

Maduración nuclear e integridad del ADN espermático de “alpaca” en semen fresco y congelado. INIA - Ayacucho, 2019

por Harumi Rebeca Orellana Berrocal

Fecha de entrega: 20-jun-2024 10:57a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2405809715

Nombre del archivo: ORELLANA-BERROCAL-Harumi-Rebeca-pregrado_Tesis-2024-TESIS.pdf (2.48M)

Total de palabras: 13914

Total de caracteres: 69093

⁶
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Maduración nuclear e integridad del ADN espermático
⁶
de “alpaca” en semen fresco y congelado. INIA -
Ayacucho, 2019

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

Presentado por la:

Bach. ORELLANA BERROCAL Harumi Rebeca

Asesor:

Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua

Co asesores:

M.V. Mijail Contreras Huamaní

Blga. Crissthel Yverlin Guillen Palomino

AYACUCHO –PERÚ

2024

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación y el uso de biotecnologías reproductivas, como la Inseminación Artificial (IA) y Fertilización *in vitro* (FIV) con semen congelado en Camélidos Sudamericanos (CSA), no ha tenido el mismo éxito que en los bovinos y otras especies de interés productivo. En CSA, existen estudios sobre la aplicación de la IA con semen congelado. Sin embargo, aún no se han superado las dificultades existentes referidas de la baja calidad espermática que se obtiene después de procesos de congelación y descongelación, aun cuando se han utilizado diferentes protocolos de criopreservación, limitándose al uso de semen fresco (Banda et al., 2010; Carretero et al., 2015; W. Huanca et al., 2007).

La baja tasa de supervivencia al proceso de criopreservación, como se ha sugerido para otras especies implica factores como la susceptibilidad de cada especie, componentes de los dilutores y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha demostrado que niveles altos de ROS pueden causar efectos nocivos en la disminución de la movilidad y viabilidad espermática, inducir una capacitación espermática prematura, aumentar la peroxidación de ácidos grasos insaturados de la membrana espermática y dañar la integridad del ADN espermático (Santiani et al., 2012).

Como parte de la espermiogénesis, durante la etapa final de la diferenciación de los espermatozoides, el ADN se somete a una reestructuración para un empaquetado más ajustado y menos vulnerable, mediante la sustitución del 85 % de la red suelta de histonas por las protaminas (Simon et al., 2011), proceso normal de madurez nuclear para una condensación normal del núcleo (Fernández Valadés et al., 2001). Se ha informado que existe una relación entre la protaminación anormal de la cromatina espermática y el daño oxidativo (ROS) del ADN, apoyándose en que la remodelación deficiente de la cromatina es una de

las principales causas ⁷ de daño en el ADN de los espermatozoides (Simon et al., 2011).

Por todo lo mencionado anteriormente, se han desarrollado diferentes tipos de análisis espermático, como es el caso de la evaluación de la madurez nuclear mediante ¹ la tinción con azul de anilina y la ¹ evaluación de la integridad del ADN mediante ³ la prueba de la dispersión de la cromatina (SCD) con el objetivo de estimar ³ la capacidad fecundante ³ de una muestra de semen fresco o congelado utilizado en la IA y FIV.

Los objetivos del presente trabajo de investigación, fueron los siguientes:

Objetivo general

- Evaluar la maduración nuclear e integridad del ADN espermático ⁶ de alpaca en semen fresco y congelado.

Objetivos específicos

- Determinar la maduración nuclear de espermatozoides de alpaca en semen fresco y congelado
- Determinar la integridad ⁶ del ADN espermático de alpaca en semen fresco y congelado.
- Determinar el tamaño de halo relativo de ² la dispersión de la cromatina espermática ¹ para la evaluación de la integridad del ADN de alpaca.
- Determinar el efecto de la criopreservación ¹ de semen sobre la maduración nuclear e integridad del ADN espermático de alpaca.
- Determinar el efecto de la criopreservación sobre las características microscópicas espermáticas de alpaca en semen fresco y congelado.

3 II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Existen pocos reportes de estudios sobre la evaluación de la madurez nuclear e integridad del ADN espermático en *Vicugna pacos* (alpaca). Sin embargo, hay evidencias de otros estudios que han incorporado métodos para la evaluación en bovinos, llamas, ovinos y otras especies de interés económico.

Al cuantificar la presencia de espermatozoides con cromatina dañada e inmadura mediante la tinción de azul de toluidina (AT) y azul de anilina (AN) respectivamente, en semen criopreservado de toros Brahman, donde se presentó efectos del toro y el eyaculado en el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada ($P < 0,05$): siete eyaculados presentaron espermatozoides con cromatina inmadura; así como una correlación entre el porcentaje de espermatozoides con cromatina dañada y con cromatina inmadura, concluyendo que la tinción con AT y AN estiman de manera independiente las características de la cromatina (Nava-Trujillo et al., 2016).

En humanos, a partir del análisis de 51 eyaculados de semen teñidos AN para distinguir espermatozoides maduros e inmaduros, se aplicó AN en 12 eyaculados tratados por centrifugación en gradiente de densidad para comparar las tasas de espermatozoides inmaduros antes y después de la selección. El estudio proporcionó datos sobre la correlación entre la calidad del material nuclear espermático y los defectos morfológicos, principalmente las anomalías de la cabeza del espermatozoide, concluyendo que se debe continuar y profundizar en el estudio de la calidad de la cromatina espermática en varones infértiles para comprender mejor su relación con la capacidad fecundante y evaluar mejor su impacto en los resultados de la fecundación *in vitro* y el desarrollo embrionario (Sellami et al., 2013).

En otro estudio, al analizarse muestras de semen de varones en dos grupos (infértiles idiopáticos y normospermicos), la media de la morfología normal de los

espermatozoides fue menor en los varones infértiles idiopáticos en comparación con los varones normozoospermicos; la movilidad progresiva se correlacionó negativamente con la tinción AN y AT en ambos grupos, pero no hubo diferencias significativas entre la tinción AT y la movilidad progresiva en el grupo de varones con normozoospermia. También encontraron una correlación negativa entre la integridad de la cromatina espermática con la concentración, morfología normal y la movilidad progresiva por la tinción de AN y AT, sugiriendo que el valor de especificidad y sensibilidad del AN y AT fueron considerados como predictores de la infertilidad masculina (Pourmasumi et al., 2019).

Al observar tasas de formación y escisión de embriones durante el período de 3 días después de ICSI, no se encontró una correlación significativa entre la madurez de la cromatina y la formación de embriones o la tasa de escisión; así como la integridad de la cromatina en el desarrollo del cigoto; además, encontraron que el valor de corte de la madurez de la cromatina del espermatozoide y la integridad de los eyaculados normozoospermicos fértiles fueron 87,2 % y 80,2 %, respectivamente; además usando los puntos de corte se mostró que la mala madurez e integridad de la cromatina de los espermatozoides (AN <87 % y AT <80 %, respectivamente) podrían afectar el desarrollo del cigoto después de ICSI (Asmarinah et al., 2016).

Los métodos de separación espermática, *swim up* y gradiente de percoll, sobre la movilidad, viabilidad, concentración, integridad de membrana plasmática e integridad del ADN espermático criopreservado de alpaca. La evaluación de la integridad del ADN se realizó con la tinción de AT, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre los métodos *swim up* y gradiente de percoll en la movilidad (13,13 y 15,60 %), concentración (36,67 y 80,51 %); viabilidad (54,19 y 53,45 %) e integridad de membrana plasmática (56,30 y 57,18 %), respectivamente. En cuanto a la integridad del ADN encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambos métodos de separación espermática ($p \leq 0.05$), concluyendo que ambos métodos causaron daño a los espermatozoides (Contreras, 2017).

Durante la evaluación del efecto que tienen los diferentes procesos de criopreservación de semen sobre la cromatina espermática de llama y el uso de dos métodos que evalúan alteraciones de la cromatina espermática (AT y SCD). En semen refrigerado, observaron un aumento de la descondensación de la cromatina en comparación al semen fresco. En el proceso de congelamiento

profundo usaron dos crioprotectores: glicerol (G) y dimetilformamida (DMF) y dos curvas de estabilización: temperatura ambiente (TA) y 5°C, donde observaron que el semen estabilizado a 5°C y los demás protocolos de congelamiento presentaron un número significativo de espermatozoides con alteración en la condensación de la cromatina, también los procesos de desecación y deshidratación no alteraron la condensación de la cromatina en el semen criopreservado a corto plazo. Sin embargo, observaron aumento de la descondensación y fragmentación de la cromatina espermática en el semen desecado y deshidratado (Carretero, 2011). Por otro lado, se evaluó el grado de fragmentación del ADN espermático mediante la prueba SCD en muestras seleccionadas mediante *swim up*, así como en congeladas, descongeladas y sometidas a estrés oxidativo con H₂O₂. Durante la evaluación objetiva, se observó que la menor fragmentación se asociaba a un mayor área del halo, aunque también se observó un aumento en el tamaño del área del núcleo, el tratamiento oxidante aumentó el índice de fragmentación espermática de forma dosis-dependiente sin afectar la viabilidad y la movilidad espermática; sin embargo, la selección espermática disminuyó el índice de fragmentación, concluyendo que existe cierta susceptibilidad individual (Cicaré et al., 2016).

Al analizar el volumen, color, movilidad, concentración, viabilidad, morfometría, integridad de la membrana e índice de fragmentación del ADN espermático de alpaca, colectado por desviación de los conductos deferentes (DCD), por electroeyaculación (EE) y mediante poscópula (PC), encontraron diferencias estadísticas significativas entre los métodos de colecta; también observaron un menor porcentaje de índice de fragmentación del ADN espermático (DFI) en semen colectado mediante PC y EE, evaluado mediante la prueba SCD (Huanca et al., 2020).

Finalmente, se probaron tres concentraciones de 2-Mercaptoetanol (2,5 %, 5 % y 10 %) para aplicar la prueba SCD en la evaluación de la integridad del ADN espermático de llamas, para lo cual en el control positivo también probaron tres tratamientos (incubación a 100 °C durante 30 min, incubación con NaOH 0,3 M durante 30 min a temperatura ambiental y exposición a luz ultravioleta durante 2 h). Después del análisis de los resultados seleccionaron la concentración del 5 % de 2-Mercaptoetanol para usar en la prueba de SCD, porque produjo el halo más grande mientras conservaba la estructura del núcleo. Todos los tratamientos

utilizados como controles positivos fueron eficaces para producir la fragmentación del ADN (Carretero et al., 2012).

2.2. Alpaca (*Vicugna pacos*)

La alpaca entre los CSA domésticos es la especie más pequeña, con un peso aproximado entre 55 y 65 Kg. Su fibra puede medir hasta 50 cm de largo, con un diámetro de 12 a 28 μm , siendo más resistente que la lana de oveja, por lo tanto, tiene un costo alto en el mercado internacional (Evangelista, 2015).

La alpaca produce una cría al año, con una media de vida entre 15 y 25 años. Durante la cópula de los CSA, la postura, la duración y el patrón de eyaculación han sido las limitantes para la reproducción, generando el uso de biotecnologías reproductivas como es el caso de la inseminación artificial para acelerar la propagación de esta especie con un alto valor genético (Evangelista, 2015).

2.3. Características del semen de alpaca

El semen es una suspensión celular líquida, donde la parte líquida es conocida como plasma seminal ¹ que contiene espermatozoides y secreciones de los ¹ órganos accesorios del aparato reproductor masculino (Hafez & Hafez, 2002).

2.3.1. Volumen

En la alpaca, la longitud ¹⁶ media del testículo se encuentra entre 3 a 5 cm y de 15 a 18 g de peso, por ello, ¹⁶ producen menos espermatozoides al día en comparación con el carnero y el toro. Cabe mencionar también que existe una variabilidad del volumen ¹⁶ del eyaculado entre individuos y en el mismo individuo de una colección a otra, ¹⁶ según el estado fisiológico del macho, la edad, tamaño, número, factores higiénicos, alimentarios y tipo de colección (Ciprian, 2018; Trujillo, 2019).

2.3.2. Viscosidad y filancia

La viscosidad ¹ es una característica común en el semen de los camélidos, siendo un obstáculo ¹ para el desarrollo de la criopreservación y la inseminación artificial (Ciprian Achircana, 2018). También afecta en la ¹ mezcla homogénea del semen con el dilutor (Kershaw-Young & Maxwell, 2011).

La filancia es la capacidad del semen para formar un hilo, ¹ una característica diferente a la viscosidad ¹ observada en alpacas (Giuliano, 2012).

2.3.3. Color

El color del semen ¹⁶ varía según la concentración de espermatozoides, de blanco lechoso a blanco cristalino, también depende de la presencia de contaminación con otros fluidos y elementos anormales (Ciprian, 2018).

2.3.4. Espuma

La presencia de espuma en los eyaculados se debe al continuo movimiento del pene en sentido cráneo caudal y rotación simultanea dentro de la vagina artificial durante la colecta de semen (Cavalcanti, 2013).

2.3.5. ¹pH

En las alpacas, los valores de pH son cercanas a la neutralidad, con tendencia a la alcalinidad, esto ¹ aumenta si se presenta alguna contaminación con orina. Algunos autores mencionan que el pH del semen varía entre 7,1 a 8,3 (Ciprian, 2019; Trujillo, 2019).

2.3.6. Movilidad

Es uno de los ¹ parámetros más utilizados en la valorización de la calidad seminal. En la alpaca ¹ debido a la viscosidad y filancia del plasma seminal, no se observa la movilidad ¹ masal y la movilidad progresiva individual es muy lenta comparado al bovino y ovino (Hafez & Hafez, 2002). Algunos autores encontraron valores aproximados entre 41.4 y 70.72 % de la movilidad espermática de alpaca (Ciprian, 2018).

2.3.7. Viabilidad

El porcentaje de espermatozoides viables ¹ se evalúa identificando aquellos con una membrana celular ¹ intacta, basándose en el principio de que las membranas ¹ plasmáticas dañadas permiten la entrada de tinciones impermeables a la ¹ membrana (WHO, 2010). Algunos autores encontraron valores aproximados entre 52.32 y 78,27 % de la viabilidad espermática de alpaca (Ciprian, 2018).

2.3.8. Concentración

¹² La concentración espermática es el número de espermatozoides por unidad de volumen, expresada en millones por mililitro de eyaculado (mill/ml) (Hafez & Hafez, 2002). En alpacas es muy variable, debido a diferencias individuales y el método

de colección, llegando a variar de 30 a 150 mill/ml (Ciprian, 2018); Vaughan et al., 2002).

2.3.9. Integridad de membrana

¹² La integridad y la actividad funcional de la membrana espermática no solo es importante para el metabolismo de los espermatozoides, sino que ayuda en la unión de los gametos masculinos y femeninos en el proceso de la fertilización (Trujillo, 2019). El proceso de congelación-descongelación seminal produce cambios en la integridad estructural y funcional de la membrana como en el caso de la pérdida de la permeabilidad de membrana y fusión de sus partes lo que genera quiebres en la membrana y puede generar pérdida de componentes intracelulares como nucleótidos y dinucleótidos (Rubio et al., 2009).

2.4. Espermatogénesis

¹⁵ La espermatogénesis se desarrolla en los túbulos seminíferos de los testículos, el epitelio está compuesto por dos tipos básicos de células: las células de Sertoli y las células germinales en desarrollo (Hafez & Hafez, 2002). Está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo; la hipófisis es estimulada por el hipotálamo al secretar la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y esta genera la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). La LH estimula la secreción de testosterona y otros andrógenos por las células de Leydig, ¹⁴ la cual a su vez estimula al hipotálamo a liberar GnRH y la FSH estimula ¹⁴ a las células de Sertoli para producir inhibina, la cual tiene un efecto de *feedback* negativo para limitar la producción de FSH. ¹⁴ La testosterona es importante para la iniciación y el mantenimiento de la espermatogénesis, por ello, se necesita una cantidad alta de testosterona para la iniciación, pero menor cantidad para el mantenimiento, y esto es disminuida por las células de Sertoli (Pacheco, 2011). Todo el proceso espermatogénico puede dividirse en cuatro fases:

2.4.1. Espermatocitogénesis (fase mitótica)

¹³ A partir de la pubertad algunas células madre espermatogoniales permanecen en reposo, las espermatogonias A₁ u oscuras (2n); mientras que otras empiezan a proliferarse por mitosis convirtiéndose en espermatogonias A₂ o claras (2n), estas últimas continúan dividiéndose, dando origen a tres o cuatro generaciones más, A₃, A₄, intermedias (In) y B. ¹³ Las espermatogonias B aumentan de tamaño y entran nuevamente en mitosis transformándose en espermatoцитos primarios, estas se

unen entre sí por puentes intercitoplasmáticos, manteniendo el contacto durante su diferenciación lo que permite coordinar su desarrollo (Arteaga & Garcia, 2013).

2.4.2. Fase meiótica

Durante esta fase ocurre la recombinación genética y el intercambio de información genética. Se compone de dos divisiones, meiosis I y II. La etapa de leptoteno de la primera profase (meiosis I) tiene lugar en el compartimento basal del epitelio germinal, luego los espermátocitos atraviesan la barrera de las células de Sertoli y alcanzan el compartimento adluminal donde se desarrollan las otras etapas. Los espermátocitos primarios se transforman en secundarios reduciendo a la mitad su carga cromosómica. Luego los espermátocitos secundarios se someten a una segunda división meiótica y forman células haploides llamadas espermátidas (Ahmad, 2011).

2.4.3. Espermiogénesis

Son cambios morfológicos progresivos que incluyen condensación de la cromatina, formación de la cola y desarrollo del casquete acrosómico de las espermátidas redondas, hasta transformarse en espermatozoides. Se divide en cuatro fases:

Fase de Golgi. En esta fase ocurre la formación de gránulos proacrosómicos, la coalescencia de estas en uno solo y su adhesión a la envoltura nuclear. Así mismo, se desarrolla las etapas tempranas de la formación de la cola en el polo opuesto al de la adhesión del gránulo acrosómico, finalmente el centriolo proximal se acerca más al núcleo (Hafez & Hafez, 2002).

Fase de encasquetamiento. Comprende la dispersión del gránulo acrosómico adherente en la superficie del núcleo. Este proceso continúa hasta que dos tercios de la porción anterior del núcleo queda cubierto por un delgado saco membranoso de doble capa que se adhiere a la envoltura nuclear. Los componentes axonémicos de la cola en desarrollo, formados a partir de elementos del centriolo distal, se alargan más allá de la periferia del citoplasma (Hafez & Hafez, 2002).

Fase acrosómica. En esta fase el acrosoma se dirige hacia la base o parte externa del túbulo seminífero y la cola se dirige hacia la luz. Ocurren cambios en el núcleo, acrosoma y cola de la espermátida en desarrollo. Los cambios nucleares incluyen condensación de la cromatina en gránulos densos y remodelación del núcleo de esferoide a uno alargado y aplanado, también las histonas nucleares

son sustituidas progresivamente por proteínas transicionales. El acrosoma también se condensa y alarga. El citoplasma es desplazado a la parte caudal del núcleo donde rodea la parte proximal de la cola, dentro del citoplasma, los microtúbulos se asocian y forman una vaina cilíndrica llamada manguito, dentro de este el cuerpo cromatoide se condensa alrededor del axonema para formar el anillo citoplasmático. Las mitocondrias comienzan a concentrarse cerca del axonema (Hafez & Hafez, 2002).

Fase de maduración. Comprende la transformación final de las espermátidas alargadas en células que serán liberadas en la luz del túbulo seminífero. Dentro del núcleo, los gránulos de cromatina experimentan condensación progresiva, mientras que las proteínas transicionales son sustituidas por protaminas que se transforman en un material homogéneo que llena de manera uniforme todo el núcleo espermático. El anillo citoplasmático migra distalmente desde su posición adyacente al núcleo. Las mitocondrias se empacan en una vaina continua que se extiende desde el cuello hasta el anillo citoplasmático. En las últimas etapas el manguito desaparece y la célula de Sertoli forma el citoplasma restante (Hafez & Hafez, 2002).

2.4.4. Espermiación

Es la liberación de las células germinales formadas al interior de los túbulos seminíferos. Las espermátidas alargadas que se orientan perpendicularmente a la pared tubular sobresalen poco a poco hacia la luz del túbulo. Los lóbulos del citoplasma residual permanecen incrustados en el epitelio. Con la rotura del tallo se forma la gota citoplasmática en la región del cuello de los espermatozoides liberados (Hafez & Hafez, 2002).

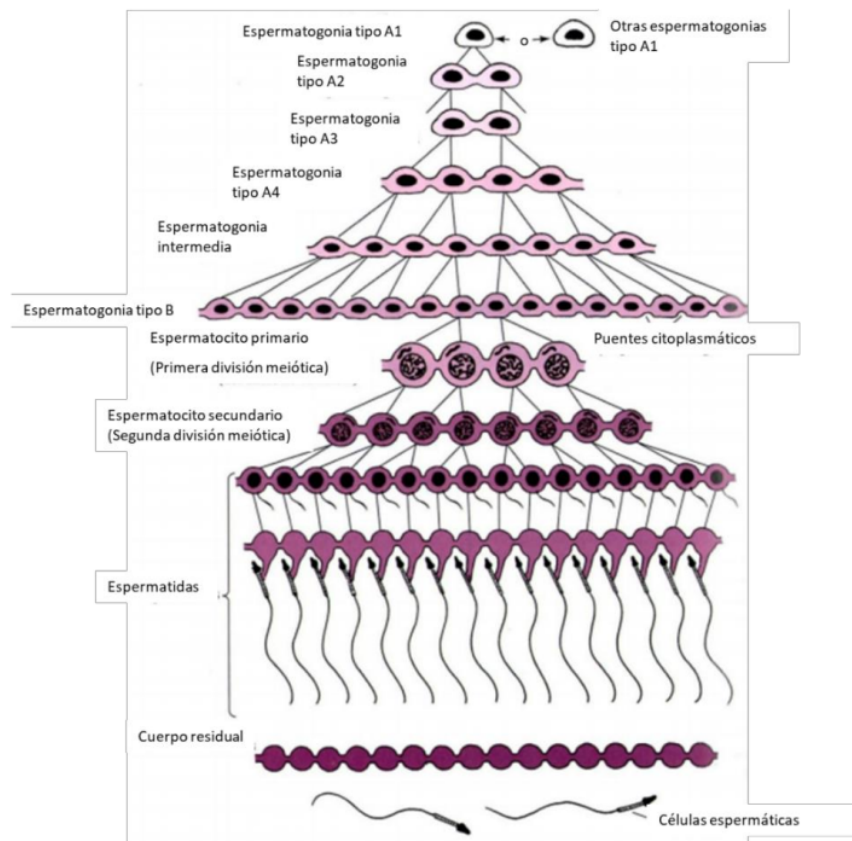


Figura 1. Proceso de la espermatogénesis. Se observa el proceso desde la espermatocitogénesis con la espermatogonia de tipo A1 hasta la espermiación con las células espermáticas maduras (Ortiz, s/f).

2.5. Maduración nuclear espermática

2.5.1. Histonas

La cromatina de los espermatozoides a nivel estructural y molecular es distinto a los ovocitos y células somáticas, ya que en estas últimas la cromatina está cubierta por nucleosomas formados por las histonas, proteínas que juegan el rol del empaquetamiento y ordenamiento del ADN en el núcleo (Moritz & Hammoud, 2022). Durante las primeras etapas de la espermatogénesis el ADN de las células madre espermatogoniales están enrolladas en octámeros de histonas canónicas (H2A, H2B, H3 y H4), estas histonas sufrirán modificaciones postraduccionales permitiendo la relajación de la estructura de la cromatina y promoviendo el

reemplazo con las variantes de histonas y específicas del testículo (H1t, H2A.X., H2A.Z., H3.3, H3t, TH2A, TH2B, H2AL.1/2, Hils) (Soler-Ventura et al., 2020). Este evento ocurre en las espermatidas redondas, siendo la hiperacetilación y la ubiquitinación importante en el intercambio de histonas por protaminas. La ubiquitinación agrega un gran grupo químico a la histona del núcleo que induce el impedimento estérico que ayuda a la apertura de la cromatina. Mientras tanto, las histonas desacetilasas (Hdac) sobrantes de la meiosis, profase I; se degradan las variantes de histonas necesario para abrir la cromatina y permitir el intercambio de histonas con proteínas de transición (Tnp) (Champroux et al., 2016).

2.5.2. Proteínas de transición nuclear

En la rata, ratón, cerdo, toro, oveja y el hombre se han identificado cuatro proteínas de transición (Tnp 1-4). La Tnp1 es una proteína pequeña de 54 aminoácidos rica en arginina, lisina y serina, algunas pueden poseer cisteínas. La Tnp2 es de mayor tamaño que la Tnp 1, conteniendo entre 117 y 138 aminoácidos dependiente de la especie ya también contienen gran número de residuos de serina, prolina y cisteína (Lorences, 2009). Están codificados por dos genes (*tnp1* y *tnp2*). Las proteínas Tnp se fosforilan en su extremo C-terminal, siendo un requisito previo para unirse al ADN y posteriormente se eliminan para aumentar la afinidad por Tnp-ADN y la condensación de cromatina. Tnp1 se expresa fuertemente y se distribuye uniformemente en el núcleo de las espermatidas mientras que la expresión de Tnp2 varía según la especie (Champroux et al., 2016). Se sugiere que estas proteínas estabilizan el ADN tras la eliminación de los supenrenrollamientos y promueven la condensación también se incorporan a la cromatina y ocupan parte del genoma en las espermatidas que se alargan, actuando como intermediarios entre las histonas y las protaminas (Moritz & Hammoud, 2022). Además, pueden que participar en la reparación de las roturas del ADN que se producen durante la espermiogénesis (Lorences, 2009).

2.5.3. Protaminas

Son las proteínas presentes en mayor cantidad en el espermatozoide maduro y empaquetan el genoma dentro del núcleo espermático, estas reemplazan a las Tnps durante la fase de la en espermátida elongada. Se conocen dos tipos de protaminas: Prm1 y Prm2. La Prm1, se expresa en todos los mamíferos mientras que Prm2 se expresa en el ratón, rata, humano y algunas especies de hámster

(Steger & Balhorn, 2018; Vasquez, 2012). ¹ Son codificadas por los genes *prm1* y *prm2*, respectivamente. Los genes *prm* se expresan al mismo tiempo en espermátidas redondas y los ARNm correspondientes se almacenan e inactivan durante unos 10 días, hasta la etapa de elongación. Se fosforilan inmediatamente después de la traducción del ARNm, durante la translocación de las proteínas al núcleo. Esta fosforilación es necesaria para la unión al ADN, lo que aumenta la afinidad del Prm-ADN y la condensación de la cromatina. Prm1 se traduce como una proteína madura de aproximadamente 50 aminoácidos, compuesta de un dominio central rico en arginina y de dominios cortos ricos en cisteína. Por su parte, Prm2 se sintetiza como una proteína precursora de aproximadamente 100 aminoácidos, sus dominios de poli-arginina se intercalan a lo largo de la Prm2 (Balhorn, 1989). La Prm2 unida al ADN va madurando progresivamente mediante sucesivas escisiones proteolíticas de su extremo N, un proceso que lleva varios días, aumentando la condensación de la cromatina paso a paso (Champroux et al., 2016). ¹ Las protaminas condensan fuertemente el núcleo del espermatozoide ¹ así adquiere una forma más hidrodinámica, con mayor velocidad y probabilidad de fecundar, también es menos accesible a nucleasas o mutágenos, una característica clave para permitir la entrega de información genética ininterrumpida al embrión, limitando las mutaciones y asegurando la perpetuación de la especie (Ribas-Maynou et al., 2021). La ¹ molécula de Prm1 se une a 10-11 pb de ADN, mientras que la Prm2 a 15 pb, esta unión permite la neutralización de las cargas negativas a lo largo de la estructura fosfodiéster del ADN, permitiendo una unión más fuerte de estas proteínas a las moléculas adyacentes del ADN (Vasquez, 2012).

2.5.4. La estructura final de la cromatina del espermatozoide

Cromatina espermática unida a protaminas. ¹ Mientras que las histonas compactan el ADN formando nucleosomas, las protaminas enrollan y condensan el ADN en subunidades conocidas como toroides. La Prm1 envuelve al ADN de doble cadena en un surco de la doble hélice mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno con el esqueleto del ADN, cubriendo aproximadamente 11 pb (Bench et al., 2000), lo que permite que el ADN se curve en una conformación exclusiva de la cromatina de espermatozoide. Después de la unión, debido a la presencia de numerosos residuos de cisteína, se forman inicialmente puentes disulfuro intramoleculares para estabilizar la interacción Prm1-

ADN. Posteriormente, los puentes disulfuro intermoleculares formados entre las Prms hacen que las fibras de ADN adyacentes se acerquen más para una compactación más fuerte de la cromatina provocando la formación del toroide, este complejo toroidal de ADN-protamina es de aproximadamente 50 kb, que miden entre 60 y 100 nm de diámetro y 20 nanómetros de espesor (Björndahl & Kvist, 2009; Ribas-Maynou ⁸ et al., 2021).

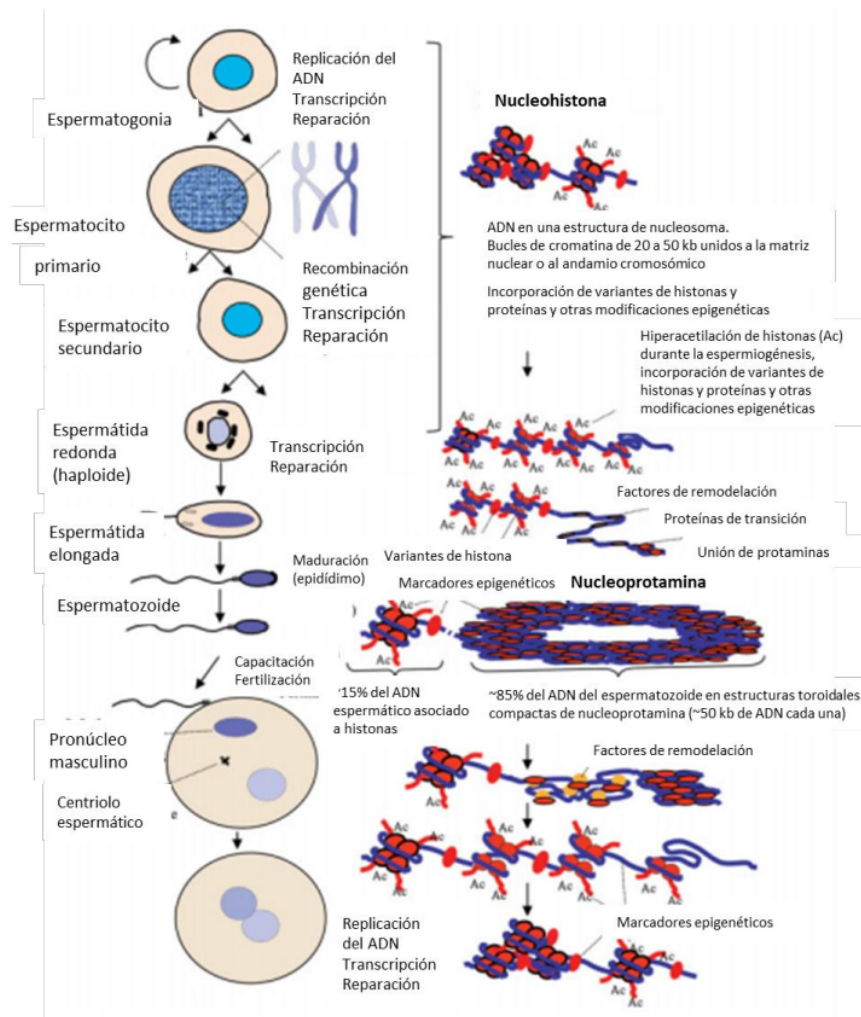


Figura 2. Representación esquemática de los cambios de la cromatina. Se desarrolla durante la espermatogénesis; en el lado izquierdo de la figura se observa los cambios celulares durante la espermatogénesis y primeras fases del desarrollo embrionario. Al lado derecho, los cambios de la cromatina durante la transición nucleohistona a nucleoprotamina y en las fases iniciales del desarrollo embrionario. Las histonas están representadas en color rojo y el ADN se marca como líneas azules (Oliva et al., 2009a).

Cromatina espermática unida a histonas. Entre un 5 y 15 % de la cromatina espermática se encuentra unida a histonas. Las histonas se intercalan a través del

genoma, están asociadas a ADN enriquecido en regiones reguladoras de genes y genes implicados en procesos de desarrollo y factores de transcripción embrionaria (Barrachina et al., 2018) (Morrell & Abraham, 2020), también están presentes en dos tipos de distribución, en zonas del ADN de 10 a 100 Kb relativamente largas y en las zonas cortas intercaladas a través del genoma, siendo importante en la organización estructural de la cromatina espermática. Al ser sensible a nucleasas las regiones de unión entre cada toroide de protaminas de la fibra de cromatina estas están formadas por ADN unido a histonas, (Santiso, 2013; Sotolongo et al., 2003), las histonas entran en modificaciones postraduccionales esto genera que las histonas representen un código epigenético que después de la fertilización participe en la regulación de la expresión genética derivada del padre (Steger & Balhorn, 2018).

Regiones de unión a la matriz. La matriz nuclear es un entramado de fibras citoesqueléticas proteicas que organiza a la cromatina en dominios de bucles funcionales de ADN que están unidos en sus bases a la matriz nuclear proteica, cada uno de estos bucles de ADN forma un toroide de protaminas-ADN y estos se unen a través de un ADN no condensado, denominado región conectora toroidal (TLR) al sitio de unión de la matriz nuclear. Sobre esta base, se ha sugerido que la unión de estos dominios de bucle es el sitio de origen de la replicación del ADN en el cigoto y ayudan en la regulación de la replicación del ADN y en la transcripción génica (Moritz & Hammoud, 2022; Ribas-Maynou et al., 2021). Por ello la función principal de la matriz nuclear es proporcionar un andamio funcional sobre el cual organizar el ADN, así la célula puede acceder y utilizar eficientemente la información codificada en el ADN (Gawecka et al., 2015).

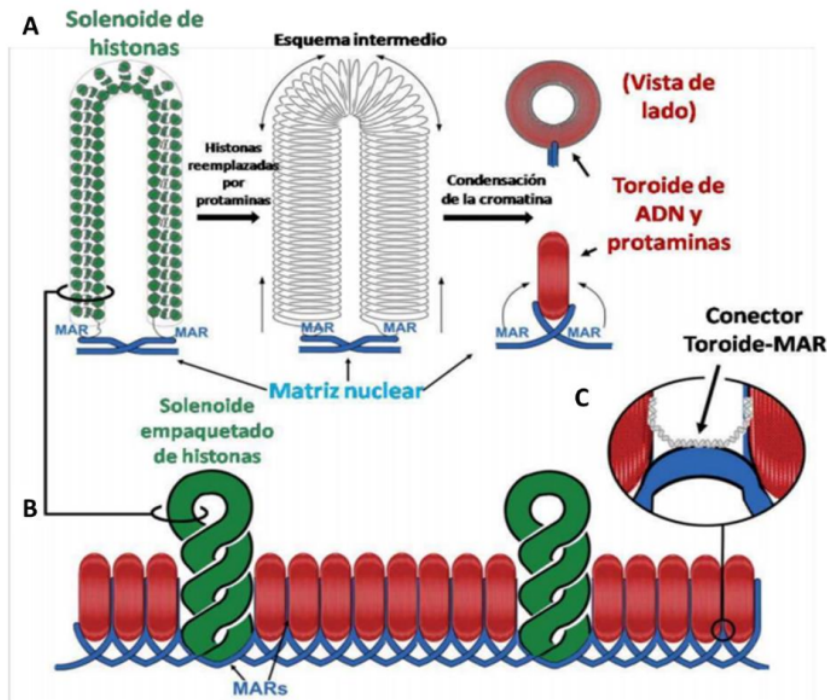


Figura 3. Principales elementos estructurales de la cromatina espermática. A: durante la espermiogénesis, las histonas son reemplazadas por protaminas condensando al ADN en forma de toroides altamente compactos. Cada protamina del toroide es un dominio de "loop". B: los toroides son organizados lado a lado, también se observa que algunos fragmentos del ADN retienen histonas (solenoide verde). C: las cadenas del ADN que se unen a los toroides de protaminas (Ward, 2009).

2.6. Integridad del ADN espermático

2.6.1. Defectos en la remodelación de la cromatina espermática

Para el intercambio de histonas por protaminas se producen roturas, a cargo de la topoisomerasa, en la cadena del ADN para eliminar el estrés torsional resultante de la eliminación de histonas y pérdida de los nucleosomas (Kumaresan et al., 2020). Este proceso debe ser regulado estrictamente para asegurar la reparación de todas las roturas. Por ello, si la espermatogénesis es alterada por cualquier motivo, las roturas podrían quedar sin reparar y por tanto, el espermatozoide, carente de capacidad de reparación por sí mismo, es liberado del epitelio germinal con estas roturas en el ADN (Santiso, 2013). También las deficiencias en la

protaminación se han asociado con la fragmentación del ADN espermático y la infertilidad humana (Posado, 2014), esto debido a las modificaciones postraduccionales irregulares de las histonas canónicas, alteraciones en la secuencia genética de Prm1 y Prm2, así como también alteraciones en las vías reguladoras de protaminación (Nagaki et al., 2022). La presencia de estas roturas en el ADN puede ser también indicativo de un proceso de maduración incompleta (Lorences, 2009).

2.6.2. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce cuando hay una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) por parte de los leucocitos activados y/o macrófagos, de los espermatozoides anormales y una disminución de la capacidad antioxidante del semen (Lorences, 2009). Cuando las células germinales masculinas están en diferenciación son muy sensibles al estrés oxidativo y dependen de la protección que ofrecen las células de Sertoli. Sin embargo, cuando los espermatozoides son liberados del epitelio germinal, ya no son protegidos por estas células siendo vulnerables al ataque oxidativo. Además, los espermatozoides también generan ROS durante la regulación de procesos de capacitación espermática (Aitken & Curry, 2011). Las principales lesiones debido a daño oxidativo son: (1) roturas de ADN de cadena sencilla o de cadena doble, (2) pérdida de una base para dar lugar a un sitio abásico, (3) modificación química de las bases (oxidación o alquilación), (4) entrecruzamientos del ADN intra-cadena y (5) ADN-proteína (Santiso, 2013).

2.6.3. Apoptosis defectuosa

En los testículos, las células germinales se expanden en varios ciclos de mitosis antes de iniciar su diferenciación a espermatozoides maduros. Esta expansión es excesiva y está equilibrada por las células de Sertoli mediante un mecanismo de apoptosis selectivo (Hikim & Swerdloff, 1999) controlando la sobreproducción de espermatozoides y restringiendo el nivel de proliferación durante condiciones desfavorables. La presencia de marcadores apoptóticos en los espermatozoides (*Fas*, *Bcl-X*, *p53* y *anexina V*), confirman la generación de roturas en el ADN (Kumaresan et al., 2020). Un error en la apoptosis permite que los espermatozoides anómalos, con funciones bioquímicas irregulares y daño en el ADN, no sean eliminados presentándose en el eyaculado, pudiendo llegar a

fertilizar al ovocito lo que resultaría en una pérdida embrionaria temprana (Sakkas et al., 2002).

2.6.4. ¹ Otros factores

Los factores físicos y químicos que podrían afectar al ADN son: la temperatura elevada por un proceso febril o ambiental, ¹ la exposición a tóxicos ambientales o industriales, el tabaco, la cafeína, ⁷ ciertos tratamientos como la quimioterapia y la radioterapia, células inflamatorias, activación de oxidasas y oxigenasas, pérdida de capacidad antioxidante, la edad avanzada y el sobrepeso (Kumaresan et al., 2020; Lorences, 2009). Estos factores pueden estar relacionados a la generación de ROS durante la espermiogénesis provocando el daño en el ADN.

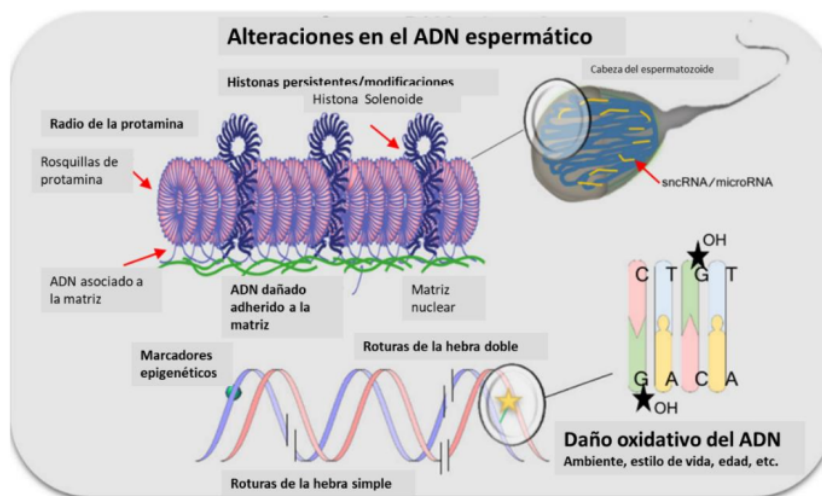


Figura 4. Principales alteraciones del ADN espermático. Puede darse por roturas de hebras, alteraciones de marcas epigenéticas y daño oxidativo de bases. También se muestra sitios preferenciales donde las alteraciones ocurren preferentemente como las regiones genómicas de menor compactación, en la organización nucleosomal (Champroux et al., 2016).

2.7. Efecto de la criopreservación

La criopreservación tiene efectos sobre la movilidad y viabilidad, factores que deben ser considerados en protocolos de tecnologías de reproducción asistida (Rebuffi et al., 2003). La membrana plasmática tiene una estructura según el modelo de mosaico fluido (Singer & Nicolson, 1972), donde los lípidos presentes

determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante el proceso de criopreservación, sin embargo, la pérdida de fluidez de los lípidos de la membrana celular durante el proceso altera las funciones de la membrana y provoca un alto grado de fragilidad, también ocurre una pérdida de lípidos afectando la capacidad de expansión de la membrana plasmática durante la rehidratación (Seidel, 2006). La baja supervivencia de los espermatozoides de alpaca después de criopreservación no está bien definida (Santiani et al., 2012), sin embargo, las características seminales particulares hacen que su manejo, dilución y estudios fisiológicos complementarios de los espermatozoides sea dificultoso. La criopreservación, también está relacionada con una reducción de las enzimas antioxidantes y un aumento de ROS debido al estrés osmótico, resultando que poblaciones de espermatozoides con diferentes niveles de estrés oxidativo tienen y una correlación positiva con la fragmentación del ADN y la reducción de la calidad del embrión. La congelación y descongelación de los espermatozoides es un proceso físicamente estresante y posiblemente este estrés oxidativo sea responsable de la criolesión del ADN (Kamala et al., 2012; Nagaki et al., 2022). En algunos estudios, los autores han informado de alteraciones significativas en la integridad del ADN y la cromatina durante la criopreservación, pero en otros no hubo alteraciones significativas (Rahiminia et al., 2017). Varios estudios sobre la dinámica de la fragmentación del ADN del esperma antes y después del almacenamiento en nitrógeno líquido (NL₂) confirman el daño en la integridad del ADN espermático, lo cual debe tomarse en cuenta ya que puede disminuir la longevidad del ADN (Kumaresan et al., 2020)

2.8. Evaluación de maduración nuclear e integridad del ADN

2.8.1 Métodos que evalúan el grado de condensación o compactación de la cromatina.

Prueba del Azul de Toluidina (AT). Permite detectar el daño a la desnaturalización, entre dos empaquetamientos del ADN. El primero con histonas, más laxo (cromatina, con abundancia de lisina, dando lugar a una coloración púrpura o azul intensa) y el otro con protaminas, más condensado (cromatina rica en protaminas, la coloración se vuelve azul pálida o verdosa) (Andreetta et al., 1995).

Prueba del Naranja de Acridina (NA). La célula se somete a un agente desnaturalizante y posteriormente a una tinción con NA. Donde se observa una

fluorescencia verde ¹ si el colorante se intercala con la doble hélice intacta del ADN. En cambio, si se observa una fluorescencia naranja ¹ es cuando el ADN se encuentra desnaturalizado y el fluorocromo se une con la hebra simple (Alvarez Gonçalves et al., 2015).

Prueba del Cromomicina A3 (CMA3). ¹ La CMA3 se une a regiones ricas en guanina-citosina del ADN compitiendo con las protaminas por los mismos sitios. ¹ Por ello, una menor unión de CMA3 y menor intensidad en la coloración es signo de mayor protaminación del núcleo, (Iranpour, 2014).

2.8.2 Métodos que miden el grado de fragmentación del ADN

Ensayo de marcación del extremo terminal con deoxinucleotidil transferasa (TUNEL). ¹ El método se basa en la adición de una deoxiuridina marcada con un fluorocromo al extremo 3'-OH ¹ de la cadena afectada, permitiendo identificar el daño real en la hebra de ADN. La señal se incrementa a mayor número de roturas en la cadena de ADN (Loo, 2011).

Ensayo de traducción *nick in situ* (ISNT). ¹ Se utilizan enzimas exógenas que permiten incorporar porciones de nucleótidos específicas para reconocer células cuyos núcleos están en estado de necrosis (Alvarez et al., 2015).

Ensayo Cometa. ¹³ Se lleva a cabo mediante la inclusión de células en un microgel de agarosa situado sobre un portaobjetos y sometiéndoles a una lisis alcalina, donde los núcleos se someten a electroforesis y se tiñen ¹ generalmente con bromuro de etidio. Los resultados se observan cuando el ADN fragmentado avanza por acción del campo eléctrico y emite una imagen similar a la cola de un cometa. Las células ¹ que no presentan fragmentación no generan esta imagen (Alvarez et al., 2015).

Detección de roturas de ADN-hibridación *in situ* por fluorescencia (DBD-FISH). ¹ Permite detectar y cuantificar las roturas de ADN y los sitios alcalinos lábiles en células individuales. ⁷ Se basa en la detección y cuantificación de roturas en todo el genoma y también en secuencias específicas del ADN (Fernández & Gosálvez, 2002).

Ensayo de estructura de cromatina espermática (SCSA). ¹ Se basa en la susceptibilidad del ADN al someterlo a desnaturalización luego a una tinción con naranja de acridina y dependiendo de si la hebra es bicatenaria o monocatenaria emite una fluorescencia distinta (verde o naranja, respectivamente) (Alvarez et al., 2015).

2.8.3 Maduración nuclear espermática con tinción de azul de anilina (AN)

El azul de anilina es un colorante que reacciona con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, los grupos sulfatos de los glucosaminoglucanos y los grupos carboxilos de las proteínas por ser un colorante de tipo básico. Este colorante permite diferenciar entre las histonas ricas en lisina y las protaminas ricas en arginina y cisteína, ya que tiene afinidad por la primera (Dadoune et al., 2009), por ello, se puede detectar defectos en la compactación o inmadurez de la cromatina (Hammadeh et al., 1996). Los espermatozoides inmaduros se colorean de azul, mientras que los espermatozoides con cromatina madura permanecen incoloros (Hingst et al., 1995). Esta prueba fue utilizada en humanos, aves y bovinos; donde se observó que los espermatozoides de tamaño normal presentaban una alta tasa de deformación de la cromatina compacta (Alvarez et al., 2015).

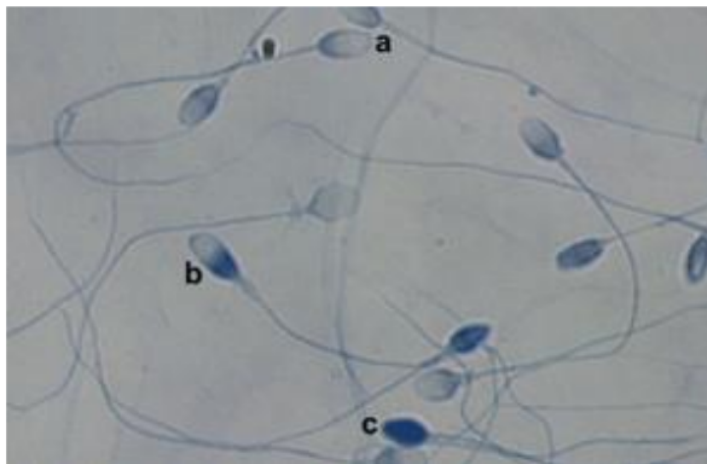


Figura 5. Maduración nuclear espermática, se observa en microscopía de campo claro con tinción de AN. (a) Espermatozoides negativos, con madurez nuclear (b) espermatozoides intermedios, madurez nuclear incompleta; (c) espermatozoides positivos, con inmadurez nuclear (Cape fertility, n.d.).

2.8.4 Integridad del ADN espermático con la prueba de la dispersión de la cromatina (SCD)

La prueba consiste en la inclusión de los espermatozoides en una matriz inerte de agarosa de bajo punto de fusión que se extiende sobre un portaobjetos cubierto

con agarosa estándar (Santiso, 2013), luego ¹¹ el tratamiento de los espermatozoides con una solución desnaturalizante (ácida), produciéndose ADN de cadena simple (ADNss) a partir del extremo de un fragmento de ADN roto; por el contrario si ¹¹ no está fragmentado permanecerá como ADN de cadena doble (ADNds). Posteriormente, son incubados en una solución de lisis (agentes reductores y detergentes) ¹¹ que generar el rompimiento de los enlaces disulfuro y remueven las proteínas del núcleo, permitiendo la descondensación del ADNds y el desenrollamiento de los bucles empaquetados en la matriz nuclear, así provocando halos de dispersión (Cicaré et al., 2016). Finalmente se ² realiza la tinción dependiendo si se observará con fluorescencia o a campo claro. Si el ADN espermático está intacto, se observa un halo homogéneo y compacto de bucles de ADN alrededor de un denso núcleo central, sin embargo, si el núcleo contiene ADN fragmentado no se observan estos halos o son muy pequeños (Santiso, 2013). En otras especies muestran halos muy grandes sin diferenciarse el núcleo (Urbano, 2017). ⁷ Esto permitió establecer cinco patrones de clasificación (Fig. 7). El índice de fragmentación del ADN (DFI) se calcula de la siguiente manera:

$$\%DFI = \frac{c + d + e}{a + b + c + d + e} * 100$$

Esta técnica ha sido utilizada en diversos tipos de animales como en camélidos, bovinos, ovinos, caninos y también en producción avícola (Alvarez et al., 2015).

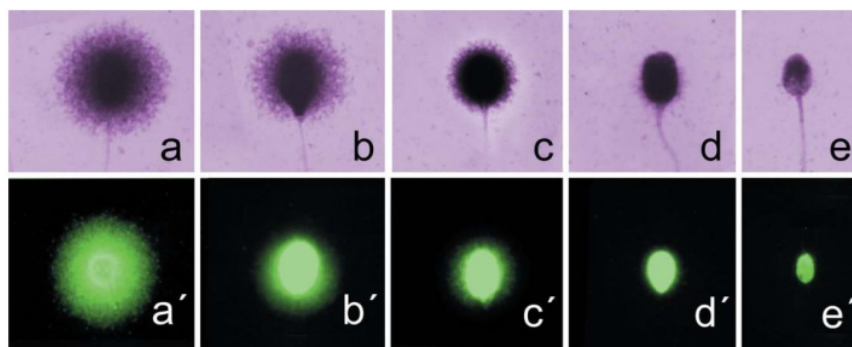


Figura 6. Integridad del ADN mediante la prueba SCD. Se observa en microscopía de campo claro (colorante Wright) y microscopía de fluorescencia (SYBR-Green) (Cortés Gutiérrez et al., 2007). (a) espermatozoides con halos grandes, cuyo ancho de halo es similar o mayor que el diámetro menor del núcleo; (b) espermatozoides con halos de tamaño mediano, tamaño de halo se encuentra entre los de halo grande y pequeño; (c) espermatozoides con halo de tamaño muy pequeño, el ancho del halo es similar o menor que un tercio del diámetro menor del núcleo; (d) espermatozoides sin halo; y (f) espermatozoides sin halo y degradado (Fernández et al., 2005)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ³ Ubicación de la zona de estudio

El trabajo de investigación se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA, Ayacucho, ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray, provincia de Huamanga, región Ayacucho a una altitud de ⁶ 2736 msnm y latitud 13°09'48" S y una longitud oeste de 74°12'20" W; y en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Ciudad Universitaria).

3.2. Población y muestra

La población de estudio comprendió todos los eyaculados presentes en los eyaculados de semen colectados por vagina artificial del ³ plantel de reproductores de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA, Ayacucho. La muestra consistió de ¹ 32 eyaculados de semen colectado de ocho machos, con una movilidad mayor al 50 % para la evaluación de la maduración nuclear e integridad del ADN.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Colección de semen de alpaca

Para la colección de semen se procedió ³ con el armado de la vagina artificial de acuerdo con el protocolo adaptado en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA, Ayacucho (Bravo et al., 1997; Sumar J. & Leyva C., 1981), de la siguiente manera:

- Se cortó una bolsa de polietileno en forma cónica el cual se fijó en un tubo Falcon de 15 ml, este se denomina el tubo colector de semen.

- En un tubo de PVC (vagina artificial) se introdujo una funda de látex por el interior del tubo y se dobló en uno de los extremos al cual se fijó la bolsa del tubo colector sujetado con hilos de jebe para evitar el paso del agua.
- Se preparó agua a 46 °C para añadirla entre la funda de látex y el tubo PVC, luego se dobló en el otro extremo del tubo sujetándolo con un hilo de jebe.
- Seguidamente se colocó presión de aire por el pitón, para un ligero ajuste en el interior de la vagina artificial.
- Luego se colocó la tapa protectora previamente calentada al tubo Falcón para mantener la temperatura y evitar la exposición a la luz de los espermatozoides colectados.
- Se envolvió la vagina armada con una franela delgada seguida de una bolsa que contenía agua caliente entre 80 a 90 °C luego con una frazadilla y franela para mantener la temperatura, los cuales fueron sujetados con cintas de jebe.
- La vagina artificial completamente armada fue llevada al lugar de colección de semen donde ya se encontraban los maniquíes a los cuales se les procedió a limpiar la zona del periné con alcohol al 70 % y luego se introdujo la vagina artificial, si es posible con la ayuda de un gel para facilitar la entrada, verificando siempre la temperatura de la vagina con un termómetro.
- Los maniquíes fueron colocados de la forma de una hembra receptiva y se soltó a los machos seleccionados del día, para la monta.
- Una vez que el macho logró penetrar en la vagina artificial, se tomó el tiempo de cópula de 15 a 20min/macho en media, luego se retiró la vagina artificial del maniquí.
- Inmediatamente después se llevó al laboratorio y se retiró las franelas y tomó el tubo colector protegido con la tapa protectora para luego ser colocado en baño María a 37 °C y finalmente se procedió con el análisis seminal respectivo.

3.3.2. Análisis macroscópico de semen ³

Se realizó con los protocolos adaptados en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Estación Experimental Agraria Canaán- INIA, Ayacucho.

Volumen. El volumen se midió de manera directa en el tubo Falcon graduado de 15 ml (Achircana, 2019; Trujillo, 2019).

Color. El color se determinó de acuerdo con lo establecido en el laboratorio y las bibliografías que varió entre transparente, semi transparente, semi lechoso, lechoso y blanco lechoso (Urquieta et al., 2005).

Espuma. La espuma se midió en centímetros con la ayuda de una regla sobre el tubo Falcon, este parámetro también varió entre individuos y el mismo individuo (Cavalcanti, 2013).

Filancia. Para medir la filancia ¹ se tomó 10 μ l de semen y se colocó sobre un portaobjetos luego se estiró con la punta del tip hasta formar un hilo el cual se midió con una regla (Zirena, 2014).

3.3.3. Análisis microscópico de semen

³ Se procedió con los protocolos adaptados en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Estación Experimental Agraria Canaán- INIA, Ayacucho. Para lo cual, los materiales, reactivos, soluciones y equipos fueron acondicionados a una temperatura de 37 °C, antes de su uso.

Movilidad. La movilidad se calculó visualmente, previo ¹entrenamiento y comparación de varios observadores. Para el cual se tomaron 10 μ l de semen y se colocaron sobre un portaobjetos acondicionado a 37 °C sobre la platina térmica del microscopio y se observó con el objetivo de 20X (200 aumentos) (Morton et al., 2008; Zirena, 2014).

Viabilidad. Para determinar la viabilidad ¹ se tomó 10 μ l de semen y se colocó sobre un portaobjetos al cual se le añadió 10 μ l del colorante Eosina-Nigrosina, se homogenizó por 20 segundos, se procedió a realizar la extensión con otro portaobjetos y se dejó secar. Para observar los espermatozoides vivos y muertos, se colocó una gota de aceite de inmersión sobre el frotis y se llevó a observar con el objetivo de 100X (1000 aumentos), observando espermatozoides coloreados de morado como muertos y los blancos como vivos. Se contó un total de 200 espermatozoides en distintos campos y después se determinó el porcentaje de viabilidad de acuerdo con la cantidad de vivos y muertos (Morton et al., 2008).

Concentración. Para la concentración se tomó 10 μ l de semen y se colocó sobre un portaobjetos al cual se cubrió con un cubreobjetos y se llevó al microscopio acoplado al Sistema de Análisis Seminal Computarizado (CASA) observándose con el objetivo de 20X (200 aumentos), donde se abrió la pestaña de “*Androvision*” seguido de la opción “Concentración y Movilidad” en el cual se buscó un campo

homogéneo y se analizaron tres campos, obteniéndose la concentración de la muestra (Carretero et al., 2015).

Integridad de membrana. Para determinar la integridad de membrana se tomó 10 μ l de semen y se colocó en un tubo Eppendorf ámbar de 0.5 ml luego se le añadió 2 μ l de colorante HOECHST 33342 y luego 1.5 μ l de yoduro de propidio (PI) se homogenizó y se llevó a incubar por 15 min a una temperatura de 37 °C. Pasado el tiempo se tomó 10 μ l de la mezcla y se colocó en un portaobjetos cubriéndolo con un cubreobjetos, esto se llevó al microscopio acoplado al CASA sobre la platina térmica y se observó con el objetivo de 20X (200 aumentos) con el filtro de fluorescencia, donde se abrió la pestaña de “*Androvision*” seguido de la opción “Análisis avanzados” luego el módulo “Viabilidad Hoechst/PI” en el cual se buscó un campo homogéneo y se analizó los campos necesarios hasta obtener un total de 1000 espermatozoides contados del cual se obtuvo el porcentaje de espermatozoides con membrana celular intacta (coloreados de azul) y dañada (coloreados de fuxia o rojo) (Cueva, 2018).

3.3.4. Determinación de la maduración nuclear espermática

Para este parámetro se tomó 10 μ l de semen y se realizó una extensión en un portaobjetos. Una vez seca la extensión a temperatura ambiente se fijó la misma con alcohol de 96° durante 10 min y se dejó secar, luego se realizó la coloración con una solución de azul de anilina al 5 %, preparada en ácido acético al 4 %, durante 5 min y se lavó con agua destilada, finalmente se dejó secar una hora como mínimo a temperatura ambiente. La lectura de los frotices se realizó con un microscopio de campo claro con el objetivo de 100X (1000 aumentos) y se evaluó 200 células por muestra entre los tres patrones establecidos según la técnica propuesta por Fernández et al., (2001) y Terquem & Dadoune (1983), clasificados de la siguiente manera:

Negativo. Corresponde a una cromatina espermática madura (rica en protaminas). Aunque se observó la membrana celular teñida, el núcleo no apareció teñido. El acrosoma se pudo observar tanto teñido como no teñido.

Intermedio. Corresponde a una cromatina espermática ligeramente inmadura. Se observó el núcleo teñido ligeramente de azul y la banda ecuatorial teñida de azul intenso.

Positivo. Corresponde a una cromatina espermática inmadura (rica en histonas). El núcleo aparece teñido de azul intenso, así como la membrana e incluso el acrosoma.

Teniendo en cuenta el conteo de 200 espermatozoides se determinó el porcentaje de inmadurez nuclear espermática de cada muestra, de acuerdo con la cantidad de espermatozoides encontrados en cada patrón de la técnica.

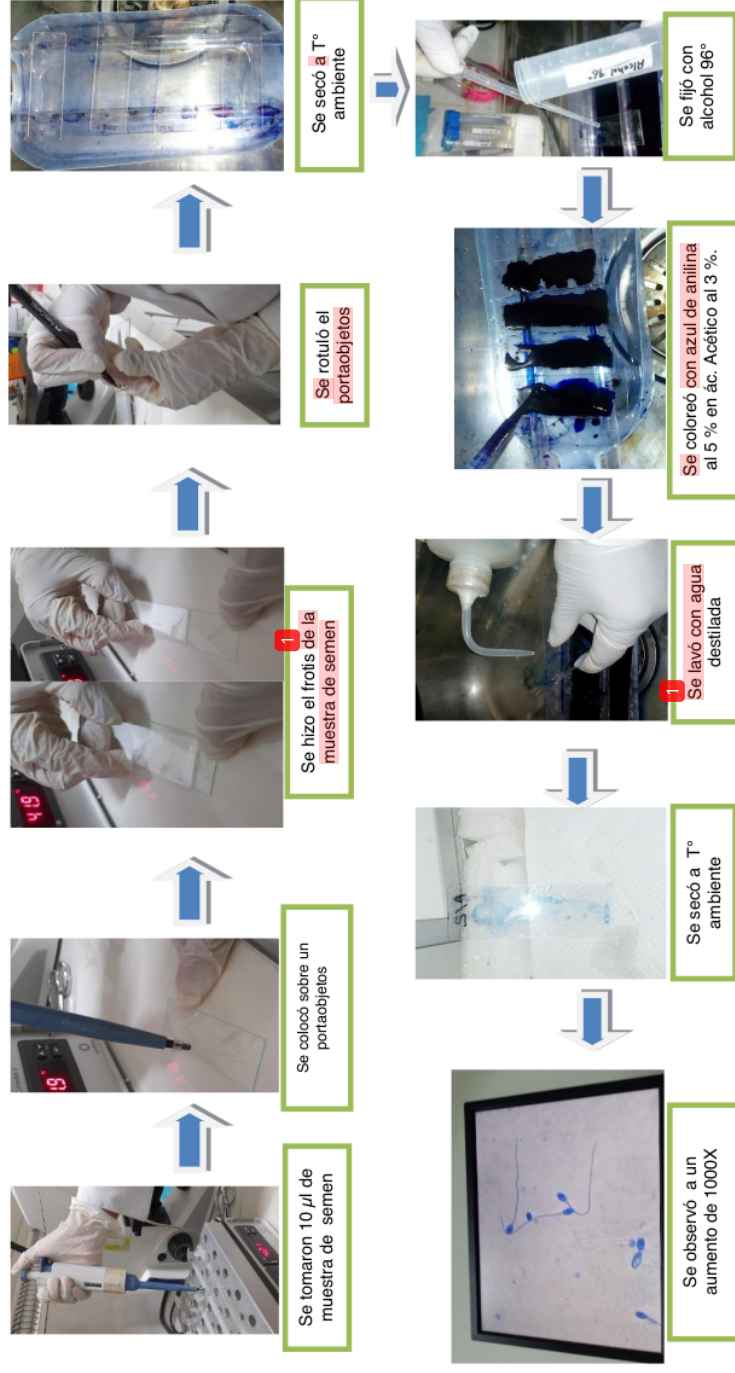


Figura 7. Proceso de la evaluación de la madurez nuclear espermática en semen fresco y congelado de alpacas (*Vicugna pacos*). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

3.3.5. Determinación de la integridad del ADN espermático

Se analizó primero la concentración y movilidad de la muestra obtenida para bajar la concentración entre 20-15 mill/ml con buffer fosfato salino (PBS). Se tomó 10 μ l de muestra se semen y se colocó en 90 μ l de PBS y se homogenizó, luego se tomó 10 μ l de la suspensión colocándolo en 90 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % preparada en Tris acetato EDTA (TAE) 1X el cual también disminuye la concentración entre 3-5 mill/ml, de la mezcla se tomó 50 μ l para depositarlo en un portaobjetos recubierto con agarosa estándar al 1 % preparada en TAE1X y se cubrió con una laminilla extendiendo homogéneamente la muestra, esto se llevó a la refrigeradora a 10°C por 10 min. Pasados los 10 min se retiró el portaobjetos con la muestra y se eliminó la laminilla y luego se introdujo en una placa con 10 ml de solución de lisis compuesta por 5 % de 2-Mercaptoetanol, 2,5 M CINA, 0,2 M Tris y 1 % Tritón X-100 de pH 7,5, por 15 min a temperatura ambiente luego fueron lavados con abundante agua destilada y se deshidrató con alcohol al 70 % y 96 % cada uno por 2 min, se dejaron secar a temperatura ambiente y se coloreó con Wright diluido en PBS (1:1) por 5 min, finalmente se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente (Cicaré et al., 2016).

Evaluación subjetiva. Para realizar las lecturas se colocó una gota de aceite de inmersión sobre la muestra seca y se observó con el objetivo de 100X (1000 aumentos) en un microscopio de fases, la imagen fue proyectada en una laptop mediante una cámara incorporada al microscopio con el programa *CaptaVision* (<https://accu-scope.com/support/software-updates>). Se observó un total de 300 espermatozoides por cada lámina y se clasificó en a) halo grande, b) halo medio, c) halo pequeño, d) sin halo, y e) degradado y también se consideró un patrón adicional "f") halo extendido y no homogéneo, de acuerdo con la observación en el kit de Halomax® para camellos. Finalmente, se determinó DFI de cada muestra con la siguiente fórmula:

$$\%DFI = \frac{c + d + e}{a + b + c + d + e + f} * 100$$

Evaluación objetiva. Las imágenes captadas por el programa *CaptaVision* fueron procesadas con el procesador de imagen digital de dominio público *ImageJ* (National Institute of Health <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para calcular el área (μ m²) del núcleo residual (core) y del halo de los espermatozoides de cada uno de los

patrones de fragmentación referidos anteriormente. Utilizando los datos obtenidos se calculó el tamaño del halo relativo, siguiendo la siguiente formula:

$$Halo\ relativo = \frac{\text{superficie del halo}}{\text{superficie total (halo + core)}} * 100$$

Para realizar el procedimiento anterior con el programa *ImageJ*, primero se calibró la lectura del programa de pixeles a micrómetros, utilizando una fotografía de una lámina con rejillas exactas para calibración. (Carretero et al., 2012; Cicaré et al., 2016).

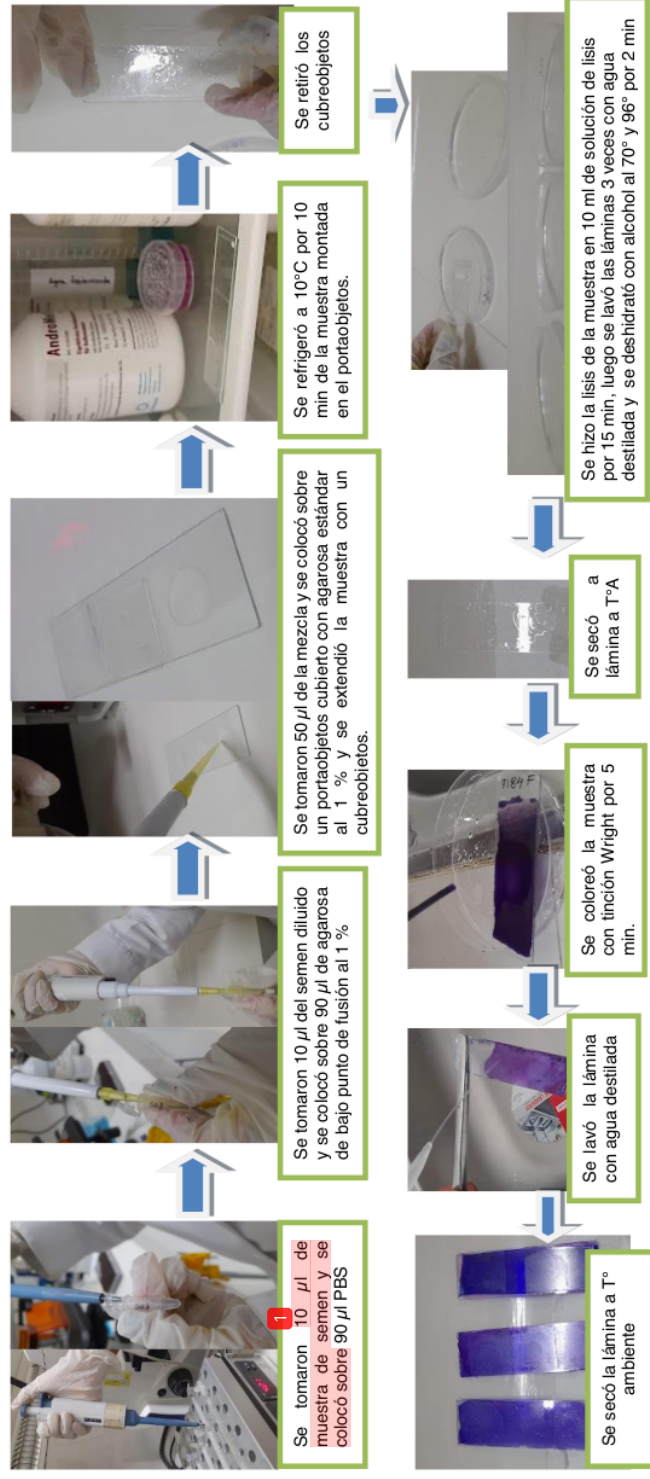


Figura 8. Proceso de la evaluación de la integridad del ADN espermático en semen fresco y congelado de alpaca (*Vicugna pacos*). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

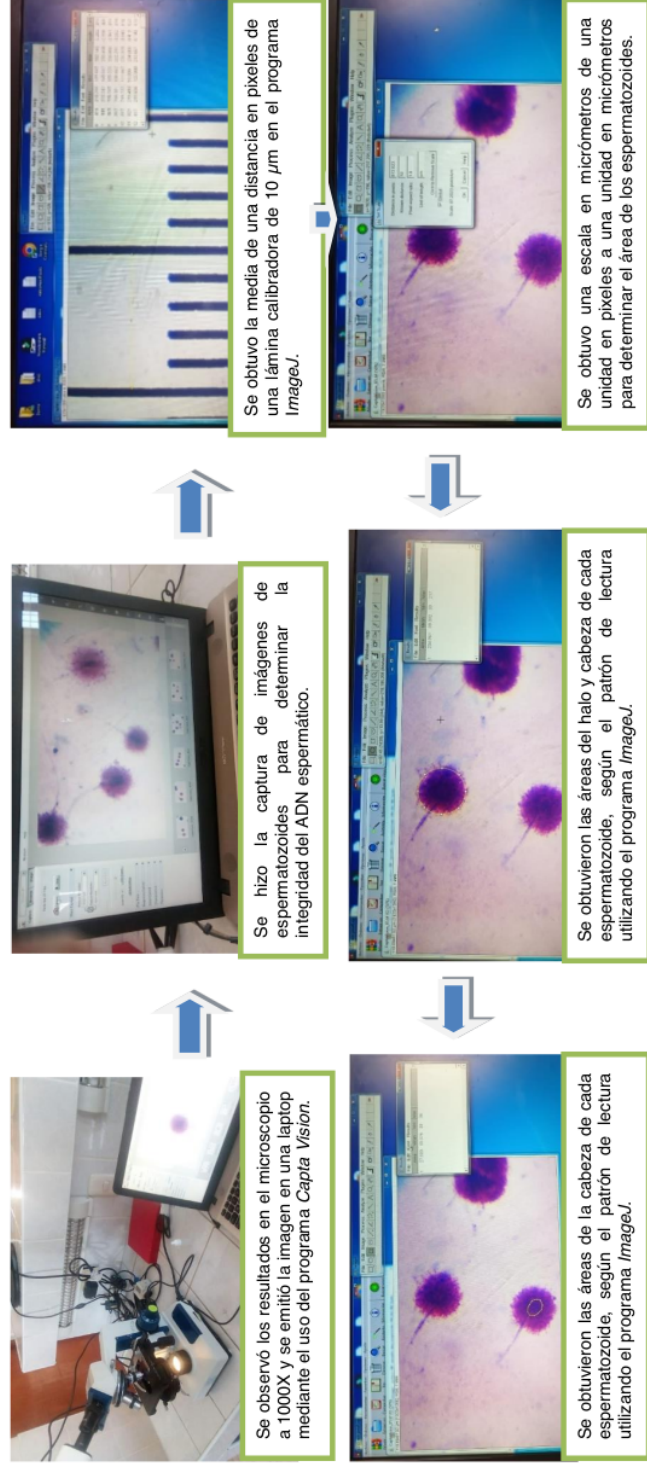


Figura 9. Proceso de las lecturas y determinación del área de halos para la evaluación de la integridad del ADN espermático en semen fresco y congelado de alpaca (*Vicugna pacos*). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

3.3.6. Dilución, refrigeración y criopreservación de semen

Para realizar los procedimientos de dilución, refrigeración y criopreservación de semen se procedió de acuerdo con los protocolos adaptados en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA, Ayacucho. Para la dilución de semen se preparó el dilutor comercial Optixcell®. Se tomó 1 ml de Optixcell® y se colocó en un tubo Falcon de 15 ml luego se le añadió 2 ml de agua milliQ, se homogenizó y se llevó al baño María para acondicionarse a una temperatura de 37°C. Cuando se terminó de utilizar la muestra de semen en todos los análisis respectivos se procedió a agregarle el dilutor preparado en un volumen de acuerdo con la concentración, movilidad y volumen de la muestra y se homogenizó. Después se mantuvo a temperatura ambiente por 10 min y se llevó a refrigerar durante 2 h a 4°C. Pasadas las 2 h las muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml y luego se introdujeron en una mezcla de cubos de hielo con agua para ser trasladadas al tanque de NL₂. Para proceder a la criopreservación se midió el nivel del NL₂ y de acuerdo con la lectura se procedió a realizar las marcas de descendencia de la canastilla de congelación. La canastilla se colocó en el tanque de NL₂ al cual se introdujeron los tubos Eppendorf y se descendió cada 3 cm por cada 5 min hasta llegar a los 20 min, después se introdujo completamente en el NL₂ y se mantuvo por un media de 20 min (Carretero et al., 2015; Zirena, 2014).

3.3.7. Descongelación de semen

Para la descongelación se retiraron los tubos Eppendorf con muestras a partir de las canastillas del tanque de NL₂ y se colocaron en un termo conteniendo agua entre 38 a 39°C. Luego de la descongelación, los tubos fueron secados con papel toalla para realizar las evaluaciones respectivas (Carretero et al., 2015).

3.3.8. Evaluación de semen descongelado

Para la evaluación del semen descongelado se prepararon los materiales y equipos necesarios y se procedió a realizar los análisis microscópicos respectivos de la misma manera que se hizo en el análisis de semen fresco.

3.4. Análisis estadístico

Los datos del semen fresco y congelado de 8 machos fueron analizados utilizando el programa RStudio 4.3.2. Para analizar la simetría de los datos se utilizó la

prueba de simetría de Miao et al., 2006. Se utilizó la prueba de rangos con signos de Wilcoxon para datos que cumplieran con la simetría, con un nivel de confianza del 95 %.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Tasa de la maduración nuclear de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) en semen fresco y congelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

N°	Macho*	Maduración nuclear (%)					
		Negativa % (media ± SD)		Intermedia % (media ± SD)		Positiva % (media ± SD)	
		Semen fresco	Semen congelado	Semen fresco	Semen congelado	Semen fresco	Semen congelado
1	643	100,0 ± 0,00	99,50 ± 0,71	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,35	0,00 ± 0,00	0,25 ± 0,35
2	9184	99,58 ± 0,49	99,42 ± 1,02	0,33 ± 0,52	0,00 ± 0,00	0,33 ± 0,52	0,58 ± 1,02
3	9210	99,00 ± 1,22	99,13 ± 1,44	0,88 ± 1,03	0,13 ± 0,25	0,88 ± 1,03	0,75 ± 1,19
4	12006	99,25 ± 1,06	99,67 ± 0,78	0,42 ± 0,92	0,00 ± 0,00	0,42 ± 0,92	0,33 ± 0,78
5	12010	97,75 ± 0,35	98,75 ± 1,06	2,25 ± 0,35	0,00 ± 0,00	2,25 ± 0,35	1,25 ± 1,06
6	30306	98,17 ± 1,26	96,67 ± 0,58	1,17 ± 0,58	1,17 ± 0,76	1,17 ± 0,58	2,17 ± 0,29
7	12034	98,50 ± 1,41	98,75 ± 1,06	1,50 ± 1,41	0,25 ± 0,35	1,50 ± 1,41	1,00 ± 1,41
8	SA	99,79 ± 0,27	99,86 ± 0,24	0,21 ± 0,27	0,07 ± 0,19	0,21 ± 0,27	0,07 ± 0,19
(media ± SD)		98,92±0,83	98,97±1,01	0,85±0,76	0,23±0,39	0,85±0,76	0,80±0,68

(*) Los códigos pertenecen al Instituto Nacional de Innovación Agraria.



Figura 10. Espermatozoides con tres niveles de maduración nuclear: A) Negativo, espermatozoides con núcleo maduro; B) Intermedio, espermatozoides con núcleo incompleto de madurez; y C) Positivo, espermatozoides con núcleo inmaduro. Tinción con azul de anilina (AN) al 5 % en ácido acético al 4 %. Observaciones en microscopio de campo claro (1000 aumentos). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

Tabla 2. Tasa de integridad del ADN de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) en semen fresco y congelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

N°	Macho*	A (Halo grande) %		B (Halo mediano) %		C (Halo pequeño) %		D (Sin halo) %		E (Degradado) %		F (Cromatina dispersa) %	
		Semen fresco	Semen congelado	Semen fresco	Semen congelado	Semen fresco	Semen congelado	Semen fresco	Semen congelado	Semen fresco	Semen congelado	Semen fresco	Semen congelado
1	643	24,50±2,59	32,33±6,60	61,17±1,18	47,83±0,71	7,33±0,94	15,5±4,95	3,00±2,36	2,00±0,00	0,00	0,00	4,00±2,83	2,33±0,94
2	9184	25,78±9,09	26,17±4,27	65,06±9,43	59,67±5,54	5,61±1,57	11,83±1,15	2,22±1,95	1,78±1,61	0,00	0,00	1,33±2,26	0,56±0,62
3	9210	25,00±11,06	22,17±8,64	60,42±9,58	49,75±6,96	8,00±1,83	22,58±5,97	2,00±2,13	2,67±1,96	0,00	0,00	4,58±3,53	2,83±2,59
4	12006	28,17±16,00	30,33±5,26	61,67±16,22	54,67±5,34	7,56±0,89	11,5±0,86	0,78±0,89	1,33±1,94	0,00	0,00	1,83±1,75	2,17±1,62
5	12010	23,50±01,18	25,67±0,47	53,00±3,30	37,00±4,24	17,33±3,3	27,33±1,89	4,83±1,65	7,00±3,30	0,00	0,00	1,33±0,47	3,00±2,36
6	30306	28,56±01,07	18,22±4,17	53,44±1,92	60,89±3,95	9,44±4,14	15,78±1,95	3,89±3,47	1,11±1,35	0,00	0,00	4,67±2,85	4,00±1,73
7	12034	22,83±05,89	30,50±3,06	57,83±7,78	45,67±6,13	11,00±0,47	17,17±5,42	0,33±0,47	4,00±2,36	0,00	0,00	8,00±1,89	2,67±0,00
8	SA	28,38±02,25	34,81±6,06	60,33±2,05	51,71±6,33	6,76±1,78	10,38±1,45	2,43±2,05	0,95±1,83	0,00	0,00	2,10±1,82	2,14±1,54
(Media ±SD)		25,84 ± 2,28	27,53 ± 5,52	59,05 ± 4,18	50,90 ± 7,77	9,13 ± 3,70	16,51 ± 5,86	2,44 ± 1,49	2,61 ± 2,03	0,00	0,00	3,48 ± 2,31	2,46 ± 0,97

(*) Los códigos corresponden al Instituto Nacional de Innovación Agraria.

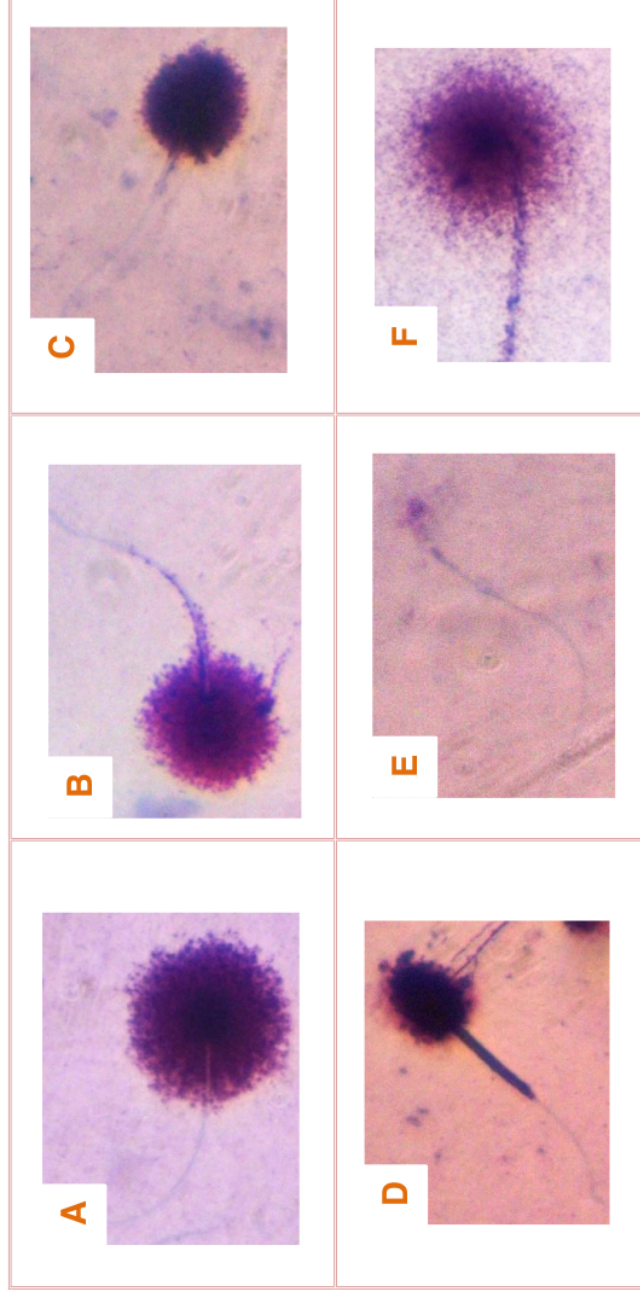


Figura 11. Espermatozoides con distintos halos de dispersión de la cromatina, según la fragmentación del ADN espermático. Tinción Wright, observaciones en microscopio de fases a 1000 aumentos, con el programa *CaptivaVision*. A) Halo grande; B) Halo mediano; C) Halo pequeño; D) Sin halo; E) Degradado; y F) Halo disperso. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

Tabla 3. Halo relativo (%) ⁵ del halo A (halo grande), halo B (halo mediano) y halo C (halo pequeño) de la dispersión de la cromatina espermática de alpaca (*Vicugna pacos*). ³ Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2021).

Halo relativo %				
N°	Macho*	Halo A (Media ±SD)	Halo B (Media ±SD)	Halo C (Media ±SD)
1	643	85,00 ± 2,15	71,86 ± 1,74	61,83 ± 3,67
2	9184	89,03 ± 1,67	72,86 ± 3,63	61,77 ± 4,28
3	9210	87,65 ± 1,23	75,79 ± 3,04	65,61 ± 3,51
4	12006	85,81 ± 3,00	71,70 ± 1,43	65,75 ± 3,15
5	12010	85,34 ± 2,18	73,56 ± 3,45	66,21 ± 2,12
6	30306	87,77 ± 0,66	78,00 ± 1,59	67,08 ± 1,94
7	12034	83,89 ± 3,28	75,29 ± 2,14	65,36 ± 2,21
8	SA	87,52 ± 2,63	77,62 ± 1,40	65,59 ± 2,12
(Media ±SD)		86,50 ± 1,74	74,58 ± 2,47	64,90 ± 1,98

Tabla 4. ¹ Efecto de la criopreservación de semen ³ en la maduración nuclear espermática de alpaca (*Vicugna pacos*). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

Maduración nuclear (%)						
Nº	Macho*	Semen fresco		Semen congelado		P valor
		Media ±SD	Mediana	Media ±SD	Mediana	
1	643	100,0 ± 0,00	100,00 ^a	99,50 ± 0,71	99,50 ^a	1,0000
2	9184	99,58 ± 0,4	99,75 ^a	99,42 ± 1,02	100,00 ^a	1,0000
3	9210	99,00 ± 1,22	99,25 ^a	99,13 ± 1,44	99,75 ^a	1,0000
4	12006	99,25 ± 1,06	99,50 ^a	99,67 ± 0,78	100,00 ^a	0,7500
5	12010	97,75 ± 0,35	97,75 ^a	98,75 ± 1,06	98,75 ^a	0,5000
6	30306	98,17 ± 1,26	98,00 ^a	96,67 ± 0,58	97,00 ^a	0,2500
7	12034	98,50 ± 1,41	98,50 ^a	98,75 ± 1,06	98,75 ^a	1,0000
8	SA	99,79 ± 0,27	100,00 ^a	99,86 ± 0,24	100,00 ^a	1,0000

⁶ ^a Letras iguales en la misma fila denotan que no existe diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$). SD: Desviación Estándar. (*) Los códigos corresponden al Instituto Nacional de Innovación Agraria.

Tabla 5. ¹ Efecto de la criopreservación de semen en la integridad del ADN espermático de alpaca (*Vicugna pacos*). ³ Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

Integridad del ADN espermático						
N°	Macho*	Semen fresco		Semen Congelado		P valor
		Media $\pm$ SD	Mediana	Media $\pm$ SD	Mediana	
1	643	14,33 $\pm$ 1,41	14,33 ^a	19,83 $\pm$ 5,89	19,83 ^a	0,5000
2	9184	9,17 $\pm$ 0,75	9,17 ^b	14,17 $\pm$ 1,67	14,00 ^a	0,0312
3	9210	14,58 $\pm$ 1,60	14,17 ^a	28,08 $\pm$ 2,47	27,50 ^a	0,1250
4	12006	10,17 $\pm$ 1,31	10,17 ^b	15,00 $\pm$ 1,84	15,33 ^a	0,0312
5	12010	23,50 $\pm$ 2,12	23,50 ^a	37,33 $\pm$ 3,77	37,33 ^a	0,5000
6	30306	18,00 $\pm$ 0,88	18,33 ^a	20,89 $\pm$ 0,38	20,67 ^a	0,2500
7	12034	19,33 $\pm$ 1,89	19,33 ^a	23,83 $\pm$ 3,06	23,83 ^a	0,5000
8	SA	11,29 $\pm$ 1,06	11,67 ^b	13,48 $\pm$ 0,90	14,00 ^a	0,0156

^{a,b}: Letras diferentes en la misma fila denotan que existe diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). SD: Desviación Estándar. (*) Los códigos corresponden al Instituto Nacional de Innovación Agraria.

Tabla 6. Efecto de la criopreservación sobre las características microscópicas de semen fresco y congelado de alpacas (*Vicugna pacos*). Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la EEA Canaán – INIA Ayacucho (Marzo – Julio del 2020).

N°	Macho*	Movilidad %				Viabilidad %				Integridad de membrana %			
		Semen fresco		Semen congelado		Semen fresco		Semen congelado		Semen fresco		Semen congelado	
		media ± SD	Mediana	media ± SD	Mediana	media ± SD	Mediana	media ± SD	Mediana	media ± SD	Mediana	media ± SD	Mediana
1	643	77,50 ± 10,61	77,50 ^a	12,50 ± 03,50	12,50 ^b	76,50 ± 04,95	76,50 ^a	37,00 ± 22,63	37,00 ^a	63,50 ± 00,71	63,50 ^a	30,00 ± 19,80	30,00 ^a
2	9184	93,33 ± 02,58	95,00 ^a	59,17 ± 08,00	60,00 ^b	77,33 ± 11,50	79,00 ^a	50,67 ± 14,33	49,50 ^b	81,83 ± 12,14	81,00 ^a	43,17 ± 11,65	42,50 ^b
3	9210	57,50 ± 06,45	57,50 ^a	08,75 ± 06,29	10,00 ^b	64,00 ± 11,11	64,50 ^a	24,75 ± 21,52	24,50 ^a	61,25 ± 17,13	59,50 ^a	35,50 ± 22,22	38,50 ^b
4	12006	69,17 ± 11,14	67,50 ^a	33,33 ± 16,02	35,00 ^b	80,17 ± 07,86	80,50 ^a	61,17 ± 14,72	65,50 ^b	66,50 ± 13,56	71,50 ^a	38,83 ± 13,57	42,00 ^b
5	12010	57,50 ± 10,61	57,50 ^a	27,50 ± 38,89	27,50 ^a	67,00 ± 21,21	67,00 ^a	41,50 ± 00,71	41,50 ^a	46,50 ± 28,99	46,50 ^a	23,50 ± 06,36	23,50 ^a
6	30306	46,67 ± 05,77	50,00 ^a	00,00 ± 00,00	00,00 ^b	59,33 ± 05,03	60,00 ^a	27,67 ± 02,08	27,00 ^b	54,00 ± 11,36	49,00 ^a	32,00 ± 1,00	32,00 ^a
7	12034	65,00 ± 00,00	65,00 ^a	15,00 ± 07,07	15,00 ^a	60,00 ± 04,24	60,00 ^a	42,00 ± 02,83	42,00 ^a	51,00 ± 04,24	51,00 ^a	33,50 ± 14,85	33,50 ^a
8	SA	73,57 ± 08,52	75,00 ^a	25,71 ± 23,53	30,00 ^b	83,00 ± 04,36	84,00 ^a	48,43 ± 26,70	54,00 ^b	64,14 ± 17,72	71,00 ^a	42,57 ± 09,59	45,00 ^b

^{a,b}: Letras diferentes en la misma fila por característica ³movilidad, viabilidad, integridad de membrana y concentración) denotan que existe diferencias estadísticas significativas (p<0,05). SD: Desviación Estándar. (*) Los códigos corresponden al Instituto Nacional de Innovación Agraria.

V. DISCUSIÓN

En el trabajo de investigación realizado se muestran los resultados de cada parámetro espermático evaluado en semen fresco y congelado de alpaca. En la Tabla 1 se observa la media y desviación típica de los resultados de los estados de la madurez nuclear espermática. Para esto se utilizó el método de la tinción de azul de anilina (AA) el cual tiene una afinidad por la lisina de las histonas discriminando la arginina y cisteína de las protaminas, esto se observa en la coloración de la cabeza clasificándose en tres grupos (Figura 10) (Cabral et al., 2014; Fernández et al., 2001): negativo (cabeza sin colorear, con madurez nuclear), intermedio (la mitad de la cabeza coloreado, madurez nuclear incompleto) y positivo (cabeza coloreada, núcleo inmaduro). Se encontró que todos los machos tienen un porcentaje menor con núcleo inmaduro de los cuales el mayor y menor valor es de los machos 30306 y S/A con un resultado de $2,17 \pm 0,29 \%$ y $0,07 \pm 0,19 \%$, respectivamente, en semen congelado estos resultados son similares a los valores obtenidos de 0,66; 0,33; 1,83; 0,33 y 1,33 en semen criopreservado de 5 toros Brahman estudiados por Nava et al. (2016).

Continuando con los resultados de la investigación en la Tabla 2 se observa la media y desviación típica de los resultados de la evaluación de la integridad del ADN espermático en semen fresco y congelado utilizando la prueba SCD basado en el uso de soluciones ácidas y de lisis sobre la muestra de semen expresándose en distintos patrones de la expansión homogénea o no de la cromatina espermática, debido a que no existen muchos estudios en alpacas utilizando esta técnica, se tomó como referencia los resultados obtenidos en caninos (Urbano, 2017), camélidos (Famuso et al., 2010; Huanca et al., 2020), ovinos (Val Santolaria, 2012) y humanos (Gosálvez et al., 2011) estableciéndose los siguientes patrones mostrados en la Figura 11: A) halo grande (ADN integro), B)

halo mediano (ADN integro), C) halo pequeño (ADN fragmentado), D) sin halo (ADN fragmentado), E) degradado (ADN fragmentado y espermatozoide dañado) y F) halo extendido y no homogéneo (ADN fragmentado); de los cuales durante las lecturas de la investigación no se encontró el patrón E; sin embargo, explorando todo el campo de las láminas se llegó a encontrar unas cuantas de este patrón como es en el caso de los humanos estudiado en un inicio por Fernández et al., 2003 y mejorado en un kit por Halotech®, s/f; sin embargo, se encontró el patrón F como en el caso de caninos estudiado por Urbano (2017) . El caso más cercano para comparar entre camélidos es la llama, en el cual solo se encontró los cuatro primeros patrones al incorporar la prueba por Carretero et al. (2012). Sin embargo, (Huanca et al., 2020) incorporaron esta prueba en alpacas encontrando dos patrones: espermatozoides sin halo o con halo pequeño y espermatozoides con halos grandes dispersos, seleccionándolos en ADN integro y ADN fragmentado, respectivamente, siendo necesario que se hagan más estudios de este tipo en alpacas para confirmar el método más exacto a ser utilizado en esta especie. De acuerdo con lo anterior en el grupo de espermatozoides con ADN integro de la Tabla 2, se observa que el porcentaje del patrón B es mayor como es en el caso del 9184 con un $65,06 \pm 9,43$ % y $59,67 \pm 5,54$ % en semen fresco y congelado, respectivamente, a diferencia del patrón A con un $25,78 \pm 9,09$ % y $26,17 \pm 4,27$ %, respectivamente, siendo similar en los demás machos. En el caso de espermatozoides con ADN fragmentado del patrón C, el porcentaje mayor de espermatozoides con ADN fragmentado se observa en el macho 12010, con valores de $17,33 \pm 3,3$ % y $27,33 \pm 1,89$ % en semen fresco y congelado, respectivamente, a diferencia de los patrones D y F con porcentajes inferiores. Así mismo en la Tabla 3 se observa el media y desviación estándar del valor relativo del tamaño de los halos A, B y C, utilizando el procesador de imagen *ImageJ* en el cual se usó imágenes capturadas con el programa *Capta vision*, para ello los halos relativos obtenidos del halo A oscilaron entre $83,89 \pm 3,28$ % y $89,03 \pm 1,67$ %, el B entre $71,70 \pm 1,43$ % y $78,00 \pm 1,59$ % y el halo C entre $61,77 \pm 4,28$ % y $67,08 \pm 1,94$ %, los cuales en comparación con un primer reporte en análisis cuantitativo de este método en alpacas sobre los valores de halo relativo de A, B y C fueron 60.79 ± 35.05 %, 13.22 ± 14.92 % y 10.44 ± 15.57 %, respectivamente, observándose que difieren con los resultados obtenidos en esta investigación, ello podría ser por la diferencia de métodos usados (Rodríguez, 2022). Sin embargo, una investigación en llamas también reportó valores de 63.15

± 8.45 % de tamaño relativo del halo A, usando 2,5 % de 2-Mercaptoetanol, reactivo que también se utilizó en la presente investigación (Carretero et al., 2012). En la Tabla 4 se observa la media porcentual de la madurez nuclear espermática de alpaca en semen fresco y congelado teniendo como resultado que todos los machos tuvieron un porcentaje mayor al 95 % de núcleos maduros. Al aplicar la prueba estadística Miao et al. (2006) se determinó la distribución simétrica por lo que se procedió a realizar la prueba de rangos y signos de Wilcoxon a cada macho teniendo como resultado ¹⁹ que no existe diferencia estadística significativa ($p > 0,05$) entre las medianas de semen fresco y congelado; es decir la criopreservación del semen no afectó la madurez nuclear espermática. Este resultado se debe a que el origen de la madurez nuclear se da durante la espermatogénesis por el reemplazo de las histonas por protaminas condensando fuertemente al núcleo espermático (Aoki & Carrell, 2003), sin embargo la criopreservación si puede provocar la descondensación de la cromatina como lo reportó Contreras (2017), durante su investigación en semen descongelado de alpaca, obteniendo $2,25 \pm 0,29$ % de espermatozoides con alto porcentaje de cromatina descondensada, pero que no afecta a las protaminas ya ¹ que estas no pueden ser reemplazadas como sucede en la fecundación donde ¹ el núcleo espermático se descondensa para formar el pronúcleo masculino y las protaminas son reemplazadas por histonas maternas (Berrios & Bedford, 1979). Para confirmar lo señalado se puede mencionar la investigación realizada con la misma técnica en toros por Nava, et al. (2016), obteniendo un resultado ¹⁰ media porcentual de $0,9 \pm 1,29$ %, de espermatozoides con núcleo inmaduro, ¹⁰ este parámetro no estuvo afectado ni por el toro ni por el eyaculado. Así mismo Sellami et al. (2013) realizó una investigación en varones infértiles obteniendo una media porcentual de 20.66 ± 13.76 de espermatozoides con núcleo inmaduro. Respecto a la importancia de las protaminas para determinar la madurez nuclear espermática, la técnica utilizada en la presente investigación es muy básica, siendo necesario confirmar nuestros resultados utilizando técnicas más precisas, como la empleada en ratones, a través de la ¹ cuantificación relativa de la expresión génica por PCR en tiempo real de los genes *Prm1*, *Prm2*, *Tnp1* y *Tnp2* (Vásquez Caveno, 2012). Adicionalmente, se podría considerar la identificación de protaminas y de sus alteraciones utilizando dos alternativas diferentes a través de: ⁸ 1) electroforesis bidimensional (2D) seguida de la identificación por espectrometría de masas (MS) con tecnología MALDITOF o cromatografía líquida LC-MS/MS, y 2) la digestión

inicial de proteínas para generar péptidos, seguido por su separación y análisis LC-MS/MS (Oliva et al., 2009b y Baker & Aitken, 2009).

En la Tabla 5, se observa la media porcentual del DFI en semen fresco y congelado. Se aplicó la prueba estadística según Miao et al. (2006), para determinar la distribución simétrica y al observar que se cumplía con esta se realizó la prueba de rangos y signos de Wilcoxon a cada macho teniendo como resultado que en los machos 643, 9210, 12010, 30306 y 12034 no existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) entre las medias del DFI en semen fresco y congelado con un porcentaje de $19,83 \pm 5,89$; $28,08 \pm 2,47$; $37,33 \pm 3,77$; $20,89 \pm 0,38$ y $23,83 \pm 3,06$ respectivamente, estos resultados son concordantes con los obtenidos por Carretero et al., (2015), quienes estudiaron el efecto de la criopreservación en semen de llamas donde obtuvo resultados de 29.0 y 36,3 de DFI, respectivamente, así como también obtuvo Huanca et al. (2020) un porcentaje de DFI de alpacas de 36,4; 13,65 y 8,42 en muestras colectadas por desviación de los conductos deferentes (DCD), por electroeyaculación (EE) y mediante poscópula (PC) respectivamente. Los DFI mencionados también son similares en los machos 9184, 12006 y SA donde si existe diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) con porcentajes de $14,17 \pm 1,67$; $15,00 \pm 1,84$ y $13,48 \pm 0,90$ respectivamente. Al respecto, el efecto de la criopreservación sobre algunos machos puede ser resultado de la producción de las especies reactivas de oxígeno, ya que el proceso de congelación-descongelación induce cambios físicos y tensiones químicas en las membranas plasmáticas de los espermatozoides que están asociados con el estrés oxidativo y la formación de ROS, esto puede afectar la integridad del ADN espermático debido a la falta de maduración de espermatozoides en el empaquetamiento de su cromatina por la falta de sustitución de histonas por protaminas (Boe-Hansen et al., 2018; Kumaresan et al., 2020). Por ello muchos autores señalan el efecto perjudicial del daño del ADN en las técnicas de reproducción asistida, sin embargo otros obtienen resultados opuestos o no concluyentes, pudiendo estar relacionado con las diferencias en los métodos para medir el daño del ADN o por la especie en estudio (Ribas-Maynou et al., 2021). Con la finalidad de lograr mejores resultados en la obtención de semen criopreservado de alpaca, otros estudios a parte de la evaluación de la integridad del ADN espermático, buscan correlacionar con las características microscópicas como movilidad, viabilidad, integridad de membrana, acrosoma, actividad mitocondrial y concentración espermática. En la presente investigación,

se evaluó alguna de ellas como se puede observar en la Tabla 6, donde se observa la media porcentual de cada uno de los parámetros espermáticos, donde se analizó la simetría de los datos según la prueba de simetría de Miao et al., (2006). Los datos que cumplían con la distribución simétrica fueron analizados utilizando la prueba de rangos y signos de Wilcoxon a cada macho teniendo como resultado que en machos como el 643, 12010 y 12034 ¹⁹ no existe diferencia estadística significativa ($p>0.05$) entre las medias del semen fresco y congelado de alguno de los parámetros, a diferencia de los otros machos donde si existe esta diferencia, sin embargo en el caso de la movilidad espermática si ¹ existe diferencia estadística significativa ($p<0,05$) en la mayoría de los machos, donde el macho 9184 tiene una media porcentual mayor de $59,17 \pm 08,00$ % de movilidad posdescongelado y el macho 30306 con un 0 %. En el caso de la viabilidad espermática los machos 12006 y 9210 tuvieron resultados de mayor y menor porcentaje de viabilidad con una media de $61,17 \pm 14,72$ % y $24,75 \pm 21,52$ %, respectivamente, como encontraron Juárez & Santiani, (2019) en semen posdescongelado un porcentaje de 32,30 % de viabilidad determinada por el fluorocromo ¹⁸ SYBR-14 y ¹⁷ yoduro de propidio (PI). En los estudios de criopreservación de espermatozoides de alpaca mostraron resultados entre 24.047 y 13.82 % (W. Contreras et al., 2020; Juárez & Santiani, 2019) de movilidad posdescongelación, entre 17 y 61 % de integridad de la membrana plasmática. La ¹⁷ baja tasa de supervivencia de espermatozoides criopreservados de CSA podría estar relacionada a los agentes crioprotectores por ello se debería probar diversos protocolos de criopreservación de semen de varias especies (W. Contreras et al., 2020). La criopreservación, es un proceso ¹⁸ de almacenamiento por un largo periodo; sin embargo, la alta viscosidad del plasma seminal y la mala calidad de los eyaculados en alpacas son las principales desventajas para el desarrollo óptimo de una técnica de congelación de semen (Malo et al., 2019).

VI. CONCLUSIONES

- Los machos presentaron porcentajes de 98,92 % y 98,97 %; 0,85 % y 0,23 %; 0,85 % y 0,80 % en semen fresco y congelado para los patrones negativo, intermedio y positivo, respectivamente.
- La integridad del ADN espermático se distribuyó en seis patrones de lectura: A) halo grande, B) halo mediano, C) halo pequeño, D) sin halo, E) degradado y F) halo extendido y no homogéneo, de los presentaron porcentajes de 25,84 % y 27,53 %; 59,05 % y 50,90 %; 9,13 % y 16,51 %; 2,44 % y 2,61 %; 0 %; 3,48 % y 2,46 % en semen fresco y congelado respectivamente.
- El área relativo (%) del halo de dispersión de la cromatina espermática se obtuvo para el halo A entre 83,89 % y 89,03 %; el halo B entre 71,70 % y 78,00 % y el halo C entre 61,77 % y 67,08 %.
- La criopreservación de semen de alpaca no tuvo efecto en la maduración nuclear espermática ya que los resultados fueron mayor al 95 % de núcleos maduros. Respecto a la integridad del ADN espermático, de igual manera, con excepción de tres machos que si presentaron diferencias estadísticas significativas con porcentajes de 14,17 %; 15,00 % y 13,48 % de DFI en semen congelado.
- La criopreservación tuvo efecto sobre las características microscópicas espermáticas y el parámetro más afectado fue la movilidad teniendo resultados entre un 59 % y 0 % de movilidad espermática en semen poscongelado.

VII. RECOMENDACIONES

Realizar trabajos de investigación enfocándose en una alimentación balanceada para tener mayor disponibilidad y mejores muestras seminales.

Estudiar más a fondo la dinámica de la integridad del ADN espermático, para conocer mejor la resistencia del ADN nuclear en la criopreservación y mejorar los índices de eficiencia durante la aplicación de las Biotecnologías Reproductivas.

Evaluar la integridad del ADN espermático y la madurez nuclear usando fluorocromos en citometría de flujo y métodos más exactos en la detección del daño espermático.

Es importante tomar en consideración la diferencia que existe entre cada macho ya que los resultados obtenidos de cada análisis difieren entre cada macho.

Para desarrollar trabajos posteriores se deben de implementar en el laboratorio, técnicas y estrategias de biología molecular para realizar análisis más completos en semen de alpaca.

Maduración nuclear e integridad del ADN espermático de "alpaca" en semen fresco y congelado. INIA - Ayacucho, 2019

INFORME DE ORIGINALIDAD

23%

INDICE DE SIMILITUD

21%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	6%
2	core.ac.uk Fuente de Internet	3%
3	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	3%
4	docplayer.es Fuente de Internet	2%
5	Juliana Cicaré, Aylen Avila, Adriana Caille, María José Munuce. "Incorporación del test de dispersión de la cromatina espermática al laboratorio andrológico", Revista Internacional de Andrología, 2016 Publicación	1%
6	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1%
7	repositorioinstitucional.buap.mx Fuente de Internet	1%

8	revista.asebir.com Fuente de Internet	1 %
9	ojs.alpa.uy Fuente de Internet	1 %
10	www.saber.ula.ve Fuente de Internet	1 %
11	doczz.es Fuente de Internet	1 %
12	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1 %
13	Submitted to Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco Trabajo del estudiante	<1 %
14	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
15	ciencia.lasalle.edu.co Fuente de Internet	<1 %
16	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
17	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1 %
18	Javier Juárez, Alexei Santiani. "Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el	<1 %

proceso de criopreservación en
espermatozoides obtenidos de epidídimo de
alpaca", Revista de Investigaciones
Veterinarias del Perú, 2019

Publicación

19

www.grafiati.com

Fuente de Internet

<1 %

20

cesica.org

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo