

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Determinación de viabilidad y rendimiento durante el
aislamiento de espermatogonias de *Vicugna pacos*
“alpaca” a diferentes edades

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

Presentado por la:
Bach. HUAMANI ALVARADO, Jackeline

AYACUCHO – PERÚ
2018

En memoria a mi querida abuela a quien cariñosamente la llamábamos “mama-grande”, quien supo fortalecer las habilidades. Con mucho cariño a mi familia y amigos, así como a los criadores alpaqueros.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, *Alma Mater* de la educación, forjadora de profesionales científicos, técnicos y humanísticos.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología, así como a la Especialidad de Biotecnología por brindarme la oportunidad de desarrollar mis conocimientos.

A todos los profesores, quienes me guiaron durante la permanencia en las aulas y laboratorios de la Escuela Profesional de Biología.

Al Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, por el apoyo y asesoría para la realización del presente trabajo de investigación, permitiendo su financiamiento a través del proyecto FOCAM: Aislamiento y purificación de células madre espermatogoniales durante el desarrollo testicular postnatal en *Vicugna pacos* “alpaca”, aprobado por Resolución de Consejo Universitario N° 859-2012-UNSCH_CU.

Al Dr. Jaime Antonio Ruiz Béjar, responsable del Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón por su apoyo en la parte estadística. A los criadores alpaqueros que me permitieron de manera desinteresada acceder a los ejemplares de alpacas macho prepúberes y púberes.

A mis queridos padres por todo lo que hicieron y hacen en el desarrollo personal y profesional. A las personas que me apoyaron permanentemente y de manera sincera en el desarrollo del presente trabajo. A Idaliz mi querida hermana, con quien compartí gratos y difíciles momentos en la colecta de testículos en las comunidades alpaqueras más alejadas; y a mis hermanas Lucienne, Neida, Shirley y Sharmely por su apoyo moral.

A todos los amigos que siempre se encontraban en los buenos y difíciles momentos como Marcial Antonio.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
INDICEGENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
INDICE DE FIGURAS	xi
INDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCION	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Células madre	4
2.3. Anatomía y fisiología del testículo de los mamíferos	5
2.4. Espermatogénesis	11
2.5. Comparación de espermatogénesis en murina, bovino y primate	12
2.6. Inicio de espermatogénesis en alpacas	15
2.7. Aislamiento de células espermatozonias	15
2.8. Identificación de microscópica de espermatozonias	17
2.9. Determinación de la viabilidad	18
2.10. Determinación del rendimiento	19
2.11. <i>Vicugna pacos</i>	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Ubicación	21
3.2. Materiales	21
3.3. Metodología	21
3.4. Análisis estadístico	24
IV. RESULTADOS	25
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES	43
VII. RECOMENDACIONES	45
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Comparación de tipos de espermatogonias murina, bovina y primates	15
Tabla 2 Promedio de SSC aisladas de testículo de alpacas	27
Tabla 3 Promedio de viabilidad de SSC aisladas de testículo	29
Tabla 4 Promedio de rendimiento de SSC aisladas de testículo de alpaca.	31
Tabla 5 Promedio de mortalidad de SSC aisladas de testículo de alpaca.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Esquema de dos posibles mecanismos de renovación y compromiso de células madre espermatogoniales hacia la diferenciación, en ratones	5
Figura 2	Testículos de <i>Vicugna pacos</i> mayores de 4 años	6
Figura 3	Observación microscópica de corte transversal de los túbulos seminíferos de testículos del toro	7
Figura 4	Desarrollo de la línea germinal masculina	8
Figura 5	Diagrama del rol central de la célula de Sertoli en la espermatogénesis	10
Figura 6	Representación de una sección del testículo humano, observación del tubo seminífero y células de Leydig	11
Figura 7	Desarrollo de espermatogonias en la espermatogia del ratón	13
Figura 8	Estimación de la edad de las alpacas por erupción dentaria	20
Figura 9	Promedio de SSC aisladas de testículo de alpacas	28
Figura 10	Promedio de SSC viables aisladas de testículo de alpacas	30
Figura 11	Promedio de rendimiento de SSC aisladas de testículo de alpacas	32
Figura 12	Promedio de mortalidad de SSC aisladas de testículo de alpacas	34
Figura 13	Células espermatogoniales observadas en Cámara de Neubauer, microscopio óptico (400X)	35

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1	Flujograma del aislamiento de CS de alpaca 53
Anexo 2	Escisión de testículo de <i>Vicugna pacos</i> en el matadero Municipal de Huancavelica, 2015 54
Anexo 3	Cortado del tejido testicular <i>Vicugna pacos</i> , laboratorio de Reproducción Animal Universidad Nacional de Huancavelica, 2015 54
Anexo 4	Triturado del tejido testicular, laboratorio de Reproducción Animal Universidad Nacional de Huancavelica, 2015 55
Anexo 5	Incubación a 32°C con agitación moderada para la primera digestión enzimática en cada tubo cónicos, contenido DMEM suplementado, laboratorio de Reproducción Animal Huancavelica 2015. 55
Anexo 6	Obtención del pellet, contenido DMEM suplementado, después de la segunda digestión enzimática, Laboratorio de Reproducción Animal Huancavelica, 2015. 56
Anexo 7	Castración de testículos de alpacas menores de un año, Pillpichaca-Huancavelica 2016 56
Anexo 8	Descapsulación del testículo de alpacas, laboratorio de Biotecnología UNSCH, 2016 57
Anexo 9	Medición del testículo de alpaca menores de un año, laboratorio de Biotecnología UNSCH, 2016. 57
Anexo 10	Pesado de los testículos de alpacas menores a un año, laboratorio de Biotecnología UNSCH, 2016. 58
Anexo 11	Corte del tejido testicular de alpaca menores de un año, laboratorio de Biotecnología UNSCH, 2016. 58
Anexo 12	Triturado con pilón y filtrado en el recipiente estéril laboratorio de Biotecnología UNSCH-Ayacucho 2016. 59
Anexo 13	Distribución del filtrado del tejido testicular en los tubos cónicos adicionado con DMEM suplementado, laboratorio de Biotecnología UNSCH-Ayacucho, 2016. 59
Anexo 14	Centrifugado del filtrado del tejido testicular en los tubos cónicos adicionado con DMEM suplementado, 32°C, laboratorio de Biotecnología UNSCH Ayacucho, 2016 60

Anexo 15	Determinación de la viabilidad después del aislamiento de las SSCs a partir de testículos de <i>Vicugna pacos</i> Laboratorio de Biotecnología Ayacucho, 2016	60
Anexo 16	Observación al microscopio de las SSC después del aislamiento a partir de testículos de <i>Vicugna pacos</i> Laboratorio de Biotecnología UNSCH-Ayacucho, 2016	61
Anexo 17	Células espermatogoniales aisladas de testículo de alpaca a diferentes edades.	62
Anexo 18	Preparación de solución salina fisiológica 0,9%	63
Anexo 19	Preparación de alícuotas de NaCl 0,15 M (25 ml)	63
Anexo 20	Composición y preparación de PBS	63
Anexo 21	Preparación de la dilución de Azul de Tripán al 0,05%	63
Anexo 22	Preparación de 250 ml DMEM suplementado	64
Anexo 23	Preparación de solución Stock de penicilina	64
Anexo 24	Preparación de enzima DNasa I	65
Anexo 25	Análisis de varianza del aislamiento de células espermatogoniales obtenidas de testículo de alpaca a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.	65
Anexo 26	Análisis de comparación múltiple prueba de Fisher a un Nivel de confianza de 95% para determinar el porcentaje de células espermatogonias por campo microscópico aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.	65
Anexo 27	Análisis de varianza de viabilidad de células espermatogoniales aisladas de testículo de alpaca a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.	65
Anexo 28	Análisis de comparación múltiple prueba de Fisher a un Nivel de confianza de 95% para determinar la viabilidad de células espermatogoniales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.	65
Anexo 29	Análisis de Varianza del rendimiento de células espermatogoniales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.	66
Anexo 30	Análisis de comparación múltiple prueba de Fisher a un Nivel de confianza de 95% para determinar del rendimiento de células	66

	espermatogoniales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.	
Anexo 31	Análisis de varianza de mortalidad de células espermatogoniales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.	66
Anexo 32	Análisis de comparación múltiple prueba de Fisher a un Nivel de confianza de 95% para determinar mortalidad de células espermatogoniales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.	66
Anexo 33	Población y distribución por razas de alpacas en el Perú	67
Anexo 34	Matriz de consistencia	68

RESUMEN

La crianza de alpacas es una de las principales actividades económicas de las comunidades altoandinas más pobres de la Región Ayacucho y del Perú, que permite producir carne para el consumo humano y fibra para la industria textil, en los últimos años se ha incrementado la pérdida de las poblaciones de alpacas, frente a esta realidad, la biotecnología reproductiva comprende un conjunto de alternativas valiosas que pueden ayudar a solucionar estos problemas, a través de la posibilidad que representa el trasplante intertesticular de células madre espermátogoniales (SSC), de machos con alto valor genético a otros machos genéticamente inferiores, es así que determinar el porcentaje de viabilidad y rendimiento de espermátogonias aisladas a partir de testículos de alpaca a diferentes edades a través del método de digestión enzimática, es el primer paso que permite desarrollar estas técnicas. Las muestras fueron testículos de *Vicugna pacos* "alpaca" *post mortem* del Matadero Municipal de Huancavelica, así como testículos de obtenidos por castración de alpacas de la comunidad de Ccarhuaccpampa, en Ayacucho y Pilpichaca en Huancavelica, lo cual el aislamiento de células se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica y en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, desde setiembre de 2015 hasta enero 2016. Así la viabilidad y el rendimiento fueron determinados por la lectura de la Cámara Hemocitométrica utilizando el colorante de exclusión vital, Azul de Tripán. Se obtuvo una viabilidad de 75-90% y el rendimiento de $1-1,9 \times 10^6$ cel/ml, así el aislamiento de células espermátogoniales de alpaca fueron altos en los cuatro grupos etarios, por lo que no se encontró diferencia estadística significativa.

Palabras clave: espermátogonias, digestión enzimática, viabilidad, rendimiento.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A _d	: Espermatogonias de tipos oscuras (siglas en inglés)
A _s	: Células simples (siglas en inglés)
ASPC	: Células madre espermatogoniales agregadas (siglas en inglés)
A _p	: Espermatogonias de tipos claras (siglas en inglés)
A _{pr}	: Células predeterminadas (siglas en inglés)
A _{al}	: Células alineadas (siglas en inglés)
In	: Células espermatogoniales intermedias
B	: Espermatogonia de tipo B
BSC	: Células madre basales (siglas en inglés)
CSPC	: Células espermatogoniales precursoras
DMEM	: Medio mínimo esencia Dulbecco (siglas en inglés)
GDNF	: Factor Neutrofico Derivado de las Células Gliales
PGC	: Células del primordio germinal (siglas en inglés)
SC	: Células madre (siglas en inglés)
SSC	: Células madre espermatogoniales (siglas en inglés)
SPGA	: Espermatogonia de tipo A
SPGB	: Espermatogonia de tipo B
SPCI	: Espermatocito primario
SPCII	: Espermatocito secundario

I. INTRODUCCIÓN

La crianza de alpacas es una de las principales actividades económicas de las comunidades altoandinas más pobres de las regiones Ayacucho, Huancavelica, Arequipa, Puno y Cuzco; que permite producir carne para el consumo humano y fibra para la confección de prendas de vestir. Sin embargo, la industria textil exige una fibra más fina y por otro lado está en cuestión la pureza genética de la especie, ya que varios especialistas señalan que la alpaca es una especie que se encuentra en peligro de extinción por la vía de la hibridación. Frente a esta realidad, la biotecnología reproductiva comprende un conjunto de alternativas valiosas que pueden ayudar a solucionar estos problemas, no solamente a través de la aplicación de técnicas ya conocidas como la inseminación artificial y la transferencia de embriones; sino sobre todo a través de la posibilidad que representa el trasplante intertesticular de células madre espermatogoniales (SSC), de machos con alto valor genético a otros machos genéticamente inferiores.

Las SSC son responsables de su autorrenovación y diferenciación en espermatozoides durante toda la vida reproductiva del macho. Sin embargo, representan tan solo el 0,03% de la población total de células testiculares. De modo que su aislamiento y cultivo son aspectos fundamentales para profundizar los estudios en este campo, por lo que resulta importante conocer en esta especie la edad más apropiada del macho para aislar inicialmente espermatogonias y luego purificar las SSC.

Existen algunos métodos para el aislamiento de células espermatogoniales que se han venido utilizando en otras especies como toro, ratón, rata, macaco y perro, tales como el método de disgregación mecánica, el método enzimático y el método de disgregación mecánico-enzimático. En el presente trabajo, para el aislamiento de espermatogonias de alpaca se utilizó el método enzimático con tripsina, hialuronidasa, colagenasa y DNasa, determinando la viabilidad con Azul de Tripán

y el rendimiento en términos de número de espermatogonias aisladas por mililitro de DMEM, en machos de cuatro grupos etarios: menores a un año, mayores a un año, de tres a cuatro años y mayores de cinco años.

Los objetivos fueron los siguientes:

Objetivo general:

Determinar el porcentaje de viabilidad y rendimiento de espermatogonias aisladas a partir de testículos de alpaca a diferentes edades.

Objetivos específicos:

- Aislar espermatogonias de alpaca por digestión enzimática.
- Determinar el porcentaje de viabilidad y rendimiento de espermatogonias.
- Establecer la edad de la alpaca donde espermatogonias inician la diferenciación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Al estudiar el aislamiento y purificación de espermatogonias de tipo A de testículos de ratas, a partir de muestras de ratas de 9 días de edad (pre-púberes) de las cuales se consideraron 20 animales, con 10 repeticiones, se desarrolló un nuevo método que permitió aislar espermatogonias de tipo A altamente puras; el método se basó en la liberación máxima de espermatogonias del epitelio seminífero, se sometió a una completa digestión enzimática de la lámina basal, teniendo como resultado total $1-2 \times 10^6$ espermatogonias, las cuales se recolectaron en 5-6 h de trabajo; en la suspensión de células somáticas se obtuvo un 85% de espermatogonias de tipo A, presentando mayor concentración en el epitelio seminífero 75-85% aproximadamente, $5-10 \times 10^4$ espermatogonias por animal.¹

En otro estudio sobre la transformación de espermatogonias de tipo A de ratón mediada por liposomas, se trabajó con testículos de ratones Swiss de 6-7 días y de 16-17 días de edad, los cuales se sometieron a digestión enzimática; se obtuvieron resultados de aquellos con los que se trabajó con 6-7 días, se aislaron células (germinales y somáticas) en un promedio de $4-6 \times 10^5$ células por testículo, mientras que en ratones de 16 días de edad la población celular obtenida aumentaba significativamente, aislándose $2-4 \times 10^6$ células por testículo. Para incrementar la proporción de espermatogonias de tipo A del total de la suspensión celular se realizó una separación inicial de células en función de su tamaño y peso utilizando un gradiente de Percoll. En los ratones de 6-7 días aparecían tres fracciones, siendo la fracción intermedia correspondiente a espermatogonias de tipo A. Para los ratones de 16 días aparecían 9 fracciones, siendo las fracciones 4 y 5 del gradiente con alto porcentaje de espermatogonias de tipo A.²

En el caso del aislamiento y purificación de espermatogonias de tipo A de testículos de bovino, donde la población de estudio fueron terneros de 5-7 meses de edad, para el aislamiento se utilizó dos pasos de digestión enzimática, la

viabilidad se determinó mediante el método de tinción celular, la identificación de espermatogonias de tipo A y purificación se determinó con microscopio de Nomarski. Después del aislamiento se obtuvo como resultados el 25% de espermatogonias de tipo A, en la purificación se obtuvo 65-87% de espermatogonias de tipo A puras mediante gradiente discontinuo de Percoll. La viabilidad de las células después del aislamiento fue de más de 90% con la disminución significativa después de la incubación en cultivo y exposición al gradiente discontinuo de Percoll. Así mismo la pureza de espermatogonias de tipo A fue alta en terneros de 5 meses de edad en comparación con los de 6-7 meses.³ De otro lado, al investigar las mejores condiciones para aislar y mantener en cultivo *in vitro* SSC de *Canis lupus familiaris* "perro", no se realizó distinción etaria entre los individuos donantes. Se utilizaron dos métodos, uno enzimático (colagenasa tipo IV, hialuronidasa y tripsina) y otro no enzimático (disgregación mecánica con jeringa). Se observó que aquellas células aisladas por el método no enzimático son aquellas que generan mayor número de colonias, pero que no resisten a más de 3 pases (cambio de medio de cultivo); en contraste con lo que se observan en células aisladas por el método enzimático, que resisten hasta 7 pases, pero que no generan muchas colonias. Se obtuvo un 63% y 28% de las SSC en las capas con 45-60% y 30-45% de Percoll respectivamente, las diferencias de las células aisladas se encontraron en otras capas del gradiente de Percoll que además incluían a células somáticas, por lo que se decidió descartar. Se evaluó la viabilidad con Azul de Tripán y la actividad de la fosfatasa alcalina de las células que se recuperaron en las fracciones de 45-60% y 30-45% de Percoll en ambos casos las células respondieron positivamente, en más de un 93% para ambos métodos y mediante el uso de la prueba T de Student no se detectaron diferencias significativas entre los métodos de aislamiento ($0.05 < p$).⁴

2.2. Células madre

Las características más importantes de las células madre (SC, del inglés, "*Stem Cells*") que permiten definir las y diferenciarlas de la gran mayoría de las células constitutivas, son: (i) la capacidad de autorenovarse y reemplazarse a sí mismas, (ii) la capacidad de diferenciarse en uno o más linajes o tipos celulares especializados y (iii) el enorme potencial proliferativo para renovar y mantener los tejidos en los que se encuentran.⁵

Existen dos tipos de divisiones que pueden sufrir las SC, divisiones simétricas y divisiones asimétricas. Las primeras comprenden a su vez dos posibilidades, una

división simétrica que dé lugar a dos SC o bien que genere dos células progenitoras que posteriormente se diferenciarán hacia algún linaje celular. Las divisiones asimétricas generarán una SC y una célula progenitora. El compromiso de la célula progenitora formada hacia una determinada diferenciación puede ser adquirido de dos maneras, (i) que los determinantes de destino celular en la SC estén distribuidos asimétricamente y heredados de forma mayoritaria por la célula progenitora, o, por el contrario, (ii) que sea la salida del microambiente la que determine el inicio de la diferenciación.⁵

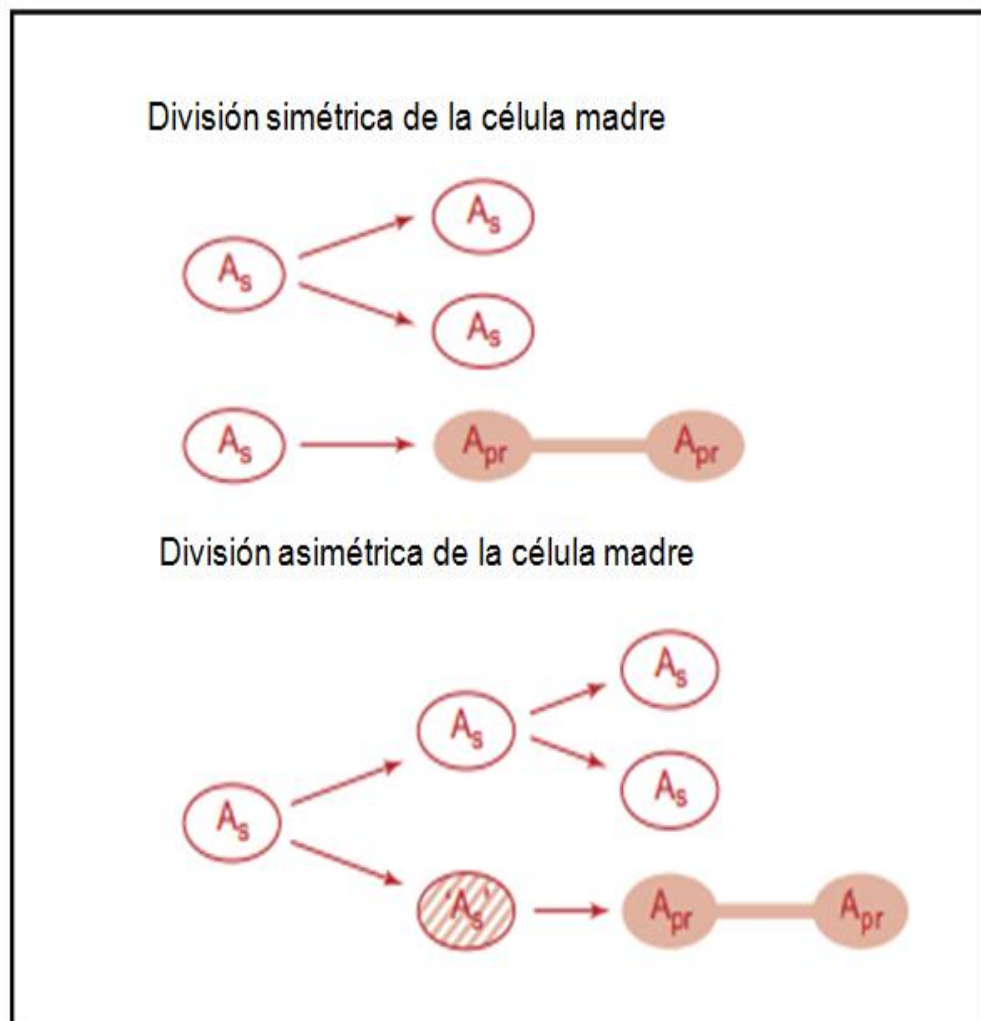


Figura 1. Esquema de dos posibles mecanismos de renovación y compromiso de células madre espermatogoniales hacia la diferenciación, en ratones.⁶

2.3. Anatomía y fisiología del testículo de los mamíferos

Los testículos son glándulas de secreción externa porque en ellos se originan los espermatozoides y de secreción interna porque las células intersticiales elaboran una hormona llamada testosterona. Estos órganos ovoides se encuentran

alojados en el escroto, fuera de la cavidad abdominal y están constituidos por tres estructuras.⁷

1. Cápsula de tejido conectivo denso denominada túnica albugínea, membrana fibrosa gruesa, contiene numerosos vasos y una red de conductos espermáticos, cumple funciones de protección del testículo, regulación del flujo sanguíneo y movimiento del espermatozoides a través de contracciones.^{7,8}
2. Red de Haller, presenta tabiques que divide el testículo en túbulos seminíferos. Un tejido propio que contiene células seminales que dan origen a los espermatozoides y células intersticiales (secreción interna).⁷
3. Conductos seminíferos, abarca el testículo y el epidídimo (comprende la cabeza, cuerpo y la cola) dando origen al conducto deferente.⁷

Existe otra cápsula que se caracteriza por ser una membrana fuerte, traslúcida de color blanco denominada túnica vaginalis que cubre los testículos, el epidídimo y vasos deferentes.⁹



Figura 2. Testículo de *Vicugna pacos* mayores de 4 años.¹⁰

2.3.1. Organización del testículo

El testículo está dividido en una serie de compartimientos con forma piramidal (prolongaciones hacia el interior que dan lugar a los septos),^{8,9} conocidos como lobulillos que están comunicados entre sí, los tabiques que los separan presentan orificios.⁹ Se estima que hay más de 250 lobulillos por cada testículo, que contienen de 1 a 4 túbulos seminíferos,⁸ de manera que existe un aproximado de 500 tubos seminíferos por testículo.⁹

Los testículos están constituidos por los túbulos seminíferos en cuyas paredes se desarrollan los espermatozoides a partir de las células germinales (encargadas de la espermatogénesis) y células de Sertoli.⁷

Entre el túbulo y los testículos existe una serie de células que contienen gránulos de lípidos que son denominadas células intersticiales de Leydig.⁷

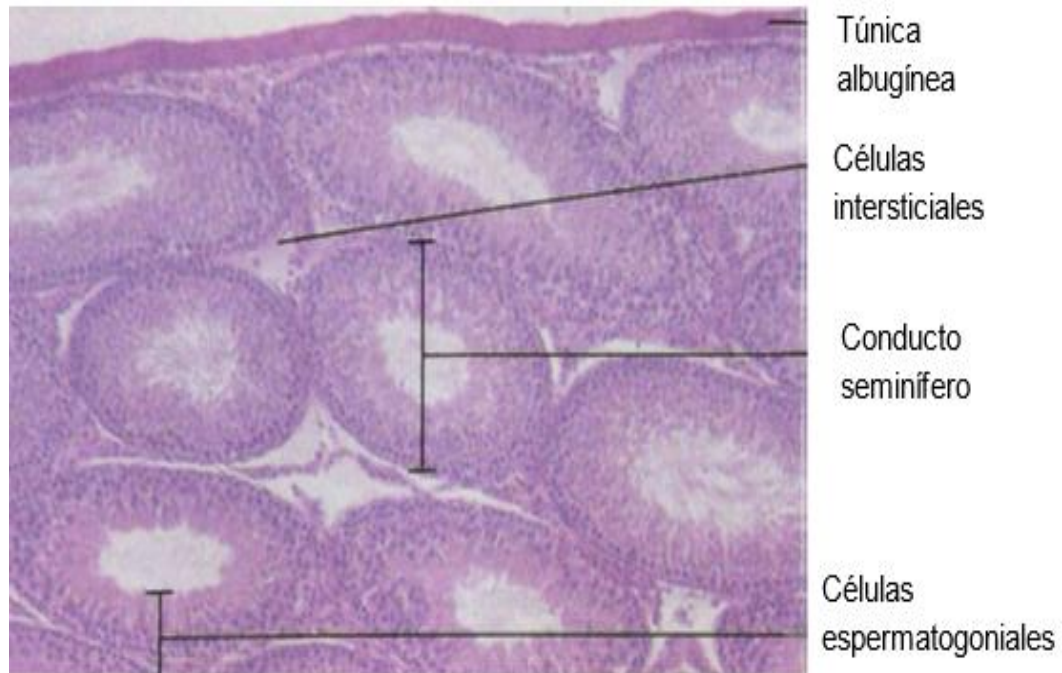


Figura 3. Observación microscópica de corte transversal de los túbulos seminíferos del testículo de toro.¹¹

2.3.2. Tipos de células testiculares

2.3.2.1. Células Madre Espermatogoniales (SSC)

Las SC adultas de los testículos, llamadas Células Madre Espermatogoniales (del inglés, "*Spermatogonial Stem Cells*") están localizadas en la periferia de los túbulos seminíferos rodeadas por las células de Sertoli, en contacto directo con las matrices extracelulares como el colágeno, la lámina y la fibronectina.¹¹ Desde la pubertad, las SSC empiezan a diferenciarse y a producir espermatozoides maduros.⁵ Las SSC son la base celular para la producción continua de espermatozoides a lo largo de la vida del individuo. Además, se encuentran en una proporción del 0,03%¹² de las células situadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos. Las SSC provienen de las PGC (del inglés, "*Primordial Germ Cells*"), las cuales derivan de las células epiblasticas pluripotentes. Tras la migración de las PGC a las crestas gonadales, donde proliferan e incrementan su número, al quedar localizadas en los túbulos seminíferos se diferencian en gonocitos.⁵

La regulación de las SSC, ocurre por señales intrínsecas y extrínsecas, como es la muerte por apoptosis o la actuación de factores sistémicos. Gran parte de estos factores son producidos por las células de Sertoli y Leydig siendo secretados en áreas muy particulares del nicho (incluyen las células de Sertoli, la membrana basal del túbulo seminífero, las células mioides peritubulares y las señales externas).⁵

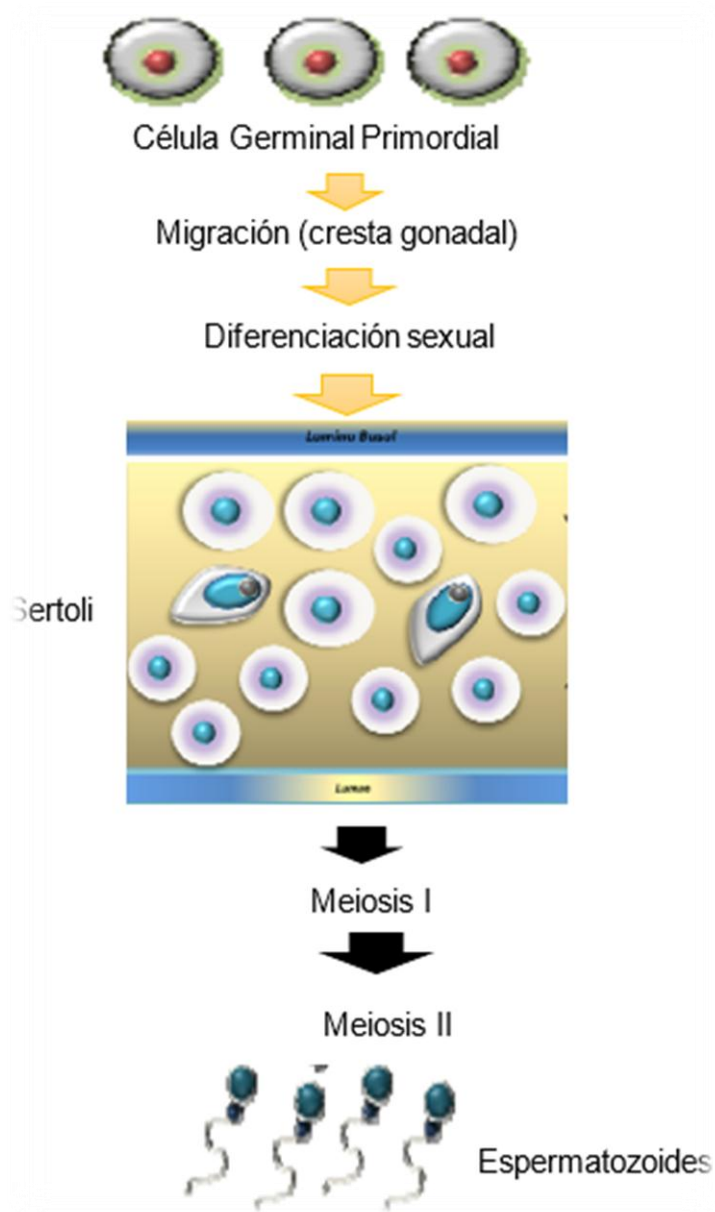


Figura 4. Desarrollo de la línea germinal masculina.¹¹

2.3.2.2. Espermatogonias

Las espermatogonias son un grupo de células basales, heterogéneas con distintos grados de indiferenciación. Se ubican en la región periférica de los túbulos seminíferos y componen el reservorio de células. Son las que dan lugar a las

espermátidas y espermatozoides maduros en los túbulos seminíferos,^{13,14} a lo largo de la vida adulta, transmitiendo la información genética y autorenovándose para mantener un suministro constante.⁸

Existen numerosas clases de espermatogonias que difieren entre el modelo murino y humano. En el testículo humano, se identifican 3 tipos de espermatogonias, que se clasifican como: tipo A_{oscuro} (A_d), tipo A_{claro} (A_p), y tipo B. En ratones existe 4 clases A indiferenciadas (A_s, A_{pr}, A_{al}), diferenciadas (A₁, A₂, A₃, A₄), intermedias (In) y B que aparecen en forma secuencial en el tiempo y existe una disminución de su tamaño, además la mayoría de las espermatogonias de tipo A₂ y A₃ se degeneran durante la diferenciación (mayor apoptosis celular), se estima que solo existe el 25% de células que sobreviven para dar lugar a espermatozoides maduros.⁸

2.3.2.3. Células de Sertoli

Son células de apoyo para las células germinales, ubicadas en la superficie interna de la pared de los túbulos seminíferos y desde aquí su cuerpo celular se extiende a través de todo el epitelio.⁹ Las células de Sertoli comprenden solamente un 3% de la población celular del testículo.¹⁵ Son las únicas células somáticas que están relacionadas directamente con las células germinales y por lo tanto constituyen el componente primario celular del nicho de la línea germinal.¹⁶ Las células de Sertoli dividen el túbulo seminífero en la zona basal, donde residen las espermatogonias y zona adluminal, cerca al lumen del túbulo seminífero, donde se van diferenciando. Estas regiones quedan separadas por la barrera hematotesticular conformada por las uniones estrechas impermeables entre las células de Sertoli,¹⁷ que evita el paso de moléculas grandes desde el espacio intersticial, esta barrera protege de agentes nocivos presentes en la sangre al evitar que penetren a la circulación y generen una respuesta autoinmunitaria.⁷

Las células de Sertoli sirven como soporte físico y nutricional a las células germinales, fagocitan a las células que han degenerado y también permite la liberación de las espermátidas maduras, además, actúan como reguladores durante la organogénesis del testículo, influyen en la formación del cordón testicular. Del mismo modo permanecen presentes durante toda la vida sexual; su número es un factor limitante en la producción de espermatozoides.⁸ Es importante señalar que tras la formación del testículo las células de Sertoli y las células germinales experimentan una rápida diferenciación y durante la pubertad

se genera el cese de la mitosis y la diferenciación en espermatozoides ⁶ y se ha visto que en adultos el número de células de Sertoli se mantienen.⁸

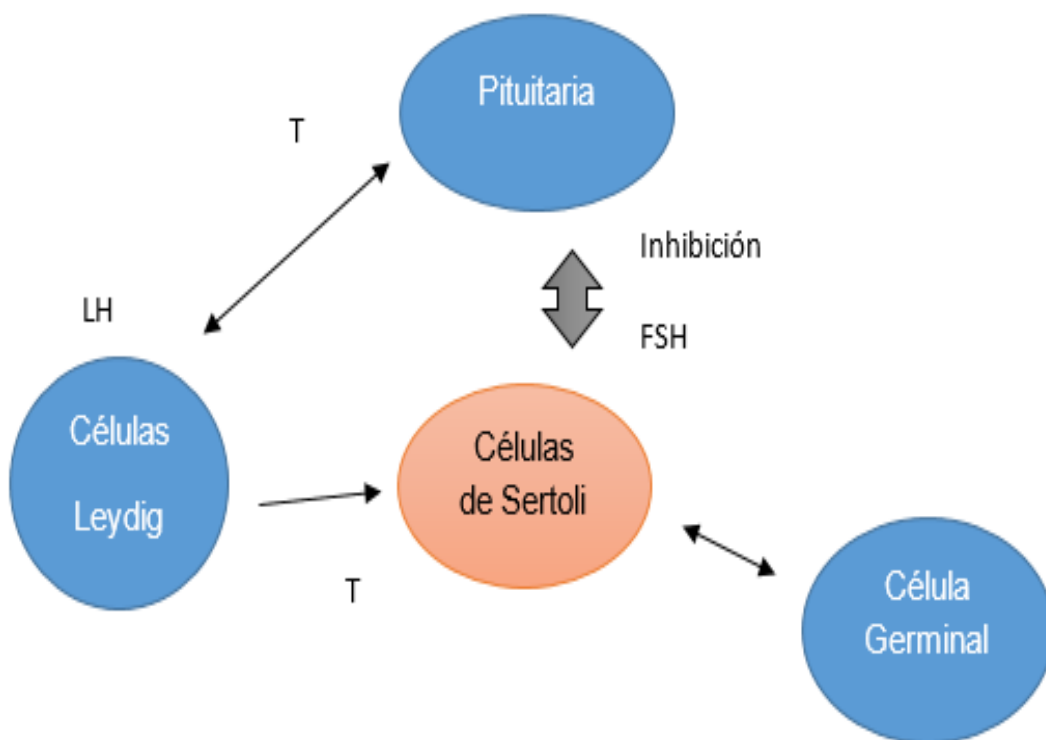


Figura 5. Diagrama del rol central de la célula de Sertoli en la espermatogénesis. Relación de la célula de Sertoli entre la glándula pituitaria, la célula de Leydig y célula germinal. La glándula pituitaria secreta la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) y regula a su vez por la retro alimentación de la testosterona (T) e inhibina del Leydig y la célula de Sertoli.¹⁷

2.3.2.4. Células mioideas

Las células mioideas representan el mayor componente celular de la pared del túbulo seminífero. Están dispuestas en una monocapa (modelo murino) y varias capas (humanos) entre dos láminas basales alrededor de los túbulos seminíferos.¹⁸ Son células planas, alargadas y positivas para la α -actina de músculo liso.¹⁹

La principal función biológica está atribuida a la actividad contráctil, responsable de la contracción de los túbulos seminíferos para el transporte de espermatozoides y líquido testicular²⁰ la generación de impulsos para la progresión de los espermatozoides y del fluido testicular hacia la rete testis, una función crucial para la fertilidad masculina.¹⁸

Son un importante componente estructural, también un elemento activo en el mantenimiento del homeostasis del testículo mediante la secreción de diferentes factores, así como del establecimiento del nicho para las células madre del testículo.¹⁹

2.3.2.5. Células de Leydig

Las células de Leydig o células intersticiales se encuentran entre los espacios intersticiales que se forman entre los túbulos seminíferos.⁹ El testículo fetal, pre-puberal y adulto difieren en las necesidades de células de Leydig, durante la vida fetal alcanzan su mayor número relativo 48 millones de células por par de testículos ocupando el 50% de la superficie en cortes transversales de testículo, pero el número absoluto disminuye progresivamente hasta llegar a 18 millones por par de testículos²¹ o el 20% de la población.⁹

Su principal función es la biosíntesis de testosterona que conduce al mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios masculinos, diferenciación sexual masculina, además del mantenimiento de la espermatogénesis.²¹

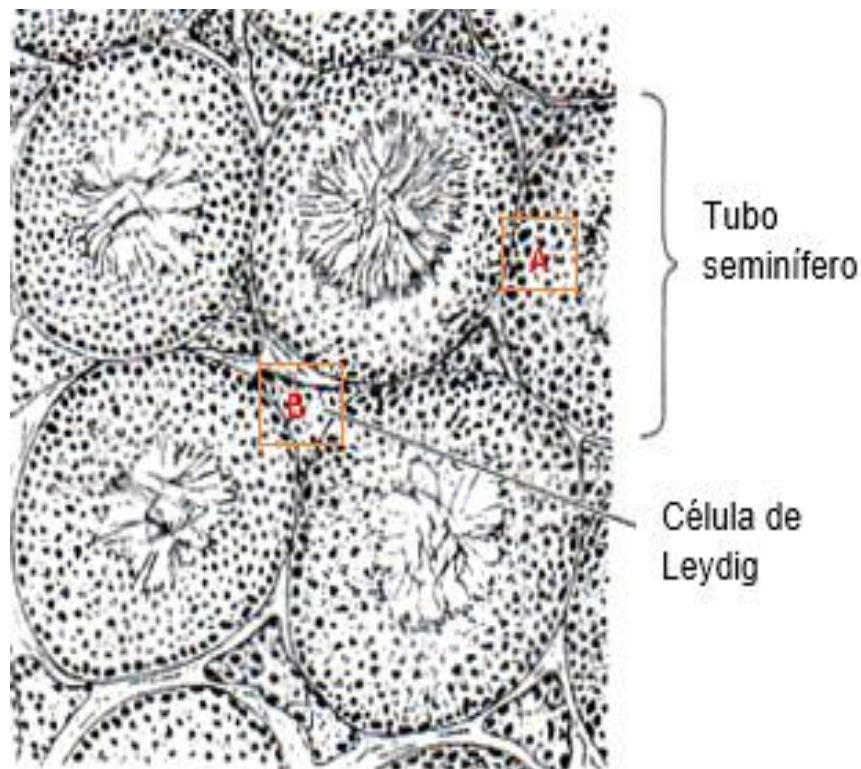


Figura 6. Representación de una sección del testículo humano (corte sagital) observándose el túbulo seminífero (A) y células de Leydig (B).⁹

2.4. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso biológico muy complejo que requiere la diferenciación continua y la renovación germinal de las células masculinas. Es el proceso por el cual las células se transforman produciendo células germinales haploides masculinas a partir de las células madre de espermatogonias, células diploides. Este proceso comienza un poco antes de la pubertad bajo la influencia de las concentraciones cada vez mayores de gonadotrofinas hipofisarias y se prolonga durante toda la vida del individuo.¹¹

En la espermatogénesis se distinguen tres fases principales: la renovación de espermatogonias (proliferación), la meiosis y espermiogénesis, pasos consecutivos que se inician con la división de las espermatogonias y finalizan con la formación de espermatozoides maduros.¹¹

2.4.1. Fase proliferativa

La proliferación de espermatozoide depende del tamaño de la población de células iniciales conocidas como espermatogonias.¹¹

2.4.2. Meiosis

La entrada de las células de tipo B en el proceso de la meiosis, está marcada a través de la disminución del contacto con la membrana basal de los túbulos seminíferos y con la aparición de los cromosomas. Durante la primera división meiótica, las células de tipo B se convierten en espermatocitos primarios, sufren numerosas divisiones originando sub-etapas que representan la fase prolongada de la profase. Esas fases de la Profase I son: Leptoteno, Zigoteno, Paquiteno y Diploteno hasta llegar a espermatocito secundario. Después de aproximadamente 6 h (en humanos) sufren una nueva división formando las espermátidas. Estas dos divisiones resultan en la conversión de células diploides a células haploides, con solo 23 cromosomas.¹¹

2.4.3. Espermiogénesis

Es el proceso de transformación celular de las espermátidas en espermatozoides, que son células especializadas, para ejercer su función de motilidad e interacción con el ovocito. Dentro de los cambios más importantes en esta fase se encuentran:

1. El desarrollo del acrosoma, que deriva del aparato de Golgi y contiene las enzimas necesarias para poder penetrar en la zona pelúcida del ovocito.¹²
2. La aparición del flagelo, que se origina a partir de los centriolos y tiene una función energética gracias a la presencia de un número importante de mitocondrias que se encuentran rodeando el axonema (pieza media).¹¹
3. La reorganización del citoplasma, liberando el excedente como un cuerpo residual fagocitado por las células de Sertoli y por último los cambios en la forma contenido (debido a las modificaciones químicas en su DNA y proteínas nucleares) y posición del núcleo celular que migra de su posición central a la periferia celular.¹¹

2.5. Comparación de la espermatogénesis murina, bovina y de primates

En los testículos de los mamíferos se han descrito dos subpoblaciones de espermatogonias de tipo A que proliferan activamente para producir células

espermatogonias diferenciadas e indiferenciadas.²² Las espermatogonias indiferenciadas incluyen a células madre de tipo A y células espermatogonias proliferativas comprometidas a diferenciar células de tipo A_{pr} y A_{al} , que a su vez dan lugar a la primera generación de espermatogonias diferenciadas.²²

2.5.1. Espermatogénesis en ratones

La diferenciación germinal en los testículos de ratón comienza desde una pequeña población de células ($2-3 \times 10^4$ por testículo adulto) llamadas espermatogonias A_s (del inglés, “single”).²²

Las espermatogonias A_s son las consideradas SSC. Al dividirse, estas células podrán originar, por un lado, 2 nuevas A_s , o bien, por otro, las llamadas espermatogonias A_{pr} que serán las células predeterminadas a originar el resto de células que conformarán la espermatogenia. Así cada célula A_{pr} originará, a su vez, 2 nuevas células unidas por un puente intercelular, que se mantendrá en su descendencia, para originar las espermatogonias A_{al} (espermatogonias alineadas).²²

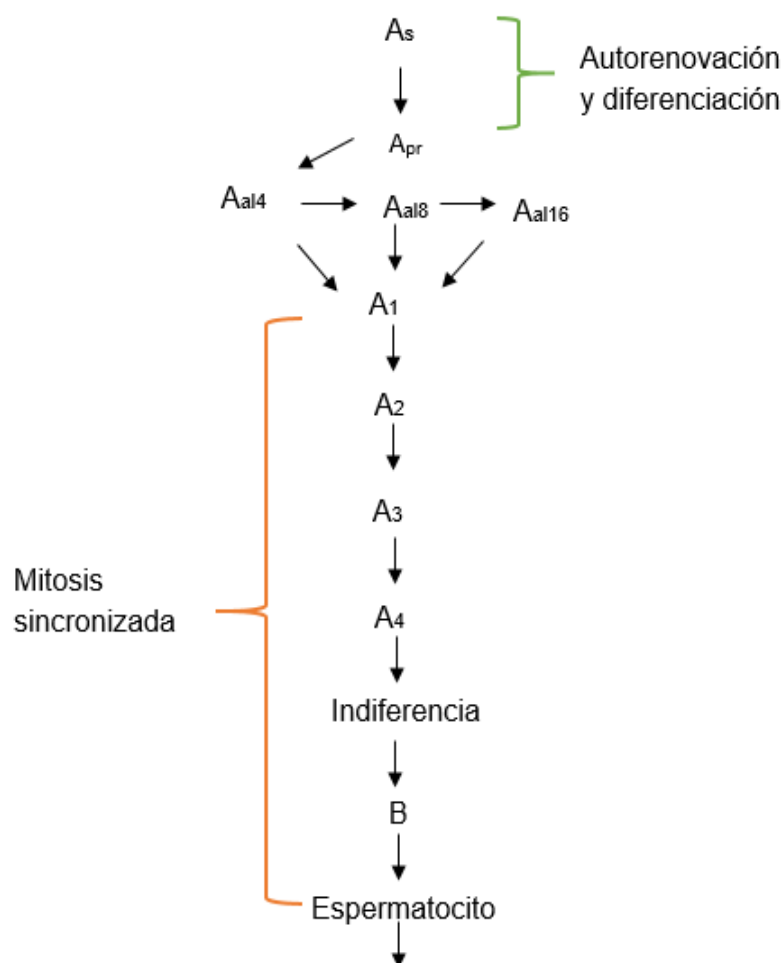


Figura 7. Desarrollo de espermatogonias en la espermatogenia de ratón. ²²

En cuanto a los factores implicados en la regulación de la diferenciación de espermatogonias A_s a A_{pr} , existe el Factor Neurotrófico Derivado de las Células Gliales (GDNF), que es secretado por las células de Sertoli y cuyos receptores se expresan en las células madre. Al contrario que en la formación de espermatocitos, que presenta unos mecanismos de regulación exhaustivos, la formación de SSC presenta un escaso control, lo que conlleva una distribución de espermatogonias A_1 no homogénea en el testículo. El control de la formación de espermatocitos se debe a mecanismos de apoptosis de las espermatogonias de tipo A_2 , A_3 y A_4 .²²

2.5.2. Espermatogénesis en bovinos

En bovinos se ha sugerido una clasificación diferente para las espermatogonias de tipo A, que se han dividido en BSC (Basal Stem Cell), ASPC (Agregated Spermatogonial Stem Cell) y CSPC (Commited Spermatogonial Precursor Cell). Las BSC son células redondas con tres nucléolos irregulares y se podrían comparar con las espermatogonias A_s y A_{pr} del modelo murino.²² Las ASPC son células de diferentes tamaños. Las CSPC son las espermatogonias más grandes. Presentan un nucléolo central grande y que corresponden con las espermatogonias A_1 - A_4 diferenciadas del modelo murino.²²

2.5.3. Espermatogénesis en primates

Se distinguen 3 tipos de espermatogonias: espermatogonias oscuras (A_d), espermatogonias pálidas (A_p) y espermatogonias de tipo B (B). Las A_d , dentro de las cuales se encuentran las SSC, se sitúan en íntimo contacto con la membrana basal. Carecen de actividad proliferativa en circunstancias normales, pero entran en mitosis cuando el número de espermatogonias desciende drásticamente. Al dividirse las A_p , originan las espermatogonias de tipo B, que son las precursoras de los espermatocitos preleptotene, presentan un menor contacto con la membrana basal, tienen gránulos de cromatina muy condensada próximos a la membrana nuclear y su nucléolo se encuentra situado en la región central. Las mitocondrias se encuentran dispersas por el citoplasma y parecen presentar diferencias en cuanto al material intermitocondrial respecto a las espermatogonias de tipo A.²

Tabla 1. Comparación de los tipos de espermatogonias murinas, bovinas y de primates.^{22,23}

Murina	Bovina	Primates
A _s	BSC	A
A _{pr}		A _p
A _{al4} -A _{al8} - A _{al16}	ASPC	A _d
A ₁	CSPC	
A ₂		
A ₃		
A ₄		
B	B	B
Espermatocito	Espermatocito	Espermatocito

2.6. Inicio de espermatogénesis en alpaca

En el nacimiento, el pene está adherido por completo al prepucio. Ésta adherencia desaparece en forma gradual con el crecimiento del animal bajo la influencia de la testosterona. Al primer año de edad los machos muestran interés sexual por las hembras y el 8% presentan una separación completa de la adherencia entre el prepucio y el pene, a los dos años, cerca del 70% no tienen adherencia y a los tres años el 100% no presentan adherencia. Sin embargo, la pubertad ocurre cuando el macho es capaz de producir espermatozoides, de dos a once meses (etapa infantil), los testículos crecieron con lentitud y mostraron un incremento secuencial del tamaño de los cordones sexuales con células de Leydig no diferenciadas en tejido conectivo. Alrededor de 12 meses, el cordón sexual empieza a mostrar un lumen que contiene dos tipos de células, las de soporte y los gonocitos, estos últimos empiezan a cambiar para dar paso a los espermatocitos y los primeros espermatozoides que aparecen cerca de los 18 meses. Las células de Leydig aparecen bien formadas y el número aumenta de manera considerable aproximadamente a los 20 a 24 meses, los espermatozoides son más evidentes y los diámetros de los túbulos seminíferos aumentan de manera notable, así también incrementa los espermatozoides en la cabeza del epidídimo. Todas las alpacas de más de tres años tienen espermatozoides en ambos epidídimos. La espermatogénesis se inicia en algunas alpacas desde los 16 meses y en otras hasta los 26 meses de edad.²⁴

2.7. Aislamiento de células espermatogoniales

La presencia de SSC en el testículo adulto se limita al 0,03% del total de células germinales.¹² De esta manera, la elección de la técnica más adecuada para aislar

células germinales es muy importante como prerrequisito para los estudios bioquímicos, moleculares y genéticos definitivos de la diferenciación de células germinales.¹⁵ Así también para establecer como cultivo *in vitro*.

2.7.1. Métodos de aislamiento de espermatogonias

El aislamiento logra definir las características morfológicas de las células. Así como la determinación del aspecto temporal de células espermatogoniales durante desarrollos de diferenciación celular. Existen tres métodos para el aislamiento de espermatogonias: disgregación mecánica, disgregación mecánico-enzimática y digestión enzimática.^{4,15,25,26}

2.7.1.1. Disgregación mecánica

Esta técnica consiste en colocar una porción de tejido, con 1 ml de amortiguador de separación, se realiza dos ciclos de corte por un minuto, con ayuda de una jeringa desechable estéril, la suspensión se aspira y se filtra en filtros de 70 µm, se realiza un lavado con 6 ml de amortiguador de separación. La suspensión se centrifuga a 2000 rpm por 10 min para luego descartar el sobrenadante; por último, el botón se resuspende en 300 µl de amortiguador de separación.²⁵

2.7.1.2. Disgregación mecánico-enzimática

La porción de tejido se transporta a tubos de poliestireno que contienen un volumen de 10 ml de medio completo. Luego se centrifuga a 2000 rpm por 5 min descartando el sobrenadante. Al botón resultante se le agrega la solución stock de collagenasa en una concentración de 2,5 ml/g. Posteriormente, la muestra se incuba a 37°C con agitación por 45 min. Pasado ese tiempo, se coloca 5 ml de medio completo frío para detener la acción de la collagenasa y se centrifuga a 200 rpm por 10 min. Al botón obtenido se agrega 1 ml de amortiguador de separación y se realiza dos ciclos de corte por 1 min. La suspensión se aspira con una jeringa desechable estéril para filtrarla con filtros de 70 µm. Luego se realiza un lavado con 6 ml de amortiguador de separación y se centrifuga a 2000 rpm durante 10 min. Por último, se descarta el sobrenadante y se agrega 5 ml de PBS, se centrifuga nuevamente a 2000 rpm por 5 min y se resuspende el botón en 300 µl de buffer de marcación.²⁵

2.7.1.3. Digestión enzimática

La técnica basa en el uso de enzimas en dos etapas de digestión. En la primera, se utilizan cuatro enzimas: collagenasa, tripsina, hialuronidasa y DNasa para digerir el tejido testicular previamente triturado; posteriormente la muestra se incuba a 32°C en agitación moderada por 1 h. En la segunda, se utilizan tres

enzimas: colagenasa, hialuronidasa y DNasa, incubándose a 32°C por 45 min en agitación moderada; después se somete a lavado por centrifugación tres veces con DMEM suplementado y atemperado a 32°C, hasta que el sobrenadante sea transparente.³

2.7.2. Acción de las enzimas durante la digestión testicular

2.7.2.1. Tripsina

Permite la disociación y disgregación de las células epiteliales sin dañar la membrana basal y tejidos de mamíferos. Es una peptidasa que rompe (hidroliza) los enlaces peptídicos de las proteínas, degradándolas en fragmentos más pequeños hasta péptidos y aminoácidos. Se utiliza para disociar a las células, tejidos y pases de cultivos celulares. Ésta enzima actúa a un pH de 7-8.4.²⁶

2.7.2.2. Hialuronidasa

Cataliza la ruptura de los enlaces internos glicosídicos, modificando la permeabilidad de los tejidos conectivos animales mediante la hidrólisis del ácido hialurónico, polisacárido presente en la matriz extracelular^{27,28} y condroitin sulfato hasta fragmentos menores como tetrasacáridos o disacáridos.²⁹

2.7.2.3. Colagenasa

La colagenasa es una proteasa. Hidroliza el colágeno, rompiendo sus cadenas alfa. Esta enzima tiene la capacidad de degradar las fibrillas y microfibrillas de colágeno (ubicada en la mayoría de los tejidos intersticiales, membranas basales, piel, músculos) rompiendo las tres cadenas de la hélice del colágeno en un punto específico, usualmente en el enlace glicerina-leucina o glicina-isoleucina.³¹ Además, esta enzima no requiere de agitación mecánica para actuar lo cual no daña a las células y trabaja a un pH y temperatura fisiológica.³⁰

2.7.2.4. DNasa

Esta enzima es una proteína estable al calor, responsable de la degradación nuclear de las células musculares y que participa en procesos de rupturas no específicas de moléculas de DNA, disminuyendo así la viscosidad presente en el DNA polianiónico.³

2.8. Identificación microscópica de espermatogonias

2.8.1. Espermatogonias de tipo A (SPGA)

Son las células germinales más grandes encontradas en el testículo. Tienen forma redonda u oval, con un citoplasma hialino. Se caracterizan por poseer un núcleo esférico central que contiene un único nucléolo. Frecuentemente se observa cromatina periférica, un retículo endoplasmático liso (REL) con numerosas cisternas circulares, también presentan abundantes mitocondrias.¹¹

2.8.2. Espermatogonia de tipo B (SPGB)

Están agrupadas en espermatoцитos, rodeados por procesos de células de Sertoli. Las SPGB se caracterizan por la forma redonda y un núcleo esférico prominente que contiene un nucléolo. Las SPGB son más pequeñas en tamaño que las SPGA, se pueden observar puentes citoplasmáticos entre las SPGB, aunque son difíciles de discernir, unas pocas mitocondrias, un aparato de Golgi y REL circular.¹¹

2.8.3. Espermatoцитos primarios (SPCI)

Son similares en tamaño y forma a las SPGB, de la última división mitótica. Ellos poseen un citoplasma hialino y un núcleo esférico y contiene un nucléolo. El citoplasma contiene escasas mitocondrias, más pequeñas en tamaño que aquellas de las SPGB, un REL y un aparato de Golgi.¹¹

2.8.4. Espermatoцитos secundarios (SPCII)

Se encuentran raramente en una sección del testículo ya que este estadio tiene una duración corta. Su disminución en el tamaño es evidente cuando se los compara con estadios previos. El núcleo esférico está rodeado por un citoplasma pobremente distinguible.¹¹

2.9. Viabilidad celular

La viabilidad es definida como la capacidad de demostrar que la célula posee una membrana funcional o íntegra, con actividad metabólica activa.³² Existen diferentes métodos para evaluar la viabilidad celular, desde pruebas sencillas, en las que se usa colorantes hasta las más complejas, los ensayos funcionales, los ensayos de viabilidad a través de biosensores de fluorescencia, los estudios de morfología celular, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X y la técnica de determinación de la expresión técnica de microarrays.³³

2.9.1. Métodos de evaluación de la integridad de la membrana

Este método supone que una célula viable tendrá su membrana intacta, sin embargo, una célula apoptótica tendrá una membrana alterada, por lo que permitirá el paso de moléculas que en condiciones normales no se difundirían o bien no permite el paso de moléculas que en condiciones normales atravesaría la membrana celular.³³

2.9.1.1. Métodos basados en la utilización de colorantes orgánicos o sustancias con propiedades fluorescencia

Se divide en ensayos de exclusión y de inclusión. Entre los ensayos de exclusión, se tienen a los colorantes orgánicos como el Azul de Tripán, Eosina, Rojo Congo y Eritrosina, así como el ioduro de Propidio o el Bromuro de Etidio. Los ensayos

de inclusión comprenden colorantes con propiedades fluorescentes siendo los más utilizados el Diacetato de Fluoresceína o la Calceína, que atraviesan la membrana plasmática, se hidrolizan por las esterasas y dan lugar a la fluorescencia dentro de la célula, siempre que se encuentra en un estado funcional.³³

Viabilidad con Azul de Tripán

El Azul de Tripán es uno de los colorantes orgánicos más utilizados y relativamente más sencillos, es un método de viabilidad de células por exclusión de captación ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membrana íntegra, es imprescindible para diferenciar entre las células muertas (con disrupción membranal) de las vivas con membrana íntegra,²⁰ es decir aquellas células que no presenten coloración son células vivas, debido a que las células son muy selectivas a los compuestos que dejan pasar a través de su membrana, presentan la característica de semipermeabilidad, por lo contrario las células muertas se tiñen de un color azul claro al microscopio de luz.³⁴

Una de las ventajas del método es que en la coloración se cuantifica el número de células viables y se descarta a las células muertas o dañadas.³⁴

2.10. Rendimiento celular

Es un parámetro importante que permite determinar la efectividad del aislamiento de células. Se hace utilizando una Cámara Hemocitométrica de Neubauer. Es un portaobjetos especializado, permite conocer el volumen de cualquier líquido colocado sobre él y por debajo de su cubreobjetos. La retícula se encuentra compuesta por 9 cuadros de 1 mm² cada uno, los cuatro cuadrados de 1 mm² localizados en cada esquina poseen a su vez 16 cuadrados de 0,0625 mm², el cuadro central (también 1mm², se encuentra compuesto por 25 cuadrados de 0.04 mm²). Estos cuadrados a su vez se encuentran compuestos por cuadrados menores 0.0025 mm². Dada la profundidad de la Cámara de tan solo 0,1 mm, cada una de estas unidades corresponden a volúmenes fijos conocidos.³⁴

Está determinada por el número de células por mililitro de solución ($\times 10^n/\text{ml}$)

2.11. *Vicugna pacos*

Tradicionalmente la alpaca (*Lama pacos*, Linneaus, 1758) la llama (*Lama glama*, Linneaus, 1758) y el guanaco (*Lama guanicoe*, Müller, 1776) han sido especies clasificadas como cercanas al género *Lama*, mientras que la vicuña (*Vicugna vicugna*, Molina, 1782) fue encuadrada en un género separado *Vicugna*. Estudios más recientes usando DNA mitocondrial rectifican la taxonomía de los Camélidos

Sudamericanos a dos géneros donde Lama y Vicugna, cada uno con un animal silvestre y un domestico siendo la vicuña y el guanaco antecesores de la alpaca y la llama respectivamente, por lo que se ha propuesto una nueva clasificación taxonómica para la alpaca de *Vicugna pacos*.³⁵

Taxonomía³⁵

Reino: Animalia

Phylum: Cordata

Clase: Mamalia

Orden: Artiodactyla

Familia: Camelidae

Género: Vicugna

Especie: pacos

2.11.1. Determinación de la edad

Para la selección de alpacas se debe conocer el desarrollo dentario para aproximar la edad y mejor aún si se manejan registros que darán la información de la edad con más exactitud.³⁶

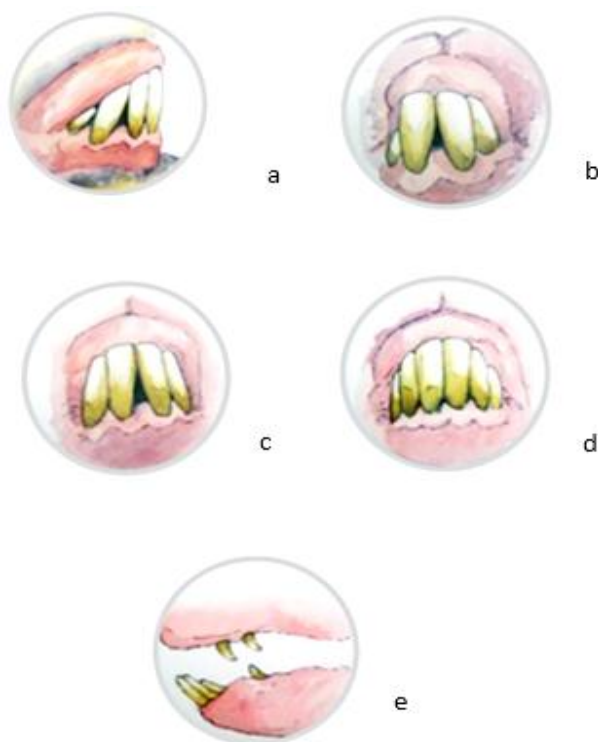


Figura 8. Estimación de la edad de alpacas por erupción dentaria. a). dientes de leche, representa a una alpaca de 2 años de edad, b). 2 dientes los dientes centrales o pinzas, representan a una alpaca de 2 a 3 años de edad, c). 4 dientes, los primeros medios representan a una alpaca de 3½ a 4 años de edad, d) 6 dientes o boca llena, cuando ya aparecieron los dientes extremos, representan a una alpaca de 4 ½ a 5 años de edad, e). los colmillos, lo cual indica que es animal viejo con más de 5 años de edad.³⁶

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica y en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, desde setiembre de 2015 hasta enero 2016.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Población

La población considerada en el presente trabajo de investigación fueron testículos de *Vicugna pacos* “alpaca” *post mortem* del Matadero Municipal de Huancavelica, así como testículos de obtenidos por castración de alpacas de la comunidad de Ccarhuaccpampa (Ayacucho) y Pilpichaca (Huancavelica).

3.2.2. Muestra

Se consideró aleatoriamente testículos de alpacas entre las edades menores a 1 año, mayores a un 1 año, entres 3-4 años y mayores a 5 años de la región de Huancavelica y Ayacucho.

3.3. METODOLOGÍA Y RECOLECCIÓN DE DATOS

3.3.1. Obtención de testículos

El procedimiento para la recolección de datos fue en dos etapas, la primera etapa se obtuvo de testículos de alpacas adultas *post mortem* y de alpacas prepuberes y púberes obtenidas por la técnica de castración.

a) Obtención de testículos *post mortem*

Se obtuvieron del Matadero Municipal de Huancavelica de tres a cuatro años (cuatro dientes) y mayores a cinco años (seis dientes)

- Se rotularon los recipientes, en la zona de sangría, se esperó el sacrificio del animal, se verificó el número de dientes (cuatro, seis) se realizó el seguimiento hasta la zona trasquilado del cuero del animal.

- Las muestras de testículos fueron escindidas con tijeras quirúrgicas estériles y se colocó en solución salina fisiológica (0,9%) a temperatura ambiente, posteriormente se transportaron al Laboratorio de Reproducción Animal Universidad Nacional de Huancavelica.

b) Obtención de testículos por castración

- Se obtuvieron de alpacas menores de un año, mayores de un año (dientes de leche). Se realizó la captura de los animales separando del rebaño aquellas alpacas menores de un año y mayores de un año; se preguntó personalmente a los dueños, estos datos fueron corroborados por la erupción dentaria y el desgaste.
- Se castró a los individuos seleccionados con ayuda de hoja de bisturí estériles y se colocó en recipientes con solución salina (0,9%) a temperatura ambiente, posteriormente *se trasladó al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, para el respectivo proceso de aislamiento de SSC.*

3.3.2. Aislamiento de espermatogonias

- Se realizó la descapsulación (un aproximado de 15 pares, dependiendo el tamaño) de los testículos *Vicugna pacos*, posteriormente se lavaron en Solución Salina Fisiológica.
- Se cortó, con la ayuda de una tijera quirúrgica, en pequeños trozos, hasta obtener una masa pastosa de tejido testicular. Se pesó 20 g de tejido testicular en placas de Petri estériles (90 x 10 mm) en balanza analítica marca Adama AAA 250 I (USA).
- Se colocó en un colador fino y se trituró con un pilón, añadiendo pequeños volúmenes de DMEM suplementado (con antibióticos) a 32°C, hasta que se obtuvo 20 ml de filtrado denso, el cual se recibió en un frasco colector estéril.
- Se distribuyó el filtro en tubos cónicos estériles de 10 ml con tapa rosca, se centrifugó a 192 x g (600 rpm) por 3 min, tres veces, se resuspendió en cada centrifugado.
- Para que se dé inicio a la primera digestión enzimática, se agregó al *pellet* de tejido testicular, cada tubo, un volumen de DMEM suplementado a 32°C, contenido las cuatro enzimas (1 mg colágenasa, 1 mg tripsina 1 mg hialuronidasa II y 5 µg/ml DNasa I) a una proporción de 1:2 (*pellet*: medio)
- Se llevó a incubación a 32°C por 60 min en agitación continua, en el rotador de tubos marca Bio-Rs24 (1 revolución/min).

- Después se sometió a lavados por centrifugación $192 \times g$ (600 rpm) por 3 min, tres veces con DMEM suplementado a 32°C, hasta que el sobrenadante quedó transparente. Luego se eliminó el sobrenadante.
- Para la segunda digestión enzimática, se añadió a cada tubo, un volumen de DMEM suplementado a 32°C, contenido sólo tres enzimas (1 mg hialuronidasa II, 1 mg colagenasa y 5 µg/ml DNasa I), a una proporción de 1:2 (pellet: medio)
- Se incubó a 32°C por un tiempo de 45 min, con agitación moderadamente permanente en el rotador de tubos marca Bio-Rs24 (1 revolución/min).
- Después se sometió a lavados por centrifugación $192 \times g$ (600 rpm) por 3 min, tres veces con DMEM suplementado a 32°C, hasta que el sobrenadante quedo transparente. Luego se eliminó el sobrenadante.
- Luego de la incubación se resuspendió las espermatogonias obtenidas en PBS (2 ml).

3.3.3. Determinación de la viabilidad de espermatogonias

- Después del aislamiento de SSC se obtuvo el paquete celular, al cual se le evaluó la viabilidad.
- Para el conteo de la SSC se preparó una dilución sucesiva de suspensión celular y PBS. Se tomó, con una micropipeta, 900 µl de PBS a la cual se colocó en un tubo eppendorf 1,5 ml, se agregó 100 µl de suspensión celular. En la segunda dilución se tomó 100 µl de suspensión celular ya diluida anteriormente, al cual se agregó 900 µl de PBS.
- En otro eppendorf de 1,5 ml, se agregó 10 µl de Azul de Tripán. Se homogenizó, con una micropipeta, 10 µl de la suspensión celular y a partir del él se tomó 10 µl-15 µl, se mezcló con un volumen equivalente al Azul de Tripán al 0,05% durante 2 a 3 min a temperatura ambiente, seguidamente se tomó una muestra de 10 µl de la mezcla y se colocó en la cámara de Neubauer.
- Luego se colocó el cubre objetos a lo largo con la punta de la micropipeta dispuesta en el canal, 10 µl de la mezcla de células madre espermatogoniales y Azul de Tripán 0,05%, se dejó que por capilaridad se diseminara por debajo del cubreobjetos en la Cámara hasta que el área de la cuadrícula se llenara, evitando que se derrame o que entrara burbujas en el área de conteo. Inmediatamente se observó al microscopio, la Cámara de Neubauer se colocó sobre la platina del microscopio óptico (Olympus), dejándola unos minutos en reposo para que se sedimenten las células, sin dejar secar. Se observó y contó con el objetivo 40X en los cuatro cuadrantes centrales de la Cámara (25 x 25).

3.3.4. Determinación del rendimiento de espermatogonias

Para determinar el rendimiento de células espermatogoniales aisladas, se hizo el conteo en la Cámara de Neubauer, obteniéndose así la concentración de células espermatogoniales. Para ello se realizó el protocolo de diluciones sucesivas del paquete celular obtenido.

El número total de células que se obtuvo se determinó mediante la fórmula:

$$N^{\circ} \text{ cel/ml} = (N/n) \text{ FD} \times 10^4$$

N : número total de células

n : total de cuadrantes

FD : factor de dilución (2)

10^4 : cálculo en ml, dado que el volumen de la muestra es de 0,1 μl

- El cálculo del rendimiento de espermatogonias se reportó mediante el número de cel/ml.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A las variables viabilidad (%), rendimiento ($\times 10^6$ cel/ml), mortalidad (%) se aplicó estadística descriptiva previo análisis de la normalidad para aplicar la prueba paramétrica y el Análisis de Varianza, que permitió calcular los resultados de las variables cuantitativas (obtenidos de la digestión enzimática de las muestras testiculares de aislamiento y rendimiento celular), que se expresaron con la media y desviación estándar, con un nivel de significancia *a priori* que $p\text{-valor} < 0,05$. Para el análisis estadístico se usó del paquete estadístico MINITAB, Versión 17.1. Así como la aplicación de la comparación múltiple de Fisher para determinar los factores de variabilidad entre viabilidad, rendimiento celular y las edades

IV. RESULTADOS

Se realizó un total de 40 digestiones enzimáticas a partir de 20 g de tejido testicular previamente triturado, obtenido a partir de testículos descapsulados, a razón de 10 repeticiones por cada grupo etario de alpacas macho: menores a 1 año, mayores a 1 año, 3-4 años y mayores a 5 años.

Los botones celulares o *pellets* obtenidos después de la segunda digestión enzimática se observaron como una masa rojiza, densa, de aproximadamente de 5 a 7 mm de altura desde el fondo del tubo cónico de 10 ml, que permitió observar la obtención de células espermatozonias.

Para determinar la viabilidad de células espermatozonias se realizó el conteo de células vivas y muertas con el método de integración de la membrana celular (tinción con Azul de Tripán) del mismo modo para determinar el rendimiento de células espermatozonias se consideró el recuento del total de células en los cuadrantes multiplicado por el factor de dilución.

Los promedios de células espermatozonias aisladas, por campo microscópico y por grupo etario, fueron los siguientes: 27 espermatozonias/campo en el grupo de alpacas macho menores a 1 año de edad, 49 espermatozonias/campo en el grupo de alpacas macho mayores de 1 año de edad, 31 espermatozonias/campo en el grupo de alpacas macho de 3-4 años de edad y 33 espermatozonias/campo en el grupo de alpacas macho mayores de 5 años de edad.

Los resultados obtenidos de viabilidad de las células espermatozonias aisladas por digestión enzimática fueron: 87,59% de viabilidad en alpacas menores a 1 año, de edad, 89,41% viabilidad en alpacas mayores a 1 año, 76.34% de viabilidad en alpacas de 3-4 años de edad y 79.24% de viabilidad en alpacas mayores a 5 años de edad.

El promedio de rendimiento de células espermatozonias fue: $1,09 \times 10^6$ cel/ml en alpacas menores de un año, $1,94 \times 10^6$ cel/ml en alpaca mayores de 1 año, $1,24 \times 10^6$ cel/ml en alpacas de 3-4 años de edad y $1,31 \times 10^6$ cel/ml en alpacas mayores a 5 años de edad.

Los resultados obtenidos de mortalidad de las células espermatozonias aisladas por digestión enzimática fueron: 12,41% en alpacas menores de un año, 10,59% en alpacas mayores de un año fue de 10,59%, 23,66% en aplacas de 3-4 años y 20.76% en alpacas mayores de 5 años de edad.

Los resultados obtenidos se pueden observar en los tablas y figuras que a continuación se presentan.

Tabla 2. Promedio de células espermatogoniales por campo microscópico aisladas de testículo de *Vicugna pacos* “alpaca” a diferentes edades, Ayacucho 2015-2016

Edad	N	Promedio	DE	IC (95%)
Menor a 1 año	10	27	11.21	20,13-34,50
Mayor a 1 año	10	49	13.98	41,49- 55,8
Entre 3-4 años	10	31	10.57	23,85-38,21
Mayor a 5 años	10	33	8.27	25,63- 40,00

Los valores están expresados según la media. El valor “P- value” es $P = 0,001$ menor a $(0,05)$, indica que existe diferencia estadísticamente significativa. DE = Desviación Estándar; IC = Intervalo de Confianza.

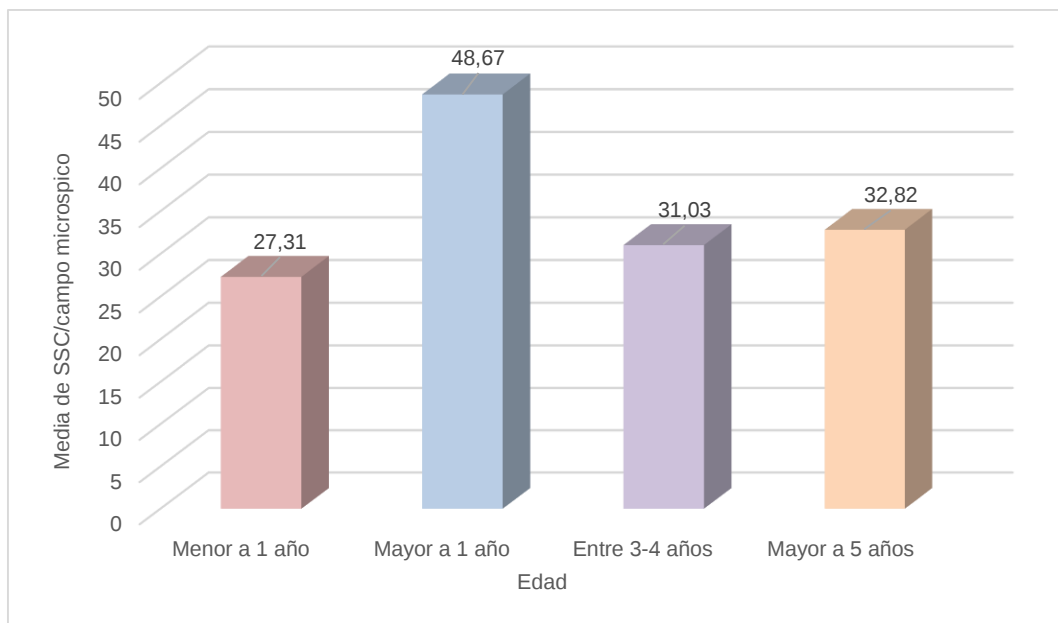


Figura 9. Promedio de células espermatogoniales/campo microscópico aisladas de testículos de *Vicugna pacos* “alpaca” a diferentes edades, Ayacucho 2015-2016.

Tabla 3. Promedio de viabilidad (%) de células espermatozonales aisladas de testículos de *Vicugna pacos* “alpaca” a diferentes edades, Ayacucho 2015-2016

Edad	N	Promedio (%)	DE	IC (95%)
Menor a 1 año	10	87,59	9,28	82,45-92,73
Mayor a 1 año	10	89,41	7,43	84,27- 94,55
Entre 3-4 años	10	76,34	9,70	71,20- 81,48
Mayor a 5 años	10	79,24	4,63	74,11- 84,38

Los valores están expresados según la media. El valor “P- value” es $P = 0,002$ menor a $(0,05)$, indica que existe diferencia estadísticamente significativa. DE = Desviación Estándar; IC = Intervalo de Confianza.

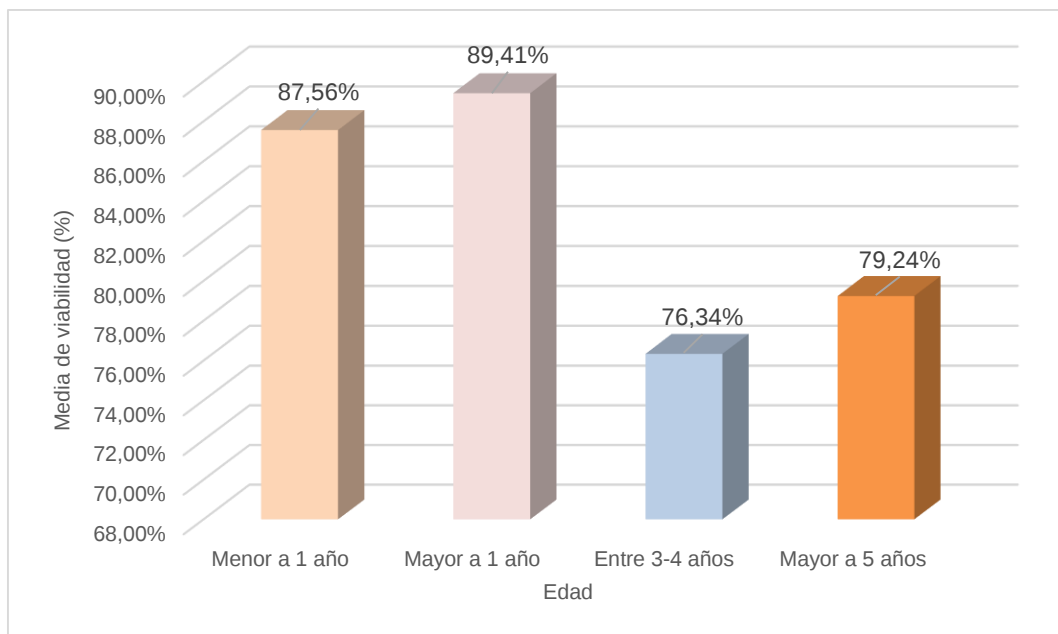


Figura 10. Promedio de viabilidad (%) de células espermatogoniales aisladas de testículos de *Vicugna pacos* "alpaca" a diferentes edades, Ayacucho 2015-2016

Tabla 4. Promedio del rendimiento ($\times 10^6$ cel/ml) de células espermatogoniales aisladas de testículos de *Vicugna pacos* “alpaca” a diferentes edades, Ayacucho 2015-2016

Edad	N	Promedio($\times 10^6$ cel/ml)	DE	IC (95%)
Menor 1 año	10	1,09	0,45	0.805, 1.380
Mayor 1 año	10	1,94	0,56	1.660, 2.234
Entre 3-4 años	10	1,24	0,42	0.954, 1.529
Mayor 5 años	10	1,31	0,33	1.025, 1.600

Los valores están expresados según la media, con GL = 3. El valor “P- value” es $P = 0,001$ es mayor a ($p < 0,05$), indica que existe diferencia estadísticamente significativa. DE = Desviación Estándar; IC = Intervalo de Confianza.

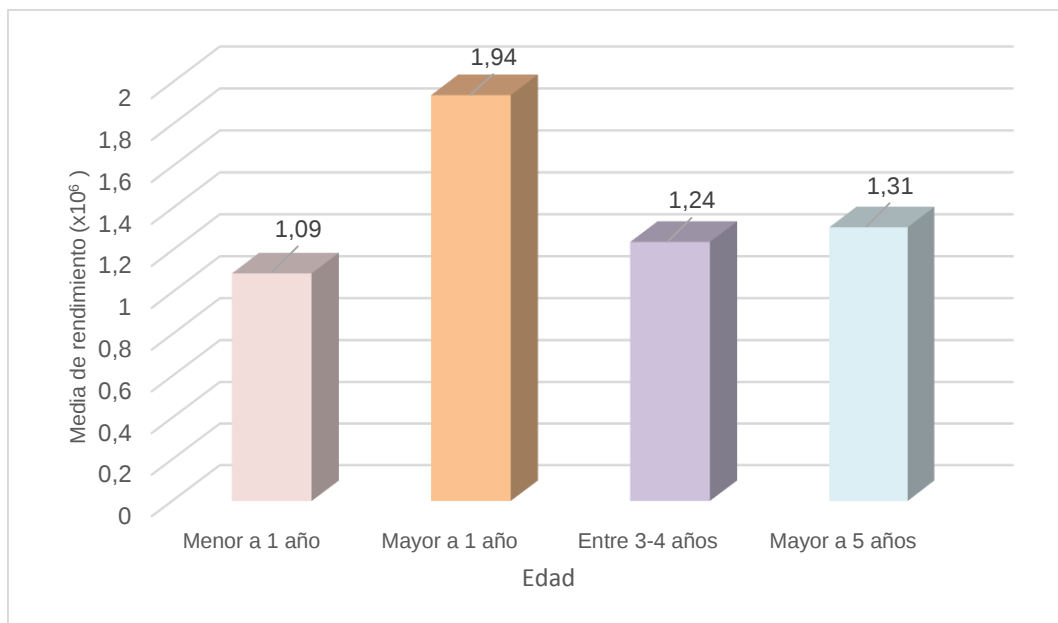


Figura 11. Promedio del Rendimiento (x10⁶ cel/ml) de células espermatogoniales aisladas de testículos de *Vicugna pacos* "alpaca" a diferentes edades, Ayacucho 2015-2016.

Tabla 5. Promedio de mortalidad (%) de células espermatogoniales aisladas de testículos de *Vicugna pacos* “alpaca” a diferentes edades, Ayacucho 2015-2016

Edad	N	Promedio (%)	DE	IC(95%)
Menor 1 año	10	12,41	9,28	7,27-17,55
Mayor 1 año	10	10,59	7,43	5,45-15,73
Entre 3-4 años	10	23,66	9,70	18,52-28,80
Mayor 5 años	10	20,76	4,63	15,62-25,89

Los valores están expresados según la media, con GL = 3. El valor “P- value” es $P = 0,002$ es menor a ($p < 0,05$), indica que existe diferencia estadísticamente significativa. DE = Desviación Estándar; IC = Intervalo de Confianza.

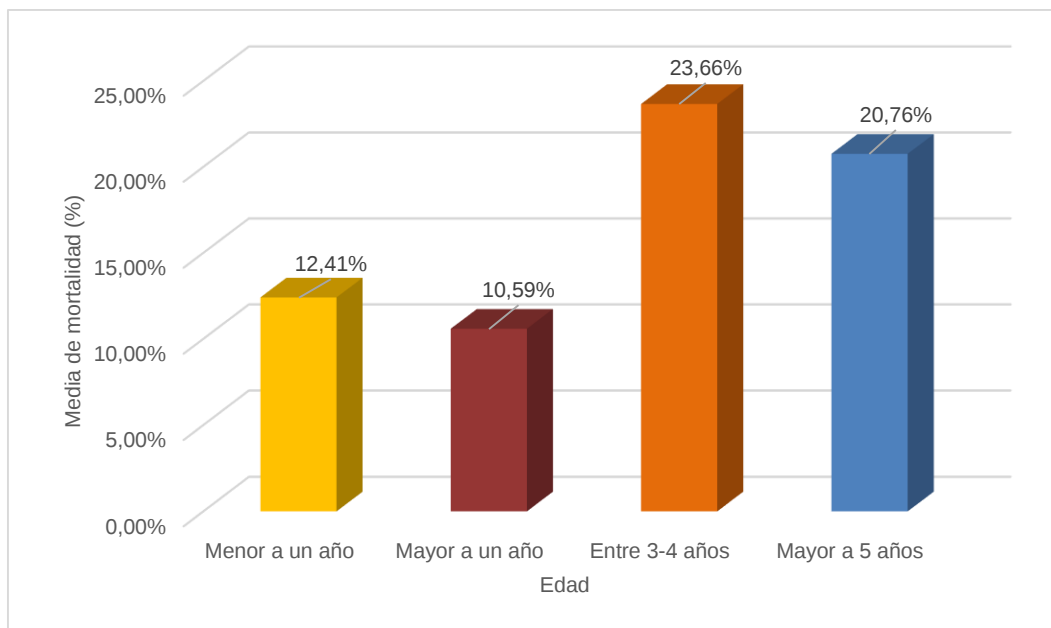


Figura 12. Promedio de mortalidad (%) de células espermatogoniales aisladas de *Vicugna pacos* "alpaca" a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.

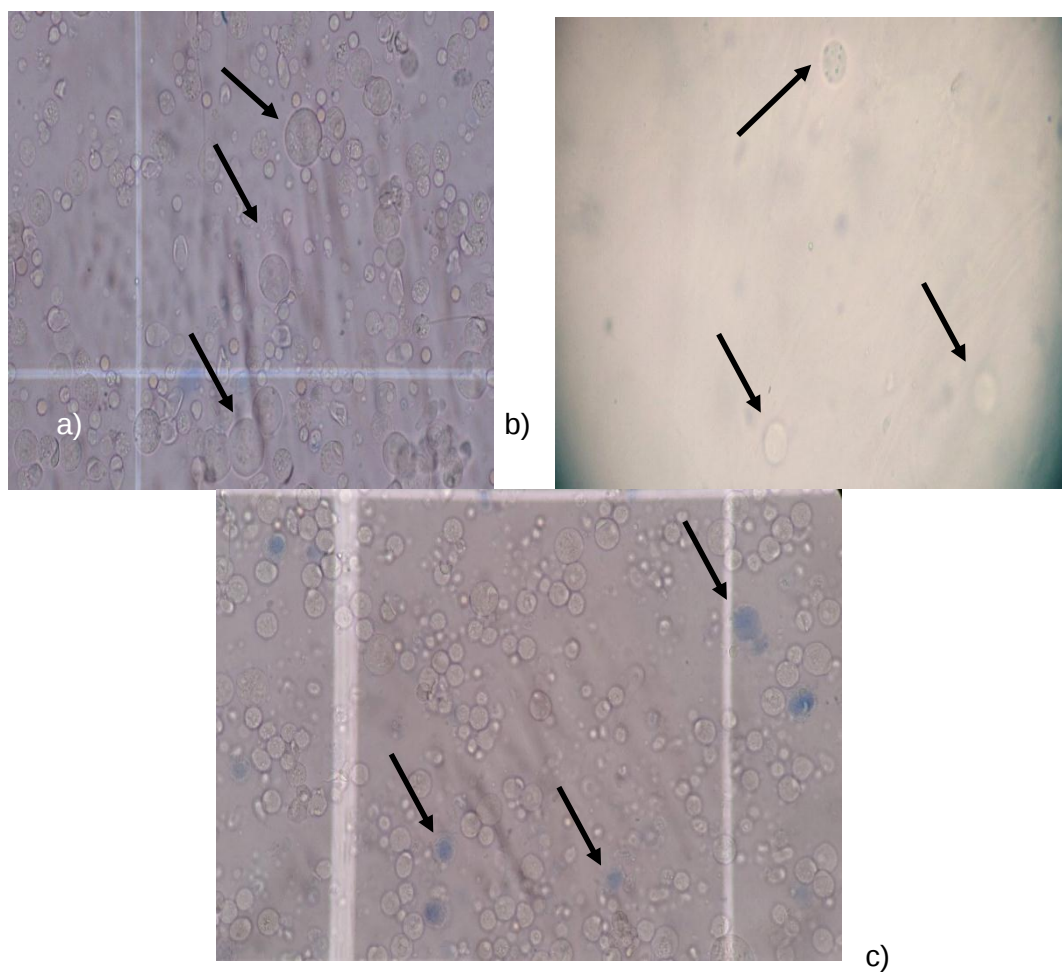


Figura 13. a). Células espermatogoniales aisladas, b). células viables, c). células espermatogoniales no viables aisladas de testículos de *Vicugna pacos* “alpaca”, observadas al microscopio óptico (400X), Ayacucho 2015-2016.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se aislaron células espermatozoniales mediante la técnica de digestión enzimática donde se determinó la viabilidad y rendimiento celular a partir de testículos de *Vicugna pacos* “alpaca”, provenientes de cuatro grupos etarios: menores a 1 año, mayores a 1 año (obtenidos por castración de machos pertenecientes a estancias alpaqueras de Ccarhuaccpampa-Ayacucho y Pilpichaca-Huancavelica); machos de 3-4 años y machos mayores de 5 años (obtenidos del Matadero Municipal de Huancavelica).

En la Tabla 2 y Figura 9, se indica el promedio del aislamiento de células espermatozoniales por campo microscópico, obtenidas por digestión enzimática, que fueron: 27 espermatozonias/campo en el grupo de alpacas macho menores a 1 año de edad; 49 espermatozonias/campo en el grupo de alpacas macho mayores de 1 año de edad; 31 espermatozonias/campo en el grupo de alpacas macho de 3-4 años de edad y 33 espermatozonias/campo en el grupo de alpacas macho mayores de 5 años de edad. La prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher, indica que existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre la cantidad de células espermatozoniales y las edades de las alpacas macho. Estos resultados proporcionan una idea preliminar respecto a la cantidad de células aisladas en cada uno de los grupos etarios, siendo mejor en el grupo de alpacas macho mayores a 1 año de edad, con 49 espermatozonias/campo, lo que, en términos prácticos, permite inferir que los machos con edad mayor a un año, son los más indicados para el aislamiento de espermatozonias.

Adicionalmente, estos resultados confirman la eficiencia del método empleado para el aislamiento de espermatozonias por digestión enzimática, utilizando cuatro enzimas: tripsina, hialuronidasa, colagenasa y DNasa. Así, en la primera digestión enzimática se promueve un buen resultado, ya que la tripsina es responsable del desprendimiento de las células del epitelio germinal, rompiendo las conexiones proteicas entre las células del epitelio germinal sin alterar la membrana basal ni la

matriz extracelular; luego la hialuronidasa cataliza la ruptura de los enlaces glicosídicos internos, modificando la permeabilidad de los tejidos conectivos animales mediante la hidrolisis del ácido hialurónico; mientras que la collagenasa, de otra parte, actúa a nivel del colágeno desintegrando o rompiendo los enlaces peptídicos del colágeno en su conformación de triple hélice liberando fragmentos cortos la células del epitelio testicular eliminando las células intersticiales y restos de microfibrillas de estas células; y finalmente la DNasa elimina el DNA procedente de las células rotas, lo que disminuye la viscosidad del aislado. En la segunda digestión enzimática, al utilizarse solo hialuronidasa, collagenasa y DNasa, se logra obtener las células germinales en suspensión ^{27,28,29,30,31}.

Al respecto, se ha observado que en alpacas púberes las espermatogonias se desarrollan por cohortes y los túbulos seminíferos presentan un desarrollo normal con el epitelio germinativo y la presencia de todos los tipos celulares; sin embargo, en edades más tempranas se han detectado burbujas y espacios vacíos y a mayores edades, es decir, en adultos, se pueden presentar ciclos del túbulo seminífero,³⁷ lo que ha sido confirmado en un trabajo netamente histológico,³⁸ indicándose la escasa presencia de células de la línea germinal en los túbulos seminíferos, en los cuales las células de Sertoli mantienen el ciclo espermático.³⁷ En la Tabla 3. y en la Figura 10. se muestran los valores de viabilidad de las células espermatogoniales aisladas por digestión enzimática. Así, el porcentaje promedio de viabilidad en alpacas menores de 1 año de edad fue de 87,59%; en alpacas mayores de 1 año de edad la viabilidad celular fue de 89,59%; en alpacas de 3-4 años de edad la viabilidad celular fue 76,34%; y en alpacas mayores a 5 años de edad 79,24%. Mediante la Prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher, se estableció que existe una diferencia significativa ($p>0,05$) entre la viabilidad de las células espermatogoniales y las edades de las alpacas macho. Sin embargo, se debe tener presente que al utilizar el método enzimático para el aislamiento de espermatogonias, las células son expuestas a diferentes tipos de estrés: tanto mecánico como bioquímico, sobre todo por la agitación y la centrifugación y porque al abandonar las células su "nicho" natural, estas tratan de sobrevivir en las nuevas condiciones nutricionales correspondientes a los componentes del medio DMEM, nuevas condiciones de pH, de presión osmótica e incluso la presencia y actividad de las diferentes enzimas que se utilizan durante la digestión, los que podrían ocasionar algún tipo de daño celular que afecte su viabilidad. La viabilidad es un parámetro biológico que determina el estado de la

célula y posibilita las condiciones específicas a nivel fisiológico, morfológico, bioquímico y genético,⁴⁰ de ahí la importancia de su determinación, sobre todo si estas células viables han de servir para otros experimentos relacionados con su cultivo en incubadoras de CO₂ para estudiar, entre otros aspectos, la identificación de biomarcadores específicos de SSC. Se observa nuevamente que el porcentaje de viabilidad es mejor en el grupo de alpacas macho mayores a 1 año de edad, con 89,59%.

Al evaluarse el efecto de la concentración de tripsina, tiempo de reacción y velocidad de agitación sobre el porcentaje de viabilidad,²⁶ a concentraciones de 0,05; 0,125 y 0,25%, por tiempos de digestión de 10, 30 y 40 min de digestión y agitación a 100 y 600 rpm, se encontró que a una concentración de $6,3 \times 10^6$ de células placentarias por g de tejido, la viabilidad fue inversamente proporcional a la concentración de tripsina, al tiempo transcurrido entre la extracción el procesamiento del tejido testicular y tiempo de incubación del tejido testicular y a la velocidad de agitación; es decir, que la viabilidad fue menor cuando los tres parámetros fueron mayores o más prolongado. Sobre la base de estos resultados, es de suponerse que estos factores influenciaron en el porcentaje promedio de viabilidad de las células espermatozonales aisladas por digestión enzimática en el presente trabajo.

Así también los resultados de viabilidad se ven influenciados por la técnica usada en la obtención de los testículos de alpaca, ya que en alpacas pre púberes (menores a un año y mayores a un año) la viabilidad es mayor con respecto aquellas alpacas jóvenes y adultas esto debido al estrés generado antes (traslado al matadero) durante y *post mortem*, así como la propia castración que probablemente origina un estrés, así como daño mecánico, pero menor en comparación a lo descrito.

Fisiológicamente explica que la concentración de hormonas sexuales es menor en alpacas pre púberes y púberes, menores a 1 año y mayores a 1 año, respectivamente por ende la población de células espermatozonales es mayor debido a que no hay una diferenciación celular continua, mientras en alpacas adultas se da el incremento de hormonas sexuales dando inicio a la diferenciación activa de células espermatozonales generando inicialmente una disminución poblacional de estas células, que posteriormente se regulan.²⁴

Los resultados de viabilidad obtenidos en el presente trabajo, fueron inferiores en comparación a los obtenidos en el aislamiento de espermatozonias de *Canis*

familiaris "perro"⁴, donde se utilizaron otros procedimientos complementarios para obtener poblaciones puras de espermatogonias, determinándose la viabilidad con Azul de Tripán de las células recuperadas en 45-60% y 30-45% de Percoll y fosfatasa alcalina, respondiendo positivamente en ambos casos con un promedio de 93% de viabilidad.

Otra investigación desarrollada para obtener poblaciones puras de espermatogonias de tipo A de toro ³ por digestión enzimática, luego de realizarse una filtración mediante gradiente de Percoll, la viabilidad de las células obtenidas de testículos de toros de 5 meses de edad fue mayor a 80%, disminuyendo esta viabilidad después de la incubación durante una noche.

En la Tabla 4. y Figura 11. se muestran los valores promedio del rendimiento de células espermatogoniales, siendo en alpacas menores de 1 año de $1,09 \times 10^6$ cel/ml; en alpacas mayores de 1 año $1,94 \times 10^6$ cel/ml; en alpacas de 3 a 4 años de $1,24 \times 10^6$ cel/ml y en alpacas mayores de 5 años de $1,31 \times 10^6$ cel/ml. La prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher, indica que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los cuatro grupos etarios. Se observa que el rendimiento de las células aisladas es mayor en alpacas mayores de 1 año de edad con $1,94 \times 10^6$ cel/ml. Estos valores indican que la edad de las alpacas macho más propicia para el aislamiento de células espermatogoniales es mayor a 1 año.

En el trabajo sobre aislamiento de células espermatogoniales de bovino ³ se hicieron digestiones enzimáticas de tejido testicular de toros de 3 a 7 meses de edad, obteniéndose como mejor resultado 1×10^6 cel/g de testículo en toros de 5 meses de edad. Estos resultados se pueden explicar de acuerdo a lo observado en la evaluación histoquímica, en toros de 3 meses de edad en los túbulos seminíferos se presenciaron gonocitos en la mitad del túbulo y en algunos casos en la membrana basal, mientras que en toros de 5 meses de edad se observó la presencia de gonocitos, células espermatogoniales de tipos A y otras células germinales; en toros de 6 meses de edad se observó el 60% de espermatocitos primarios y el 20% de espermátidas; y en toros de 7 meses el incremento del diámetro de los túbulos seminíferos y un visible lumen, así como una mayor diferenciación de las células espermatogoniales.

En la digestión enzimática de tejido testicular de ratones de 6-7 días de edad, se lograron aislamientos entre $3,5-5,5 \times 10^5$ células por testículo, entre células germinales y somáticas; mientras que con ratones de 16 días la población celular

obtenida aumentaba significativamente, aislándose entre $2,0-4,0 \times 10^6$ células por testículo ². Para incrementar la proporción de espermatogonias de tipo A del total de la suspensión celular, se realizó una separación inicial de células en función de su tamaño y peso utilizando un gradiente de Percoll. En los ratones de 6-7 días aparecían tres fracciones, la fracción intermedia correspondía a las espermatogonias tipo A. En el caso de los ratones de 16 días se formaban 9 fracciones, de las cuales las fracciones 4 y 5 del gradiente contenían un alto porcentaje de espermatogonias de tipo A. Como segundo paso en el proceso de purificación, las células se incubaron durante 2 h a 32°C en placas de cultivo. Este paso permitió eliminar aproximadamente un 10-20% correspondiente a células somáticas de tamaño semejante al de las espermatogonias y que habían quedado retenidas en el mismo gradiente de Percoll.

Al estudiarse en ratones el desarrollo de los túbulos seminíferos respecto a la edad,² a los seis días de edad se encontraron principalmente gonocitos y células de Sertoli, pero también espermatogonias de tipo A adheridas a la membrana basal en un 16%, pero a los 8 días de nacidos se observaron espermatogonias de tipo A y espermatogonias de tipo B, a los 10 días de nacidos se observaron células de menor tamaño y separadas de la membrana basal siendo espermatocitos primarios; y a los 16 días de edad se observaron los espermatocitos secundarios. Con estos resultados se evidencia que el porcentaje promedio de células espermatogoniales es mayor en aquellos animales que se encuentran en la etapa de pubertad, ya que es en esta edad donde el proceso de diferenciación celular aún no ha comenzado o en todo caso es muy incipiente.

Del mismo modo en la Tabla 5. y Figura 12. se presentan los valores promedio de mortalidad en los cuatro grupos etarios. Así, en alpacas menores de 1 año, el promedio de mortalidad fue de 12,41%; en alpacas mayores de 1 año, fue de 10,59%; en alpacas de 3-4 años, de 23,66%; y en alpacas mayores a 5 años de edad, del 20,76%. La prueba de Diferencia Significativa Mínima (DSM) de Fisher indica que existe diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los cuatro grupos etarios. Estos valores son complementarios al porcentaje de viabilidad, es decir, que si por ejemplo en el grupo de alpacas de 3-4 años de edad se tiene el máximo valor de mortalidad (Figura 12.), es porque se tiene el valor mínimo de viabilidad (Figura 10.).

Finalmente, las Figuras 13, se refieren a las características morfológicas de las células espermatogoniales de alpaca, que se pueden reconocer a través del

microscopio óptico a un aumento de 400X. En a) se observan células espermatogoniales "típicas" de alpaca: de forma redonda, citoplasma hialino, núcleo esférico central grande con un solo nucléolo. Igualmente se observa que una proporción de la población total de espermatogonias consiste en células más pequeñas, las cuales probablemente se encuentran comprometidas con la diferenciación. La diferencia de tamaño de las espermatogonias puede estar relacionado con la fase del ciclo celular.¹¹ En b). se observan células espermatogoniales transparentes lo que indica la integridad y funcionalidad de la membrana celular.²⁶ En c) se observan células coloreadas de azul, es decir, que han tomado el colorante Azul de Tripán, por encontrarse muertas o no viables, al perder la membrana celular su permeabilidad selectiva.³⁴

VI. CONCLUSIONES

- 1.- El aislamiento de células espermatogoniales de alpaca por el método de digestión enzimática reportado para otras especies de mamíferos como ratones, ratas, bovinos y macacos, resultó adecuado, dando valores satisfactorios.
- 2.- Los porcentajes de viabilidad (entre 75-90%) y rendimiento (entre $1-1.9 \times 10^6$ células por mililitro) durante el aislamiento de células espermatogoniales de alpaca fueron altos en los cuatro grupos etarios, por lo que no se encontró diferencia estadística significativa.
- 3.- Es difícil establecer la edad de la alpaca macho en la que las espermatogonias inician la diferenciación, es decir, la formación de espermatozoides maduros; sin embargo, al parecer esta capacidad se desarrolla pasando el primer año de edad y antes de los tres años de edad.

VII. RECOMENDACIONES

- 1.- Debido a que la histología testicular de la alpaca no ha sido descrita en detalle; sería muy importante corroborar los resultados del presente trabajo con estudios histológicos que permitan mostrar *in situ* la dinámica de la población de células germinales respecto a la edad de las alpacas.
- 2.- Realizar otros estudios orientados al cultivo de espermatogonias de alpaca, de tal manera que una vez optimizadas las condiciones, se pueda producir suficiente cantidad de biomasa como para poder extraer DNA total o RNA total y así puedan identificarse mediante técnicas moleculares biomarcadores específicos de células madre espermatogoniales de alpaca y con ellas proyectar la aplicación de nuevas herramientas biotecnológicas, como el trasplante de células madre espermatogoniales de machos élite a los machos mejor adaptados en las diferentes comunidades alpaqueras altoandinas, contribuyendo así con su mejoramiento genético.
- 3.- Ampliar estudios relacionados con la pureza y estabilidad genética de los dos fenotipos de alpacas: Huacaya y Suri, de manera que progresivamente se pueda ir recuperando la pureza genética de la alpaca.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

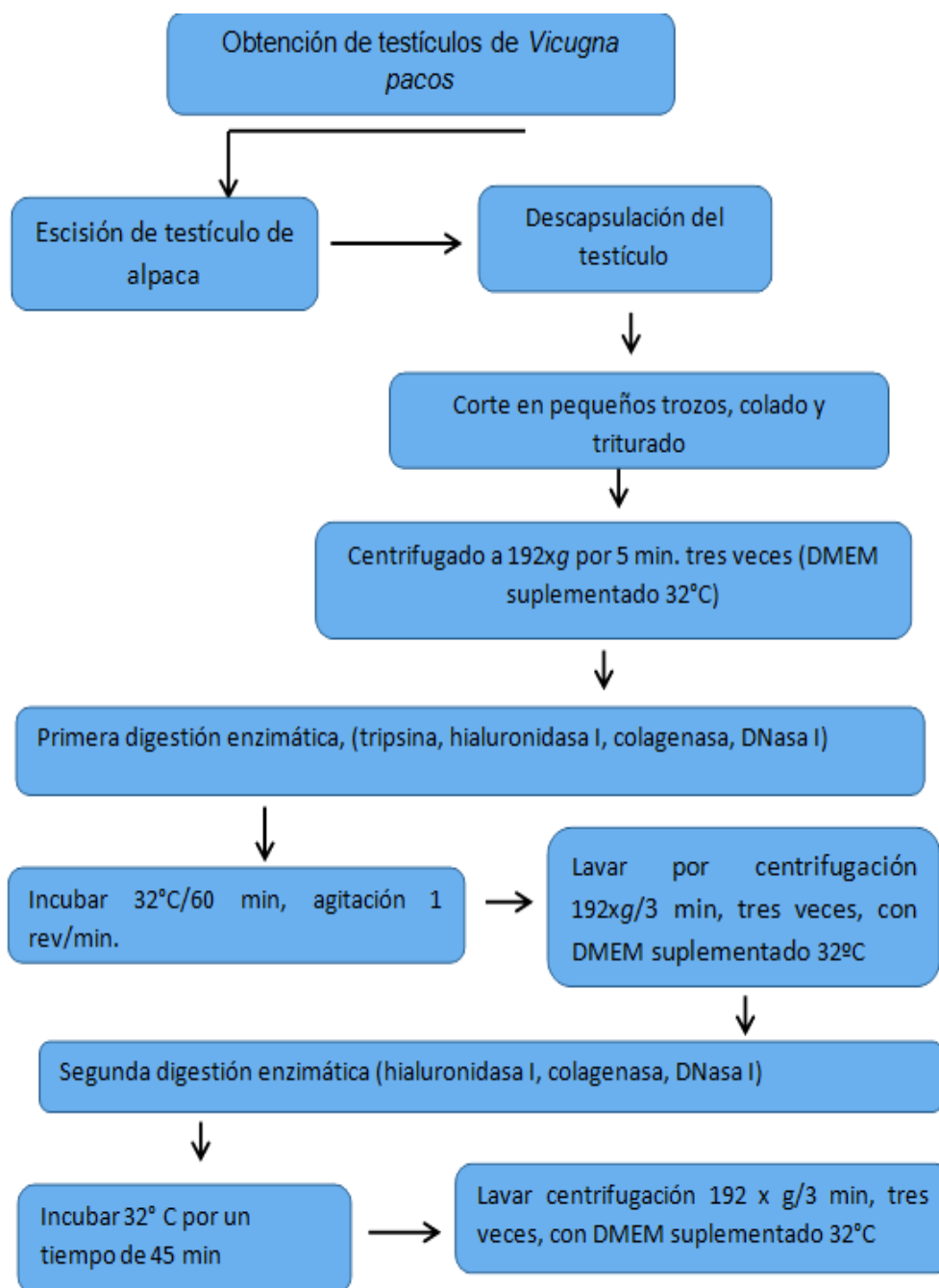
1. Morena A, Boitani C, Pesce M, De Felici M, Stefanini M. Isolation of Highly Purified Type A Spermatogonia From Prepubertal Rat Testis. Institute of Histology and General Embriology. University of Rome,1996;17: 706-717
2. Villuendas G, Gutiérrez A, Jiménez A, Roldan B. Transformación de espermatogonias de tipo A de ratón mediado por liposoma. Madrid. 2001; 16(2):9
3. Izadyar F, Spierenberg L, Creemer B, Ouden K, Rooij D. Isolation and purification of type A Spermatogonia from the bovine testis. Holanda. 2002; 124:85–94.
4. Gonzales H. Aislamiento y cultivo de células madre espermatogoniales de testículo de *Canis familiaris*. Tesis pre-grado. Universidad Ricardo Palma Lima; 2015.
5. Piñar A, Herrero N, Iniesta J, Liñan I, Reyes A. Células madre espermatogoniales en el contexto del nicho. 1-3.
6. De Rooij D. Proliferation and Differentiation of Spermatogonial Stem Cells. Departament of Cell Biology. University Medical Center Utrecht. Netherlands. 2001, 121-347-354.
7. Huaraca H. Anatomía y fisiología Humana II. Ayacucho 2009;(2) 336-337.
8. Matilla L. Localización de enzimas mitocondrial SOD2 en el testículo de ratón. Tesis de maestría. Universidad de Oviedo. España 2014.
9. Almagia A. y Lizana P. Anatomía del aparato reproductor. Universidad Católica de Valparaíso. Chile 2008 (2).
10. Imagen obtenida en el desarrollo del trabajo de investigación “Determinación de la viabilidad y rendimiento de células espermatogoniales en *Vicugna pacos*” Ayacucho 2017. Fuente propia
11. Riboldi M. Aislamiento, cultivo, caracterización y maduración de células indiferenciadas desde biopsias testiculares humanas. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, 2012.
12. Phillips B, Gassei K y Orwig K. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis USA 2010,365:1663-1678.
13. Kani YS. Identificación de factores de transcripción asociados a pluripotencia (oct-4, thy-1, plzf, sox-2, klf-4) de las células madre de espermatogonias en testículos de perros prepúberes. Tesis. Valdivia: Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias 2013.
14. Bellvé A, Cavichia J, Miellte C, O'Brien D, Bhatnagar Y, Dym M. Spermatogenic Cells of the Prepuberal Mouse. (revista en internet) 1977 (accesado el de abril de 2015). Disponible en: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/royptb/365/1546/1663.full.p>
15. Spradling A, Drummond-Barbosa D y Kai T: Stem cells find their niche. Nature, 2001,414:98-104.
16. Ogawa T, Ohmura M y Ohbo K: The niche for spermatogonial stem cells in the mammalian testis. Int.J. Hematol., 2005, 82: 381-388.
17. Griswold M. El rol central de la célula de Sertoli en la espermatogénesis. USA 1998 (9):411-416.
18. López L. Dos capas independientes de miofilamentos constituyen el aparato contráctil de las células mioides del testículo de rata. Tesis doctoral. Argentina: Universidad de Buenos Aires, 2014.
19. Sánchez B. Evolución testicular felina: estudio histológico, inmunoquímico y estructural. Tesis doctoral. Madrid. Universidad Computense de Madrid, 1994.

20. Moreno P. Interacciones entre las células madre pluripotentes del Carcinoma Embrionario y las Células Mioides Peritubulares del Testículo. Tesis doctoral. Leioa: Universidad del País vasco, 2015.
21. Esperanza B. Cultivo primario de células testiculares prepúberes humanas: Cambios madurativos de la regulación de la esteroidogénesis. Tesis doctoral. Argentina: Universidad de Buenos Aires, 1998.
22. Aguilar J, Gonzalvo M, Ortiz A, Gonzáles E, Ortiz J. células madre espermatogoniales. España, 2004.
23. Aponte P, Van Bragt M, de Rooij D, Van Pelt A. Spermatogonial stem cells: characteristics and experimental possibilities. Nueva Zelanda 2005; 113:727–42.
24. Hafez E. y Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. México, 2000 pp 235-236.
25. López B, Quijano J, Suárez P, Roa L, Stella N. Comparación de técnicas de digestión mecánica, enzimática y mecánico- enzimática en la extracción de poblaciones linfocitarias y macrófago en tejido con periodontitis crónica avanzada. Universidad odontológica. Colombia, 2007.
26. García de Insausti C. Aislamiento y Caracterización de Células Madre de la Membrana Amniótica. Una nueva Fuente Terapia Celular e Inmunomodulación. Tesis doctoral. Universidad de Murcia; 2012.
27. Lerma L.M. Evaluación Bioquímica y Biológica de una Hialuronidasa del veneno de la serpiente *Lachesis muta* Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2006.
28. Ercilla M. Informe de bioseguridad inmunológica de implantes: Ácido hialuronico. (Extraído de internet) (accesado 27 de abril de 2017). Disponible en:
<http://www.seme.org/docs/Informe-Bioseguridad-Inmunologica-Bioimplantes.pdf>.
29. Rodríguez A. Farmacología del condrihitin sulfato. Universidad de Arizona. USA, 2010.
30. Hernandez M. Proteinasa con actividad quimiotripsina y colagenasa en langostilla *Pleurocon desplanipes*. Universidad Autonoma de Baja California. México, 1993.
31. Carloni G. Batancor R y De Torres A. Detección de la Desoxirribonucleasa (DNasa) en cepas de *Clostridium chauvoei*. Argentina, 2005. 37: 87-88.
32. Vico M. Evaluación de la viabilidad y caracterización genética de células endoteliales transferenciadas a partir de células madre de la gelatina de Wharton Tesis doctoral. España: Universidad de Granada, 2009.
33. Facultad de Medicina Protocolos y métodos Conteo y Evaluación de la Viabilidad de Células Mononucleares Laboratorio de Genómica Viral y Humana, Universidad Autónoma de San Luis de Potosí, 2011.
34. Juárez B, Souza L, Euridez D, Franco da Silva L, Baungarten L, Busnardo C. Aislamiento, viabilidad y rendimiento de células mononucleares de médula ósea de conejo. Brasil, 2011; 45 (1):8-113.
35. Wheeler JC, Fernández M, Rosadio R, Hoces D, Kadwell M y Bruford MW. Diversidad Genética y manejo de poblaciones de vicuñas en el Perú. RIVEP veterinarias del Perú (Revista de Investigaciones) (accesado el 21 de enero de 2016). Disponible en:
<http://www.camelidosgecs.com.ar/pdf/taxonomia.pdf>
36. Quispe E, Poma A, Siguas O, Berain M, Purroy A. Estudio de la cascara de *Vicugna pacos* “alpaca” en relación al peso y clasificación cárnica. Lima 2012; 23 (1):5-1.

37. Valenzuela M, Rippes F, y Nuñez H. Estudio morfológico de testículo de híbrido de alpaca (*Lama pacos*) y llama (*Lama glama*) Chile 2012, 30(3) 1187-1196.
38. Núñez M, Genovese Cordero A, Picabea N, Cárdenas O, Huanca W y Bielli A. Desarrollo heterogéneo alternamente y altamente ordenado de los túbulos seminíferos de alpaca adulta (*Vicugna pacos*) resultados preliminares. *ALP* Cuzco- Perú, 2007.
39. Acosta L. Colonización intraluminar testicular de célula madre germinales a partir de células madre pluripotentes obtenidas de la masa celular interna de ratones Tesis. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2010.
40. Martínez M. técnica para detección de apoptosis y senescencia celular *in vitro* y su importancia en biología de la salud. Colombia 2009; 152-166.
41. Instituto Nacional de Estadística e Informática. IV Censo Nacional Agropecuario. Sistema de consulta de datos. 2012.

ANEXOS

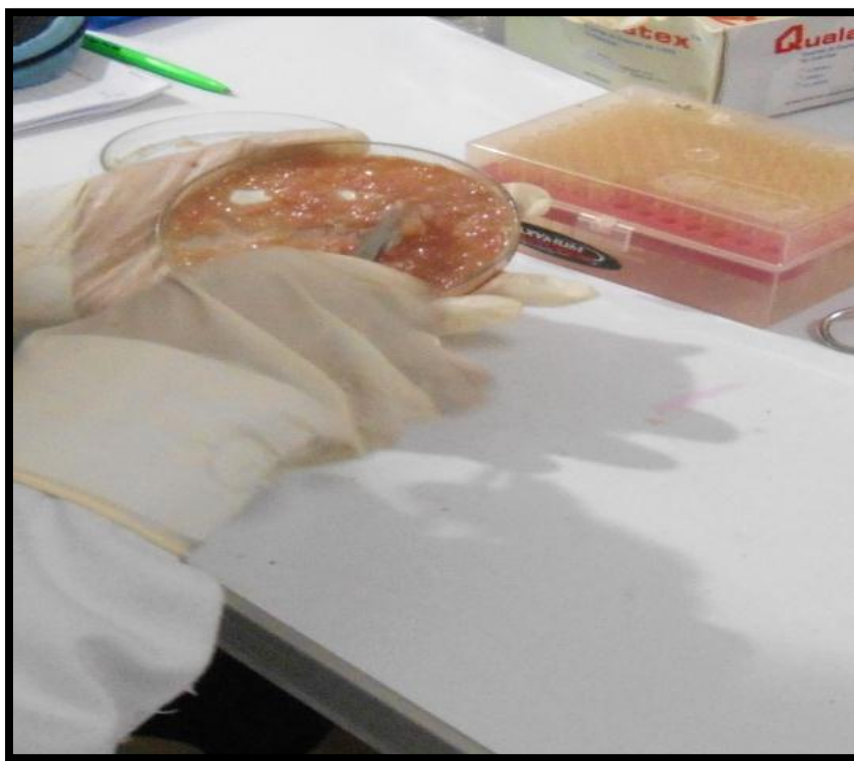
Anexo 1. Flujograma del aislamiento de células espermatogoniales de alpaca Ayacucho 2015-2016.



Anexo 2. Escisión de testículo de *Vicugna pacos* en el matadero Municipal de Huancavelica, 2015



Anexo 3. Cortado del tejido testicular *Vicugna pacos*, laboratorio de Reproducción Animal Universidad Nacional de Huancavelica, 2015.



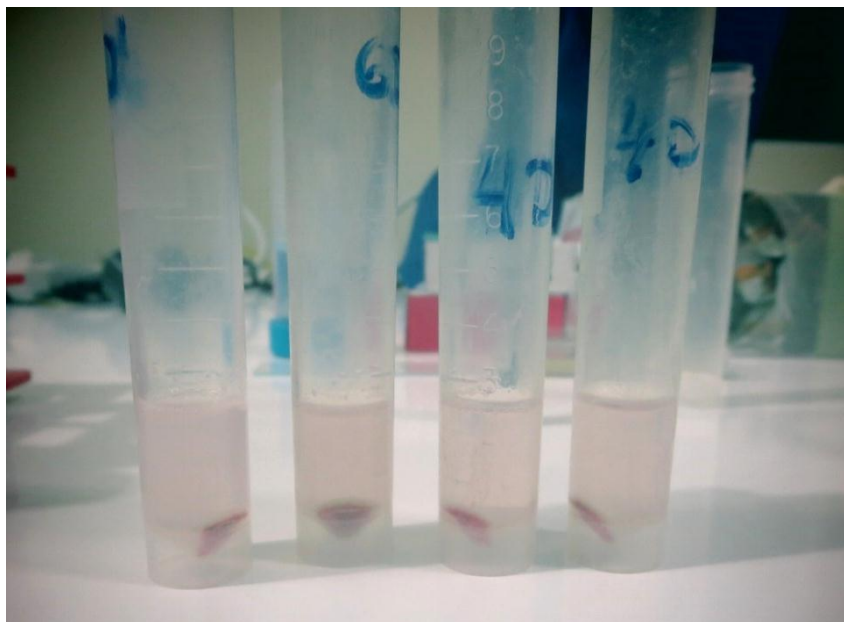
**Anexo 4. Triturado del tejido testicular, laboratorio de Reproducción Animal
Universidad Nacional de Huancavelica, 2015**



**Anexo 5. Incubación a 32°C con agitación moderada para la primera
digestión enzimática en cada tubo cónicos, contenido DMEM suplementado,
laboratorio de Reproducción Animal Huancavelica 2015.**



Anexo 6. Obtención del *pellet*, contenido DMEM suplementado, después de la segunda digestión enzimática, Laboratorio de Reproducción Animal Huancavelica, 2015.



Anexo 7. Castración de testículos de alpacas menores de un año, Pillpichaca-Huancavelica 2016



Anexo 8. Descapsulación del testículo de alpacas, laboratorio de Biotecnología UNSCH, 2016



Anexo 9. Medición del testículo de alpaca menores de un año, laboratorio de Biotecnología UNSCH, 2016.



Anexo 10. Pesado de los testículos de alpacas menores a un año, laboratorio de Biotecnología UNSCH, 2016.



Anexo 11 Corte del tejido testicular de alpaca menores de un año, laboratorio de Biotecnología UNSCH, 2016.



Anexo 12. Triturado con pilón y filtrado en el recipiente estéril laboratorio de Biotecnología UNSCH-Ayacucho 2016.



Anexo 13. Distribución del filtrado del tejido testicular en los tubos cónicos adicionado con DMEM suplementado, laboratorio de Biotecnología UNSCH-Ayacucho, 2016.



Anexo 14. Centrifugado del filtrado del tejido testicular en los tubos cónicos adicionado con DMEM suplementado, 32°C, laboratorio de Biotecnología UNSCH Ayacucho, 2016



Anexo 15. Determinacion de la viabilidad después del aislamiento de las SSCs a partir de testículos de Vicugna pacos Laboratorio de Biotecnología Ayacucho, 2016



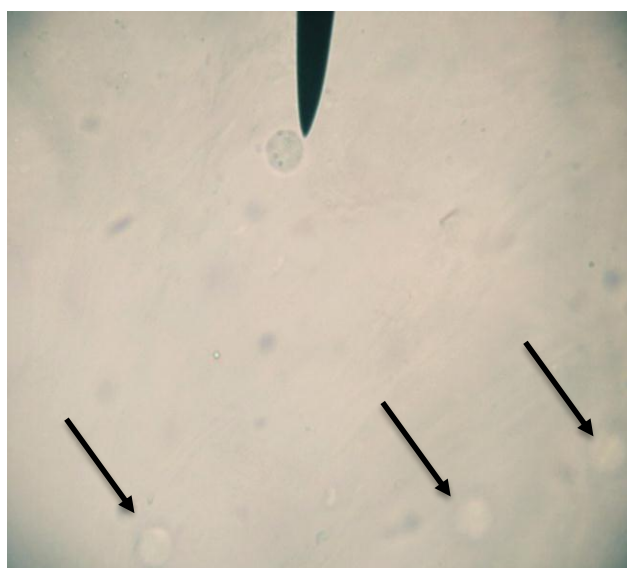
Anexo 16. Observacion al microcopio de las SSC después del aislamiento a partir de testículos de *Vicugna pacos* Laboratorio de Biotecnología UNSCH- Ayacucho, 2016



Anexo 17. Células espermatogoniales aisladas de testículo de alpaca a diferentes edades.



a). Células espermatogoniales, observadas en microscopía de luz a 400X



b). Células espermatogoniales, observadas en microscopía de luz a 400X

Anexo 18. Preparación de solución salina fisiológica 0,9%

NaCl	9 g
Agua destilada	1000 ml

Anexo 19. Preparación de alícuotas de NaCl 0,15 M (25 ml)

$$M = \frac{g_{sto}/PM_{sto}}{V_{sol} (L)}$$

$$g_{sto} (NaCl) = 0,15M \times 0,025L \times 58,44$$

$$G_{sto} NaCl = 0,22 \text{ g}$$

Diluir 0.22 g del soluto, enraizar en fiola de 25 ml, almacenar en refrigeración.

Anexo 20. Composición y preparación de PBS

1. Composición 1000 ml

Cloruro de sodio NaCl	8 g
Cloruro de potasio KCl	0,2 g
Fosfato disódico Na ₂ HPO ₄	1,44 g
Fosfato monosódico KH ₂ PO ₄	0,24 g
pH	7,4

2. Preparación 250 ml

Cloruro de sodio NaCl	2 g
Cloruro de potasio KCl	0,05 g
Fosfato disódico Na ₂ HPO ₄	0,36 g
Fosfato monosódico KH ₂ PO ₄	0,06 g

Pesar cada componente y diluir cada reactivo por separado y agregar a una fiola de 250 ml, enraizar con agua destilada.

Anexo 21. Preparación de la dilución de Azul de Tripán al 0,05%

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$0.4\% \times X = 0.05\% \times 10 \text{ ml}$$

$$X = 1.25 \text{ ml}$$

Agregar 1,25 ml de azul de tripán y añadir PBS, enraizar en una fiola, rotular y almacenar en refrigeración.

Anexo 22. Preparación de 250 ml DMEM suplementado

1. Adición de antibióticos

Penicilina	100 UI/ml	2.5 ml/250 ml DMEM
Estreptomicina	100 µg/ml	25 mg/250 ml DMEM
Gentamicina	100 µg/ml	125 µl/250 ml DMEM

Penicilina 100X

Penicilina	59.00 mg	29.5 mg
Agua destilada	Csp 100 ml	Csp 50 ml

Aforar a 100 ml en una fiola, mantener a 4°C. Utilizar 1.0 ml por cada 100 ml de DMEM

Estreptomicina

Se pesa directamente en balanza analítica.

Gentamicina

Ampollas 160 mg/2 ml

Se toma 125 µl y se añade a 25 ml de DMEM.

2. Adición de enzimas

Tripsina	1 mg/ml	35 mg/35 ml DMEM
Colagenasa	1 mg/ml	35 mg/35ml DMEM
Hialuronidasa	1 mg/ml	35 mg/35ml DMEM
DNasa	5 µg/ml	92 µl/35 ml DMEM

Anexo 23. Preparación de solución Stock de penicilina

Penicilina G (actividad de 1,668 UI/mg)

1 mg	1,668 UI
100 UI	X mg
X= 0,059 mg/100UI	
Penicilina G	0,059 ml
Agua destilada estéril	10ml

Se prepara en la cámara de flujo laminar la solución stock almacenar en refrigeración y se utilizará alícuotas

Anexo 24. Preparación de enzima DNasa I

3,8 mg 2000 µl NaCl 0,15M

0,5 mg X µl NaCl

X = 263 µl NaCl

Alícuotas de 263 µl 100 ml DMEM

Anexo 25. Análisis de varianza del aislamiento de células espermatozonales obtenidas de testículo de alpaca a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.

Fuente	GL	SC. Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad	3	2665	888.5	7.09	0.001
Error	36	4513	125.4		
Total	39	7179			

Anexo 26. Análisis de comparación múltiple prueba de Fisher a un Nivel de confianza de 95% para determinar el porcentaje de células espermatozonias por campo microscópico aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.

Edad	N	Media	Agrupación
Mayor a 1 año	10	48.67	A
Mayor a 5 años	10	32.82	B
Entre 3 a 4 años	10	31.03	B
Menor a 1 año	10	27.31	B

Anexo 27. Análisis de varianza de viabilidad de células espermatozonales aisladas de testículo de alpaca a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad	3	1206	401.85	6.26	0.002
Error	36	2311	64.19		
Total	39	3516			

Anexo 28. Análisis de comparación múltiple prueba de Fisher a un Nivel de confianza de 95% para determinar la viabilidad de células espermatozonales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.

Edad	N	Media	Agrupación
Mayor a 1 año	10	1.9470	A
Mayor a 5 años	10	1.3126	B
Entre 3-4 años	10	1.2413	B
Menor a 1 año	10	1.0926	B

Anexo 29. Análisis de Varianza del rendimiento de células espermatozonales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad	3	1206	401.85	6.26	0.002
Error	36	2311	64.19		
Total	39	3516			

Anexo 30. Análisis de comparación múltiple prueba de Fisher a un Nivel de confianza de 95% para determinar del rendimiento de células espermatozonales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.

Edad	N	Media	Agrupación
Mayor a 1 año	10	1.9470	A
Mayor a 5 años	10	1.3126	B
Entre 3-4 años	10	1.2413	B
Menor a 1 año	10	1.0926	B

Anexo 31. Análisis de varianza de mortalidad de células espermatozonales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad	3	1206	401.85	6.26	0.002
Error	36	2311	64.19		
Total	39	3516			

Anexo 32. Análisis de comparación múltiple prueba de Fisher a un Nivel de confianza de 95% para determinar mortalidad de células espermatozonales aisladas de testículo de alpacas a diferentes edades Ayacucho 2015-2016.

Edad	N	Media	Agrupación
Entre 3- 4 años	10	23,66	A
Mayor a 5 años	10	20,76	A
Menor a 1 año	10	12,41	B
Mayor a 1 año	10	10,59	

Anexo 33. Población y distribución por razas de alpacas en el Perú⁴¹

Región	Huacaya	%	Suri	%	Cruzada	%	Total	%
Puno	1,209,716	44.48	190,528	45.51	41,532	17.59	1,441,776	42.72
Cusco	399,611	14.70	74,993	17.91	51,529	21.84	526,133	15.59
Junín	51,370	1.88	3,560	0.85	5,417	2.29	60,347	1.79
Arequipa	353,658	13.01	55,317	13.21	55,362	23.46	464 337	13.76
Ayacucho	158,045	5.81	32,752	7.82	31,066	13.16	221,863	6.57
Apurímac	157,985	5.80	41,886	10.01	12,982	5.50	212,853	6.31
Huancavelica	255,472	9.39	12,278	2.93	34,857	14.77	302,607	8.97
Pasco	134,074	4.93	7,359	1.76	3 246	1.38	144,679	4.29
Total	2 719 931	100.0	418 673	100.0	235 991	99.99	3 374 595	100.0

Anexo 34. Matriz de consistencia

PROBLEMA CIENT.	HIPOTESIS	OBJETIVOS	VARIABLE	MARCO TEÓRICO	METODOLOGIA
PROBLEMA GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	OBJETIVO GENERAL	VARIABLES:	2.1. Antecedentes 2.2. Células madre 2.3. Anatomía y fisiología testicular 2.4. Espermatogénesis 2.5. Comparación de la espermatogénesis murina, bovina y de primates. 2.6. Inicio de espermatogénesis en alpaca. 2.7. Aislamiento de células espermatogoniales. 2.8. Identificación microscópica de espermatogonias. 2.9. Viabilidad celular. 2.10. Rendimiento celular. 2.11. Vicugna pacos	Diseño de investigación: Aplicativo POBLACION: Testículos de alpacas MUESTRA: Testículos de alpacas entre las edades: Menores a 1 año Mayores a 1 año Entre 3-4 años Mayores a 5 años METODOLOGIA Métodos instrumentales para la recolección de datos a). Aislamiento de espermatogonias b). Determinación de la viabilidad de espermatogonias C). Determinación del rendimiento celular
¿En qué medida la edad de las alpacas determina la viabilidad y el rendimiento en el aislamiento de espermatogonias a partir de testículos?	A menor edad de las alpacas mayor porcentaje de viabilidad y rendimiento en el aislamiento de espermatogonias a partir de testículos obtenidos por castración	Determinar el porcentaje de viabilidad y rendimiento de espermatogonias aisladas a partir de testículos de alpacas. OBJETIVOS ESPECIFICOS a). Aislar espermatogonias de alpacas por digestión enzimática. d). Determinar el porcentaje de viabilidad y rendimiento de espermatogonias c). Establecer la edad de la alpaca donde las espermatogonias inicia la diferenciación	V. independiente Edad de las alpacas V. dependiente Viabilidad de espermatogonias del aislamiento INDICADORES VI Meses VD Porcentaje de espermatogonia Concentración de espermatogonias		