después de siete días de cultivo a 32 °C. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

<b>Concentración de SFB (%)</b>	<b>Viabilidad (%)</b>		
	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>
0	82	85	83
2,5	90	91	88
5	79	83	83
10	85	89	91
20	75	79	80

**Anexo 2.** Viabilidad de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" expresado en porcentaje después de siete días de cultivo a 38 °C. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

<b>Concentración de SFB (%)</b>	<b>Viabilidad (%)</b>		
	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>
0	85	88	83
2,5	94	93	96
5	95	94	97
10	91	87	88
20	87	84	85

**Anexo 3.** Viabilidad de espermatogonias de *Vicugna pacos* “alpaca” expresado en porcentaje después de 15 días de cultivo a 32 °C. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.

<b>Concentración de SFB (%)</b>	<b>Viabilidad (%)</b>		
	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>
	79	75	80
2,5	85	86	89
5	79	78	76
10	CONTAMINADO	76	79
20	81	73	78

**Anexo 4.** Viabilidad de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" expresado en porcentaje después de 15 días de cultivo a 38 °C. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

<b>Concentración de SFB (%)</b>	<b>Viabilidad (%)</b>		
	<b>Pocillo 1</b>	<b>Pocillo 2</b>	<b>Pocillo 3</b>
0	91	89	93
2,5	95	96	97
5	96	94	98
10	88	89	79
20	CONTAMINADO	75	71

**Anexo 5.** Prueba de hipótesis para concentración total de células espermatogoniales de *Vicugna pacos* "alpaca" mediante el análisis de varianza después de los primeros siete días de cultivo, existe diferencia significativa dentro de las dos variables, así como también hay interacción entre ambas ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

<b>Fuente de variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Temperatura (°C)	1	0.009901	0.009901	18.92	0.000
Concentración SFB (%)	4	0.570205	0.142551	272.39	0.000
Temperatura (°C) *Concentración SFB (%)	4	0.046062	0.011515	22.00	0.000
Error	20	0.010467	0.000523		
Total	29	0.636634			

**Anexo 6.** Información agrupada por el método de Tukey con un nivel de confianza de 95 %, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Siete días de cultivo de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

Temperatura (°C) * concentración de SFB (%)	N	Media (x10 <sup>6</sup> )	Agrupación
38 5,0	3	0,685000	A
32 2,5	3	0,665000	A
38 2,5	3	0,650000	A
32 5,0	3	0,583333	B
32 10,0	3	0,511667	C
32 0,0	3	0,418333	D
38 10,0	3	0,401667	D E
32 20,0	3	0,343333	E F
38 0,0	3	0,306667	F
38 20,0	3	0,296667	F

**Anexo 7.** Prueba de hipótesis para concentración total de células espermatogoniales de *Vicugna pacos* "alpaca" mediante el análisis de varianza después de 15 días de cultivo, existe diferencia significativa dentro de las dos variables, así como también hay interacción entre ambas ( $p < 0,05$ ). Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

<b>Fuente de variación</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Concentración SFB (%)	4	1.78253	0.445633	728.67	0.000
Temperatura (°C)	1	0.01867	0.018673	30.53	0.000
Concentración SFB (%) *Temperatura (°C)	4	0.02143	0.005357	8.76	0.000
Error	18	0.01101	0.000612		
Total	27	1.89265			



**Anexo 8.** Información agrupada por el método de Tukey con un nivel de confianza de 95 %, son significativamente diferentes las medias que no comparten una letra. 15 días de cultivo de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca", Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2018.

Temperatura (°C)*Concentración de SFB (%)	N	Media (x10 <sup>6</sup> )	Agrupación
38 2,5	3	0,895000	A
32 2,5	3	0,773333	B
38 5,0	3	0,768333	B
32 5,0	3	0,670000	C
38 0,0	3	0,373333	D
32 0,0	3	0,363333	D E
32 10,0	2	0,327500	D E
38 10,0	3	0,296667	E
38 20,0	2	0,192500	F
32 20,0	3	0,130000	F

**Anexo 9.** Antibióticos para suplementar 250 ml de medio de cultivo DMEM. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2017.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración por ml de DMEM</b>	<b>Concentración para 250 ml de DMEM</b>
Penicilina	100 UI/ml	2,5 ml
Estreptomicina	100 µg/ml	25 mg
Gentamicina	100 µg/ml	125 µl

**Anexo 10.** Preparación de solución Stock de Penicilina. (Penicilina G actividad de 1,668 UI/mg).

1 mg → 1668 UI

X mg → 100 UI

X = 0,059 mg/100UI

- Diluir 0,059 mg de Penicilina G en 10 ml de agua destilada estéril, se prepara en la cámara de flujo laminar. La solución stock se almacena en refrigeración y se utilizará alícuotas.

**Anexo 11.** Adición de Gentamicina y estreptomicina para 250 ml de medio de cultivo DMEM.

- La concentración de las ampollas de Gentamicina comercial es de 160 mg/2 ml, del cual se toma 125  $\mu$ l y se añade a 250 ml de DMEM.
- La Estreptomicina se pesa 25 mg directamente en la balanza analítica.

**Anexo 12.** Adición de enzimas para 250 ml de medio de cultivo DMEM. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Octubre 2017.

<b>Enzima</b>	<b>Concentración por ml de DMEM</b>	<b>Concentración para 250 ml de DMEM</b>
Tripsina	1 mg/ml	250 mg/250 ml DMEM
Colagenasa	1 mg/ml	250 mg/250 ml DMEM
Hialuronidasa	1 mg/ml	250 mg/250 ml DMEM
DNasa	5 µg/ml	657,5 µl/250 ml DMEM

### **Anexo 13.** Preparación de enzima DNasa I.

3,8 mg → 2000 µl NaCl 0,15 M

0,5 mg → X µl NaCl 0,15 M

X = 263 µl NaCl 0,15 M

- Añadir alícuotas de 263 µl por cada 100 ml de medio de cultivo DMEM.

**Anexo 14.** Descripción de medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle modificado de Dulbecco) SIGMA D5796 – 500 ml.

- 4500 mg/L de glucosa, L-glutamina y bicarbonato de sodio, sin piruvato de sodio, líquido, estéril-filtrado.
- Marca del producto : SIGMA
- Referencia del producto : D5796
- pH : 7,0 – 7,6
- Osmolalidad : 327 - 361 mOs/kg
- Nivel de endotoxinas : <= 1 EU/ml
- Concentración de glucosa : 4.05 - 4.95 g/l

**Anexo 15.** Descripción de SFB SIGMA F4135 – 100 ml.

- Referencia del producto : F4135
- Marca del producto : SIGMA
- Osmolalidad : 260 - 340 mOsm/kg H<sub>2</sub>O
- Proteínas totales : 3.0 - 4.5 g%
- pH : 6.7 - 8.0
- Nivel de endotoxinas : <= 10.0 EU/ml



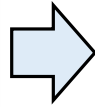
**Anexo 16.** Testículos de *Vicugna pacos* “alpaca” sacrificados en el Matadero Municipal de Huancavelica. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.



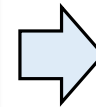
**Anexo 17.** Procedimiento para el aislamiento de espermatogonias. Laboratorio de biotecnología. UNSCH. Setiembre 2017.



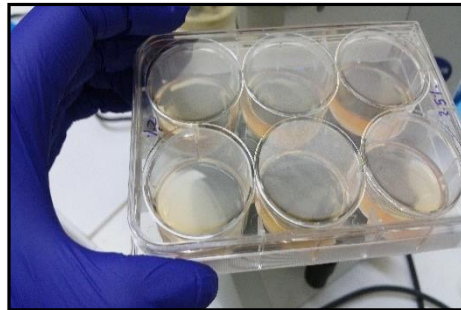
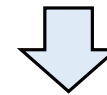
Descapsulación de los testículos



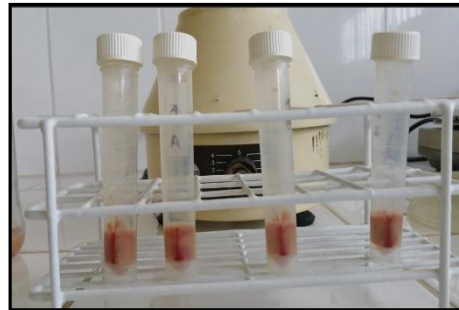
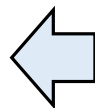
Trituración del parénquima testicular



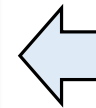
Obtención del filtrado denso de células testiculares



Cultivo de las espermatogonias



Obtención del paquete de células espermatogoniales



Digestiones enzimáticas

**Anexo 18.** Matriz de consistencia.

Título : Establecimiento *in vitro* de células espermatogoniales de *Vicugna pacos* “alpaca” Ayacucho – 2016  
 Autor : Bach. Marcial Antonio Pillaca Poma  
 Asesor : Dr. Fidel Mujica Lengua

PROBLEMA	OBETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p><b>General</b>                      ¿Cuáles serán las condiciones para el establecimiento <i>in vitro</i> de células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i>?</p>	<p><b>General</b>                      Establecer <i>in vitro</i> células espermatogoniales de <i>Vicugna pacos</i>.  <b>Específicos</b>                      a. Aislar espermatogonias de alpaca.                      b. Introducir <i>in vitro</i> las espermatogonias de alpaca.                      c. Evaluar la influencia de la temperatura y el suero fetal bovino en condiciones <i>in vitro</i>.</p>	<p><b>Antecedentes</b>                      Importancia socioeconómica de la alpaca.                      Fisiología reproductiva del macho y sus limitaciones.                      Avances en la aplicación de biotecnologías reproductivas.                      Diversidad de células testiculares en mamíferos.                      Aislamiento de espermatogonias por digestión enzimática.                      Espermatogénesis en mamíferos no primates.                      Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de espermatogonias.                      Condiciones para el cultivo <i>in vitro</i> de espermatogonias.                      Biomarcadores e identificación de SSC.</p>	<p>Los parámetros y condiciones adecuadas permitirán el establecimiento <i>in vitro</i> de células espermatogoniales</p>	<p><b>Variable Independiente</b>                      a. Temperatura de cultivo.                      b. Concentración de suero fetal bovino (SFB).  <b>Variable Dependiente</b>                      Establecimiento <i>in vitro</i> de células espermatogoniales de alpaca.                      Indicadores                      Viabilidad.                      Proliferación.</p>	<p><b>Investigación</b>                      Básica-Experimental.  <b>Diseño</b>                      Prospectivo, de corte longitudinal.  <b>Muestreo</b>                      No probabilístico del tipo muestreo por conveniencia.</p>



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Bach. Marcial Antonio PILLACA POMA

## RESOLUCIÓN DECANAL Nº 185-2023-UNSCH-FCB-D

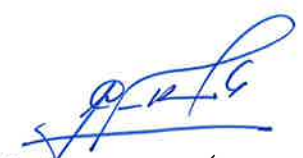
En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del veintinueve de septiembre del año dos mil veintitrés; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, presidido por el Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA; Dr. Pedro AYALA GÓMEZ (Miembro-Jurado); Mg. Sonia Haydee PALOMINO FELICES (Miembro-Jurado); Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA (Miembro-Asesor); actuando como secretario docente el Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR; para presenciar la sustentación de tesis titulada: “ **Establecimiento *in vitro* de células espermatogoniales de *Vicugna pacos* “alpaca” Ayacucho 2016**”; presentado por el Bach. Marcial Antonio PILLACA POMA; el Presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio al acto de sustentación, indicando al sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología. Culminada la exposición, el Presidente invitó a cada uno de los Miembros Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas al sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Pedro AYALA GÓMEZ	17	17	17
Mg. Sonia Haydee PALOMINO FELICES	18	18	18
PROMEDIO FINAL			18


El sustentante alcanzó el promedio de 18 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso del sustentante y el público al Auditorio dando a conocer los resultados, e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las cinco y cincuenta de la tarde; firmando al pie del presente en señal de conformidad.



Dr. Saturnino Martín BAUTISTA TENORIO  
Presidente



Dr. Pedro AYALA GÓMEZ  
Miembro - Jurado



Mg. Sonia Haydee PALOMINO FELICES  
Miembro – Jurado



Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA  
Miembro – Asesor



Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR  
Secretario Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

Nº 29-2023-FCB-D

Yo, VÍCTOR LUIS CÁRDENAS LÓPEZ, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: "**Establecimiento *in vitro* de células espermatogoniales de *Vicugna pacos* "alpaca" Ayacucho – 2016**" por **MARCIAL ANTONIO PILLACA POMA**; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 27%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario Nº 039-2021-UNSCH-C.

En tal sentido, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 17 octubre de 2023.

  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA  
  
-----  
Dr. Víctor Luis Cárdenas López  
DIRECTOR

Establecimiento in vitro de  
células espermatogoniales de  
Vicugna pacos "alpaca"  
Ayacucho – 2016  
*por* MARCIAL ANTONIO PILLACA POMA

**Fecha de entrega:** 17-oct-2023 09:17a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 2198621508

**Nombre del archivo:** A-POMA-Marcial-Antonio-pregrado\_tesis\_-\_2023\_TURNITIN\_PDF\_2.pdf (1.1M)

**Total de palabras:** 10471

**Total de caracteres:** 54899

# Establecimiento in vitro de células espermatozonales de Vicugna pacos "alpaca" Ayacucho - 2016

## INFORME DE ORIGINALIDAD



## FUENTES PRIMARIAS

1	<a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a> Fuente de Internet	4%
2	<a href="http://creativecommons.org">creativecommons.org</a> Fuente de Internet	4%
3	<a href="http://core.ac.uk">core.ac.uk</a> Fuente de Internet	4%
4	<a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a> Fuente de Internet	4%
5	<a href="http://cybertesis.unmsm.edu.pe">cybertesis.unmsm.edu.pe</a> Fuente de Internet	3%
6	<a href="http://repositorio.unsch.edu.pe">repositorio.unsch.edu.pe</a> Fuente de Internet	3%
7	<a href="http://datospdf.com">datospdf.com</a> Fuente de Internet	1%
8	<a href="http://lookformedical.com">lookformedical.com</a> Fuente de Internet	1%
9	<a href="http://andina.pe">andina.pe</a> Fuente de Internet	



1 %

10 [doczz.es](http://doczz.es)  
Fuente de Internet

<1 %

11 Adams, Gregg P., Cordero, Aída, Huanca, Teodosio and Huanca, Wilfredo.  
"Biotecnologías reproductivas en camelidos sudamericanos domesticos:avances y perspectivas", Asociacion Latinoamericana de Produccion Animal, 2007.  
Publicación

<1 %

12 [scielo.isciii.es](http://scielo.isciii.es)  
Fuente de Internet

<1 %

13 Submitted to Universidad de San Martín de Porres  
Trabajo del estudiante

<1 %

14 [repositorio.unap.edu.pe](http://repositorio.unap.edu.pe)  
Fuente de Internet

<1 %

15 [cibnor.repositorioinstitucional.mx](http://cibnor.repositorioinstitucional.mx)  
Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía Activo