



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**Fragmentación de ADN en espermatozoides epididimarios  
de *Vicugna pacos* “ALPACA” mediante el test de  
dispersión de la cromatina y su potencial impacto en el  
desarrollo embrionario temprano**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista  
Biotecnólogo

**AUTOR**

Emanuel RODRÍGUEZ CASTILLO

**ASESOR**

Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Rodríguez, E. (2022). *Fragmentación de ADN en espermatozoides epididimarios de Vicugna pacos "ALPACA" mediante el test de dispersión de la cromatina y su potencial impacto en el desarrollo embrionario temprano*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Emanuel Rodríguez Castillo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70432647
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0003-4718-3791">https://orcid.org/0000-0003-4718-3791</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Martha Esther Valdivia Cuya
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06449624
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-8301-5536">https://orcid.org/0000-0002-8301-5536</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Mónica Yolanda Paredes Anaya
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07901815
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Zeze Humberto Bravo Gutierrez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42952975
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Margarita Rosa Eugenia Velásquez Reinoso
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25594148
<b>Datos de investigación</b>	

Línea de investigación	A.1.3.4. Reproducción
Grupo de investigación	Biotecnología Reproductiva para la conservación y mejora genética animal – BIOTRA
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Pregrado. B19100264.
Ubicación geográfica de la investigación	<p>Edificio: Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Calle: Av. Venezuela s/n cuadra 34 Latitud: -12.05983 Longitud: -77.08239</p> <p>Edificio: Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas, Facultad de Ingeniería Zootecnia, Universidad Nacional de Huancavelica País: Perú Departamento: Huancavelica Provincia: Huancavelica Distrito: Cercado de Lima Calle: Av. Agricultura N° 319 – 321. Sector – Paturpampa Latitud: -12.77837 Longitud: -74.95985</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2021
URL de disciplinas OCDE	Biología reproductiva <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO  
GENETISTA BIOTECNÓLOGO  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)**

Siendo las 16:00 horas del 08 de febrero de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://zoom.us/j/98644066307?pwd=QTdNd3VOeU9PL1E1Vktud2RaR3dqQT09>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **EMANUEL RODRÍGUEZ CASTILLO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20210095618, el titulado expuso su Tesis: “**FRAGMENTACIÓN DE ADN EN ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE *Vicugna pacos* “ALPACA” MEDIANTE EL TEST DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA Y SU POTENCIAL IMPACTO EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO TEMPRANO**”, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **EMANUEL RODRÍGUEZ CASTILLO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 17:25 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 08 de febrero de 2022.

 **UNMSM**  
Firmado digitalmente por PAREDES ANAYA Monica Yolanda FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 08.02.2022 20:07:48 -05:00

---

**Dra. MONICA PAREDES ANAYA**  
(PRESIDENTA)

 **UNMSM**  
Firmado digitalmente por VALDIVIA CUYA Martha Esther FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 08.02.2022 20:57:33 -05:00

---

**Dra. MARTHA VALDIVIA CUYA**  
(ASESORA)

---

**Mg. ZEZE BRAVO GUTIERREZ**  
(MIEMBRO)

 **UNMSM**  
Firmado digitalmente por VELASQUEZ REINOSO Margarita Rosa Eugenia FAU 20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 08.02.2022 17:34:01 -05:00

---

**Blga. MARGARITA VELASQUEZ REINOSO**  
(MIEMBRO)

## **DEDICADO**

A mis padres Claudio Francisco y Julia Elena, por no perder la fe en mi y estar al pie del cañón conmigo todo este tiempo.

A mis hermanos Alexis, Eleana y Claudia, por mostrarme con su ejemplo como sobrellevar las vicisitudes de la vida.

A mi sobrino Carlos Daniel, por ser un hermano, amigo y confidente.

Los amo a mi imperfecta manera.

## AGRADECIMIENTOS

A dios por permitirme tener la salud suficiente para llevar a término esta investigación.

A mis padres, gracias por dedicarse y preocuparse por mi hasta la extenuación, sus palabras y las vivencias compartidas moldearon mi carácter y los llevaré siempre en mi hasta el final de mis días. Kshe gracias especialmente por mostrarme desde niño que las ciencias naturales son lo mas hermoso del planeta, gracias por orientar y fomentar mi curiosidad científica.

A mis hermanos Eleana, Claudia y Alexis, gracias por cuidarme, apoyarme y dejarme nutrir de su experiencia, estoy orgulloso de ser su hermano y gracias por dejarme compartir mi tiempo de vida con ustedes, espero que en algún momento ustedes puedan sentirse orgullosos de mi también.

A mis sobrinos, en especial a Carlos Daniel, gracias por estar en mi vida, soy el tío más feliz del mundo por tenerte.

A mis mentores y amigos el profesor Mg. José Pino y Blgo. Layonal Acosta sin ustedes es probable que no hubiese conocido el bello mundo de la salud reproductiva, gracias por las oportunidades y los conocimientos compartidos, lo que aprendí con ustedes son mi *handbook* del día a día.

A los profesores Dra. Martha Valdivia y Mg. Zezé Bravo, de corazón gracias por recibirme en el laboratorio, asesorarme, enseñarme, apoyarme y compartir sus conocimientos conmigo en el desarrollo de este trabajo, perdónenme si mi inexperiencia les ha causado malestar en algún momento.

Al Dr. Jaime Ruiz, Jefe del Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica por apoyar esta investigación prestando las instalaciones de su laboratorio para completar parte del desarrollo de este trabajo.

A los compañeros y pasantes del laboratorio de Fisiología de la Reproducción: Enma, Diego, Stefany, Alex, Alieska, Carmen, Rubén, Héctor, Mapi, Cathy, Gloria, Ángel y Andrea, estoy profundamente agradecido por su apoyo durante el desarrollo de esta investigación y sobremanera por su incalculable amistad, disfrute trabajar, compartir y departir tanto con ustedes chicos, son el mejor grupo con el que pude trabajar. Enma, un agradecimiento especial a ti sobre los demás, gracias por colaborar conmigo en las buenas y tolerarme en las malas, este trabajo tiene mucho de ti.

Muchas gracias al Fondo de promoción de Trabajo de Tesis del Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el financiamiento a esta investigación aprobado con **RR N° 04692-R-19, Proyecto con código B19100264**, gracias por su confianza, espero que los conocimientos desprendidos de este estudio sean base a para otros más venideros.

Finalmente dar un especial agradecimiento a cada mujer que arribo en mis diecisiete años de vida sentimental, gracias por las enseñanzas, el amor, y recuerdos que dejaron huella en mí y ahora son parte de mi realidad, he sido un hombre feliz y afortunado por conocerlas.

# INDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	II
AGRADECIMIENTOS .....	III
INDICE GENERAL.....	V
ABREVIATURAS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS .....	X
ÍNDICE DE TABLAS .....	XI
ÍNDICE DE ANEXOS .....	XII
RESUMEN .....	XIII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL.....	2
2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ALPACA ( <i>VICUGNA PACOS</i> ) .....	2
2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA .....	4
2.3. PROBLEMÁTICA REPRODUCTIVA .....	5
2.4. EL ESPERMATOZOIDE DE ALPACA.....	6
2.5. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA .....	8
2.6. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA .....	10
2.7. FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO .....	11
2.7.1. FACTORES QUE INCREMENTAN EL DAÑO AL ADN ESPERMÁTICO .....	12
2.7.2. TÉCNICAS PARA EVALUAR EL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO .....	16
2.8. FECUNDACIÓN IN VITRO .....	19
2.9. CULTIVO DE EMBRIONES .....	20
2.10. DESARROLLO EMBRIONARIO .....	20
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
3.1. HIPÓTESIS.....	25
3.2. OBJETIVOS.....	25
3.2.1. Objetivo General .....	25
3.2.2. Objetivos Específicos.....	25
4. MATERIALES Y METODOS .....	27
4.1. LUGAR DE ESTUDIO.....	27
4.2. MATERIAL BIOLÓGICO .....	27
4.3. TRANSPORTE .....	28
4.4. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS .....	28

4.4.1.	Material para el Test de la Dispersión de la Cromatina Espermática .....	28
4.4.2.	Reactivos de Tinción .....	30
4.4.2.1.	Reactivo para evaluación de viabilidad celular .....	30
4.4.2.2.	Reactivo para evaluación de integridad de membrana.....	30
4.4.3.	Medios de cultivo.....	30
4.5.	MATERIALES DE PLÁSTICO, METAL Y VIDRIO .....	32
4.6.	EQUIPOS DE LABORATORIO .....	32
4.7.	METODOLOGÍA .....	33
4.7.1.	Método de Recuperación de Espermatozoides Epididimarios .....	34
4.7.2.	Método de Evaluación de Parámetros Espermáticos.....	34
4.7.3.	Test de la Dispersión de la Cromatina Espermática .....	36
4.7.4.	Selección y capacitación espermática por <i>Swim up</i> .....	38
4.7.5.	Fecundación in vitro y Evaluación del Desarrollo Embrionario In vitro ....	39
4.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	40
5.	RESULTADOS .....	42
5.1.	ESTANDARIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO .....	42
5.2.	EVALUACIÓN DE CONTROLES .....	44
5.3.	PARÁMETROS ESPERMÁTICOS .....	46
5.4.	PRUEBAS ESTADÍSTICAS .....	49
5.4.1.	Factor transporte.....	49
5.4.2.	De los parámetros espermáticos y el índice de fragmentación espermática.	50
5.4.3.	Evaluación cualitativa de los patrones de SCD .....	51
5.4.4.	Evaluación del Índice de Fragmentación de ADN en muestras espermáticas seleccionadas por <i>swim up</i> destinadas a Fecundación in vitro.....	53
5.4.5.	Evaluación de la Fecundación In vitro .....	55
6.	DISCUSIÓN .....	58
6.1.	DE LA ESTANDARIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO .....	58
6.2.	DEL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN .....	60
6.2.1.	Factor transporte.....	60
6.2.2.	Relación del Índice de Fragmentación de ADN con los parámetros espermáticos .....	61
6.2.3.	Evaluación de los patrones SCD .....	63
6.3.	ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO POST CAPACITACIÓN SWIM UP .....	64
6.4.	FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA Y DESARROLLO EMBRIONARIO .....	65
7.	CONCLUSIONES .....	71
8.	RECOMENDACIONES .....	72

<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>92</b>

## ABREVIATURAS

ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
AKT	:	Proteína cinasa B
AMPc	:	Monofosfato de adenosina cíclico
AO	:	Naranja de acridina
BSA	:	Albumina sérica bovina
CASA	:	Computer Assisted Semen Analysis
Ca <sup>+</sup>	:	Calcio iónico
CO <sub>2</sub>	:	Dióxido de carbono
DBD-FISH	:	Detección de roturas de ADN por hibridación fluorescente in situ
DTT	:	1,4 Dithiotreitol
EDTA	:	Ácido etilendiaminotetraacético
ESPM	:	Espermatozoides epididimarios progresivos móviles
FIV	:	Fecundación in vitro
g	:	Gramos
HCO <sup>-3</sup>	:	Anión bicarbonato
ICSI	:	Inyección intracitoplasmática del espermatozoide
IFA	:	Índice de fragmentación de ADN espermático
L	:	Litros
LMP	:	Agarosa de bajo punto de fusión
MII	:	Metafase II
msnm	:	metro sobre el nivel del mar
NaCl	:	Cloruro de sodio

NaOH	:	Hidróxido de sodio
NMP	:	Agarosa de punto de fusión normal
O <sub>2</sub>	:	Oxígeno molecular
PBS	:	Búfer fosfato salino
pH	:	Potencial de Hidrogeno
PI3	:	Inositol-3-fosfoquinasa
PKA	:	Proteína cinasa A
ROS	:	Radicales libres de oxígeno
RPM	:	Revoluciones por minuto
SCD	:	Dispersión de la cromatina espermática
SCSA	:	Ensayo de la estructura de la cromatina espermática
TRIS	:	2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TUNEL	:	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
UNMSM	:	Universidad Nacional Mayor de San Marcos
µg	:	Microgramos
µL	:	Microlitros
°C	:	Grados Celsius

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo esquemático del origen de la fragmentación espermática. ....	16
<b>Figura 2.</b> Imágenes microscópicas del desarrollo embrionario preimplantacional de bovinos .....	22
<b>Figura 3.</b> Flujograma del trabajo experimental. ....	33
<b>Figura 4.</b> Resumen de la metodología de preparación de la técnica de SCD empleada.	38
<b>Figura 5.</b> Estandarización del tiempo de solución denaturante. ....	42
<b>Figura 6.</b> Estandarización del tiempo de solución lisis. ....	43
<b>Figura 7.</b> Resultados del control positivo mediante la exposición a UV con tiempos, distancias y potencias variables. ....	44
<b>Figura 8.</b> Establecimiento de los controles. ....	45
<b>Figura 9.</b> Diagrama de caja y bigotes de la distribución de los índices de fragmentación del ADN (IFA) .....	49
<b>Figura 10.</b> Gráfico de distribución de las medias aritméticas del IFA respecto a su la movilidad progresiva .....	51
<b>Figura 11.</b> Composición de las muestras espermáticas basados en los patrones de dispersión de la cromatina espermática (SCD).....	53
<b>Figura 12.</b> Clasificación de mórulas obtenidas según su calidad por grupo de IFA .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Evaluación de los parámetros espermáticos de las muestras espermáticas evaluadas en este estudio.....	48
<b>Tabla 2.</b> Distribución de los patrones de halos de dispersión de la cromatina observados en las muestras epididimarias de alpaca. ....	52
<b>Tabla 3.</b> Datos de fragmentación espermática inicial y post capacitación <i>swim up</i> dentro de una misma muestra. ....	54
<b>Tabla 4.</b> Comparación del desarrollo embrionario temprano in vitro en alpaca entre los grupos estudiados, expresado en porcentajes por grupo de IFA .....	57

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo N°1.</b> Estadísticos descriptivos de los parámetros espermáticos segmentados por el factor “transporte de la muestra”.....	92
<b>Anexo N°2.</b> Medida de la heterogeneidad del índice de fragmentación de ADN espermático (IFA) entre los grupos que componen el transporte de la muestra.....	92
<b>Anexo N°3.</b> Estadísticos descriptivos de los parámetros espermáticos en su totalidad. 93	
<b>Anexo N°4.</b> Correlación no paramétrica entre el índice de fragmentación de ADN espermático (IFA) y algunos parámetros espermáticos.....	93
<b>Anexo N°5.</b> Prueba de Kruskal Wallis para determinar la similitud de los valores de índice de fragmentación de ADN espermático (IFA) y la calidad espermática .....	94
<b>Anexo N°6.</b> Estadísticos descriptivos para los patrones de dispersión de la cromatina espermática (SCD).....	94
<b>Anexo N°7.</b> Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para la heterogeneidad del índice de fragmentación de ADN (IFA) antes y después de la selección espermática. ....	94
<b>Anexo N°8.</b> Estadísticos descriptivos de los índices de fragmentación espermática inicial y post capacitación swim up .....	95
<b>Anexo N°9.</b> Desarrollo embrionario por fechas. ....	96
<b>Anexo N°10.</b> Resumen del desarrollo embrionario.....	98
<b>Anexo N°11.</b> Pruebas de significancia usando el estadístico Chi-cuadrado. ....	99
<b>Anexo N°12.</b> Patrones de halos de dispersión cromática de espermatozoides epididimarios de alpaca usando la técnica SCD .....	100
<b>Anexo N°13.</b> Foto de espermatozoides analizados por la técnica SCD .....	101
<b>Anexo N°14.</b> Registro fotográfico de la fecundación <i>in vitro</i> . ....	101
<b>Anexo N°15.</b> Fotos de embriones obtenidos. ....	102

## RESUMEN

El fenómeno de fragmentación de ADN espermático es aquella condición en la que el ADN de las células espermáticas, frente a condiciones metabólicamente anómalas propias o inducidas por el entorno, experimentan daño estructural a nivel de la cadena nucleotídica, condicionando la supervivencia celular a la extensión del daño recibido e influyendo en la salud y el bienestar de la descendencia al fecundar un ovocito. En la actualidad, muchos embriólogos avalan la importancia de fecundar con espermatozoides con baja fragmentación espermática y por lo tanto se han venido desarrollado diversas técnicas para cuantificarlo, dentro de ellas está el ensayo de dispersión de la cromatina espermática o prueba SCD.

El objetivo de este estudio fue demostrar si el empleo de la prueba SCD sirve como predictor de calidad espermática en alpacas, a la vez poder medir su implicancia en los procesos de desarrollo embrionario temprano, para el primer objetivo se procesaron 45 pares de muestras epididimarias colectadas en el Camal Municipal de Huancavelica (aprox. 3600 msnm) siendo estas analizadas en los parámetros espermáticos convencionales y mediante la prueba SCD. Para medir la implicancia de la fragmentación en el desarrollo embrionario se llevó a cabo 4 fecundaciones *in vitro* usando 111 ovocitos MII previamente madurados en laboratorio, separándose en grupos de evaluación según el nivel de fragmentación de la muestra espermática (Grupo A <2% IFA, Grupo B 2-4% IFA y Grupo C 4-6% IFA) y monitorizando el desarrollo a través de la observación directa en tres etapas: fecundación, formación mórulas y de blastocistos.

Se obtuvo un valor promedio de la fragmentación espermática de alpaca expresado como índice de fragmentación de ADN (IFA) de  $20.98 \pm 32.54\%$ , así mismo se demostró estadísticamente que el IFA puede correlacionarse positivamente con el porcentaje de

espermatozoides inmóviles y negativamente con la movilidad progresiva y concentración ( $p < 0.05$ ). La evaluación de los estadios embrionarios solo produjo resultados comparables en el Grupo A y Grupo C encontrándose que no había diferencias significativas entre ambos grupos durante la monitorización embrionaria ( $p > 0.05$ ). Se concluye que es posible usar el IFA como un predictor de calidad espermática, mas el nivel de IFA usado en este trabajo no es estadísticamente significativo para evidenciar su relación con alguno de los tres estadios de desarrollo embrionario preimplantacional analizados.

*Palabras clave: fragmentación de ADN espermático, SCD, alpaca, in vitro, embriones*

## 1. INTRODUCCIÓN

La ganadería de camélidos sudamericanos como la alpaca (*Vicugna pacos*) tiene una alta significancia socioeconómica en los países andinos como el Perú, donde las comunidades alpaqueras desarrollan su economía basada en el comercio cárnico y de fibra de lana en esta especie. En años recientes, el alto interés y demanda en fibras de alpaca de alta calidad por parte del mercado textil y la baja tasa de fertilidad de esta especie ha dado como resultado un incremento en el estudio y aplicación de biotecnologías reproductivas, no obstante, han tenido un éxito muy limitado (Fernández-Baca, 1993; Trasorras et al., 2013).

La evidencia clínica en reproducción asistida sugiere que fallas en los procesos de fecundación y/o desarrollo embrionario en mamíferos responden en gran medida a defectos en los gametos, factores que no son atendidos y entendidos correctamente sobre todo cuando se habla de animales de crianza. En este contexto el análisis de gametos, como los espermatozoides, previo a un ciclo de fecundación *in vitro* (FIV) puede identificar defectos que alteren la embriogénesis normal, mejorando así la calidad de los embriones transferidos (Balasuriya et al., 2011).

Uno de estos análisis es la determinación del grado de fragmentación de ADN espermático, ensayo que surge como alternativa para explicar la infertilidad masculina de origen desconocido (Vásquez, 2012) y el poco éxito en los ciclos recurrentes de fecundación (Barroso et al., 2009; Portella-Ruiz & Gonzales, 2016). El daño a nivel de ADN en la línea germinal paterna puede resultar en una fecundación deficiente, desarrollo subóptimo y alteraciones en la morfocinética del embrión preimplantacional (Casanovas et al., 2019; Esbert et al., 2018), abortos espontáneos y un riesgo elevado de prevalencia

de desórdenes congénitos en la descendencia (Aitken & De Iuliis, 2010; Aitken & Koppers, 2011; Kumaresan et al., 2020; Middelkamp et al., 2020).

La importancia de la integridad del ADN espermático por tanto se convierte en una condición *sine qua non* para el desarrollo embrionario y posterior obtención de la descendencia (Carretero et al., 2012; Zini et al., 2001) teniendo como fin, maximizar el éxito de las biotecnologías reproductivas para la crianza intensiva de animales de granja

El siguiente trabajo de investigación propone una metodología alternativa para la evaluación de la integridad del ADN espermático de *Vicugna pacos* mediante una modificación alcalina al test de la dispersión de la cromatina espermática (SCD), la cual es una técnica de bajo coste y alta fiabilidad desarrollado con éxito en otras especies de mamíferos (Carretero et al., 2012; Cortés-Gutiérrez et al., 2009; Enciso et al., 2006; Fernández et al., 2005; Pawar & Kaul, 2011) similar a otras pruebas más elaboradas como citometría de flujo (Chohan, 2006; Ribas-Maynou et al., 2013) y TUNEL (Zhang et al., 2010), y el potencial impacto de este parámetro espermático no convencional en el desarrollo embrionario temprano *in vitro* en alpaca lo que permitirá mejorar el criterio de selección espermática en los distintos centros de producción y laboratorios de investigación embriológica de esta especie para aumentar la tasa de producción de embriones, implantación y preñez.

## **2. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL**

### **2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ALPACA (*VICUGNA PACOS*)**

*Vicugna pacos* conocida comúnmente como alpaca (del aimara *allpaqa*) es un camélido alto andino domesticado similar a la llama (*Lama glama*) aunque de menor

tamaño y con un cuello más alargado, diurno, de hábitos sociales y que puede llegar a vivir hasta 20 años. Inicialmente fue descrita por Linnaeus (1758) como una de las formas domésticas de camélidos del Nuevo Mundo y fue emparentada con el guanaco (*Lama guanicoe*), sin embargo los estudios con secuencias parciales del gen citocromo b y de microsatélites permitió fortalecer la hipótesis proveniente de evidencias arqueozoológicas de que la alpaca podría haber derivado de la domesticación de poblaciones de vicuñas (Kadwell et al., 2001; Marín et al., 2007), evidencia que ha permitido su reclasificación actual como *Vicugna pacos*.

Están distribuidos mayoritariamente en Sudamérica, siendo Perú el país que abarca la mayor cantidad de cabezas de ganado de este animal con más de 3.6 millones de animales que representan el 87% de ellos a nivel mundial (INEI, 2013), distribuidos en 17 departamentos donde Puno y Cuzco concentra la mayor producción. Debido al creciente interés en la fibra de lana de este animal varios países han venido desarrollando su crianza como los Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Canadá entre otros.

Los camélidos sudamericanos son de apareamiento estacional dándose este comportamiento de forma natural durante los meses de lluvia de Noviembre a Abril, coincidiendo con el incremento de forraje en la zona, mas se ha visto que en los centros de crianza en Sudamérica, camélidos como la alpaca pueden entrar en apareamiento de Diciembre a Marzo, con picos elevados de apareamiento desde el mes de Enero (Brown, 2000; San-Martin et al., 1968).

En la alpaca, la actividad sexual se observa a partir de los 12 meses en adelante, sin embargo, en la práctica ganadera se suele retrasar el apareamiento hasta los 2 años de edad (Fernández-Baca, 1993) donde estos animales experimentan una caída de la libido al permanecer los machos en contacto continuo con las hembras (Brown, 2000;

Sumar, 1996). Esta especie es polígama donde el macho forma un harén con hasta 10 hembras. San Martín et al (1968) reportaron que la alpaca hembra no tiene un patrón de ciclo estral definido, lo que existe es un estro que se sostiene casi continuamente en la ausencia de macho alguno u otro estimulante ovulatorio con períodos ocasionales de no aceptación (Fernández-Baca, 1993), es decir que requiere cópula para desencadenar la acción de la hormona luteinizante responsable de la ovulación, siendo caracterizada como especie de ovulación inducida por el coito (Fernandez-Baca et al., 1970; Ratto et al., 2005; Sumar, 1994).

Las gestaciones en esta especie suelen durar entre 342 a 345 días, tiempo del cual nace una sola cría con peso oscilante entre los 7 y 8 kilogramos. El nacimiento de gemelos en esta especie es un fenómeno muy raro.

## **2.2. IMPORTANCIA ECONÓMICA**

En el Perú la zona rural alto andina, constituida como la zona alpaquera, tiene como una de sus actividades comerciales principales la producción de camélidos domésticos, cuyo producto principal es la fibra que tiene características textiles apreciadas. La producción y comercialización de aquella es una industria altamente dinámica donde intervienen actores a todo nivel, tanto nacionales como internacionales: con la ganadería y transformación primaria en las zonas andinas, pasando por su industrialización, confección y comercialización como producto terminado tanto en el mercado europeo como el asiático.

Otro producto derivado de las alpacas es su carne, la cual tiene un valor nutritivo similar o superior a otras carnes, desafortunadamente aún no está debidamente

aprovechada en el mercado nacional restringiéndose mayormente a las zonas de crianza del interior del país, de la misma forma subproductos derivados de pieles y cueros ampliamente usados en la industria artesanal (FAO, 2005).

Según el CENAGRO 2012 (INEI, 2013) el 99% de las cabezas de ganado se encuentra en poder de pequeños criadores y el 1% en diversas formas organizativas, donde paradójicamente los pequeños productores son uno de los segmentos menos favorecidos de la población peruana, presentando ingresos anuales per cápita menores a 800 dólares americanos (FAO, 2005).

### **2.3. PROBLEMÁTICA REPRODUCTIVA**

Existe un fenómeno de baja fertilidad en alpacas representado por un alto número de pérdidas embrionarias como consecuencia tanto de factores endógenos como exógenos (Fernández-Baca, 1993; Sumar, 1996). En las hembras estos factores suelen estar asociados a inmadurez folicular, anomalías fisiológicas (himen persistente, efectos luteolíticos diferenciales de los cuernos uterinos), infecciones vagino-uterinas, persistencia del cuerpo lúteo, fallas ováricas y abortos (relacionados a infecciones uterinas o bajos niveles de progesterona) y en los machos por la presencia de adhesiones entre el pene y el prepucio, baja calidad seminal y problemas asociados a nivel testicular (Fowler & Bravo, 2010); en otros casos los factores de infertilidad son congénitos.

Años de malos esquemas de manejo reproductivo y la baja fertilidad inherente a estos animales han contribuido a deteriorar la calidad de las fibras, disminuyendo la calidad de producción, la pérdida de diversidad genética y restándole competitividad en el

mercado internacional a las comunidades alpaquera altoandinas (Mamani, 2019; Yalta et al., 2015), lo que ha impulsado a desarrollar estrategias y programas de crianza basados en las biotecnologías reproductivas dado el potencial que representa este recurso animal, es así que técnicas como la inseminación intrauterina, desarrollo sincronizado de folículos ováricos, super estimulación ovárica, transferencias embrionarias y criopreservación ovárica por vitrificación (Bravo et al., 1997; Ruiz et al., 2013; Trasorras et al., 2013) se vienen realizando con el fin de contrarrestar las bajas tasas de fertilidad y preñez en esta especie a la vez que permite obtener animales con características mejoradas.

Si bien la literatura muestra resultados relativamente exitosos de preñez mediante inseminación artificial (Adams et al., 2009; Bravo et al., 1997) y transferencia embrionaria (Huanca et al., 2013) todos estos comparten el hecho de depender de muestras en fresco lo cual limita y circunscribe su uso a ciertos núcleos de crianza. La aplicación de tecnologías como la fecundación *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI) (Mamani, 2019; Miragaya et al., 2006) se avizoran como recursos prometedores en la búsqueda de maximizar la obtención de progenie mediante embriones *in vitro* y dando la opción de criopreservarlos para aprovechamiento posterior tanto por el productor alpaquero como por los grupos de investigación interesados, sentando bases para la creación de bancos de germoplasma y de embriones, lo que permitirá además de preservar la diversidad genética de la alpaca.

#### **2.4. EL ESPERMATOZOIDE DE ALPACA**

Estas células elongadas altamente diferenciadas, producto final de un proceso altamente sofisticado de divisiones y remodelaciones estructurales celulares que

ocurren en los testículos, llamado espermatogénesis, son una singular y autónoma parte del soma cargada con la responsabilidad de mantener la identidad de los organismos diploides proveyendo del 50% del material nuclear genético a la descendencia (Gosálvez et al., 2015).

Están compuestos de dos zonas: **cabeza**, donde encontramos el ADN haploide altamente compactado como medida de protección frente a agentes exógenos y el acrosoma conteniendo enzimas hidrolíticas como la hialuronidasa y proacrosina que median la interacción gamética durante la fecundación; y la **cola** donde encontramos la pieza intermedia rica en mitocondrias y el flagelo espermático compuesto por un axonema rico en microtúbulos ambos interactuando en conjunto en los procesos de propulsión para la movilidad (Contreras, 2017).

El espermatozoide de alpaca a diferencia de otros rumiantes domésticos, en semen eyaculado, casi no presenta movilidad masal siendo la movilidad individual principalmente oscilante no progresiva, donde los individuos tienen un 5-10% de movilidad progresiva (Contreras, 2017), presencia de gotas citoplasmáticas entre el 1-7% (Brown, 2000) y una morfología espermática anormalmente alta (Fernández-Baca, 1993). Huanca-Marca et al. (2020) en un trabajo más reciente mediante un análisis espermático asistido por computadora (CASA) corrobora estas aseveraciones mostrando que la heteromorficidad (gran variabilidad morfológica de los espermatozoides inter e intra animal) y parámetros espermáticos relativamente bajos (movilidad total  $16.27 \pm 11.96\%$ , concentración  $247 \pm 186.70\%$ ) son valores característicos de la alpaca y no se debe propiamente a un factor de mortandad espermática (viabilidad  $62.86 \pm 15.92\%$ ) sino a la madurez sexual, estado fisiológico y polimorfismo genéticos que controlan la espermatogénesis.

Actualmente los grupos de investigación reproductiva en alpacas se han interesado en el uso de espermatozoides epididimarios dado que el procesamiento de evaluación es más “amigable” (Bravo & Valdivia, 2018; Ugarelli et al., 2018) al eliminar los procesos de licuefacción mecánica y/o enzimática (tripsina, papaína, colagenasa, etc.) necesarios para trabajar con eyaculado dado su alta filancia y viscosidad (Adams et al., 2009).

## **2.5. CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA**

Desde la acuñación del término por Colin Russell Austin en 1952, el concepto ha evolucionado conjuntamente con el descubrimiento de los mecanismos que median la fecundación, separándose de conceptos pertenecientes a eventos concomitantes pero independientes como la reacción acrosómica y al hiperactivación espermática (Gervasi & Visconti, 2016).

La capacitación espermática puede definirse como la culminación de la “madurez funcional” o adquisición de la capacidad fecundante, que empezó tempranamente con la espermatogénesis a nivel testicular, pasando por una maduración estructural en el epidídimo y que finaliza post copula en el tracto femenino (Nixon & Bromfield, 2018), en la que una subpoblación espermática a través de sofisticados cambios bioquímicos remodelan la membrana plasmática, impulsan el movimiento flagelar progresivo y alistan la maquinaria enzimática para la interacción gamética previa a la singamia .

Estos cambios fisiológicos espermáticos, inician con la fluidificación de la membrana plasmática espermática mediante la remoción del colesterol y factores decapacitantes asociados a membrana, este cambio en membrana a nivel molecular permite modificar

los canales iónicos permitiendo el influjo de  $\text{HCO}^{-3}$  y  $\text{Ca}^{+2}$ , a la vez que se modifica el pH citosólico y activa la vía del AMPc/PKA, esa señal incrementa la fosforilación de residuos de tirosina de múltiples proteínas espermáticas resultando en la inactivación de serina/treonina fosfatasas mediada por una familia de tirosin-quinazas (Nixon & Bromfield, 2018), en varias especies esta fosforilación de proteínas dependientes de AMPc se da en el flagelo espermático, asociado con la hiperactivación de motilidad espermática (Leemans et al., 2019) evento considerado marcador del proceso de capacitación. Asimismo el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular también favorece este proceso y lo predispone a la reacción acrosómica (Gervasi & Visconti, 2016).

Experimentalmente en alpaca se ha visto que estos eventos se pueden reproducir *in vitro* usando tanto fluido folicular del mismo animal (Bravo & Valdivia, 2018) como medios de cultivo sintéticos tamponados como Sperm Talp (Ruiz et al., 2017) o HAM F10 (Mamani, 2019) ambos suplementados con albúmina sérica bovina (BSA) en condiciones controladas de incubación; en reproducción asistida, es imperativo que los espermatozoides tengan un tratamiento de selección mediante centrifugación como puede ser columnas de Percoll® o *swim up*. Estas técnicas de selección espermática aprovechan la capacidad de respuesta de los espermatozoides a las moléculas capacitantes como el BSA e ionóforos del medio, aprovechando su movilidad intrínseca para separarlos mecánicamente de espermatozoides inmóviles y/o dañados físicamente, células redondas, debris, bacterias y plasma seminal si hubiese, esta fracción separada está asociada con un mejor pronóstico fecundativo (Sakkas, 2018; WHO, 2010).

## 2.6. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA

Al momento de esta redacción no existe un protocolo universal que determine con total exactitud la fertilidad de los espermatozoides en mamíferos, sin embargo, existe una relación de parámetros informativos de calidad espermática relacionados con una mayor o menor competencia funcional para la fecundación.

Experimentalmente al trabajar en reproducción asistida, se toma consenso la valoración de ciertos parámetros espermáticos informativos para valorar el potencial fecundante del macho lo que se puede denominar como “pruebas de valoración *in vitro*” que suelen ser: la movilidad, viabilidad, concentración y morfología, pruebas que están ampliamente documentadas en la literatura (Acosta et al., 2015; Carretero et al., 2012; Cheuquemán et al., 2013; Huanca Marca et al., 2020; WHO, 2010), empero obviamos el hecho de que el espermatozoide aporta el genoma haploide, los centriolos para conducir las divisiones celulares, la fosfolipasa C-zeta específica del espermatozoide, factor activador del ovocito y ácidos ribonucleicos mensajeros implicados en el desarrollo embrionario temprano (Portella-Ruiz & Gonzales, 2016), bajo la presunción de que un espermatozoide móvil y con membrana plasmática intacta debe contener una molécula de ADN normal.

Se ha demostrado que técnicas de selección espermática como el *swim up* no bastan para eliminar todas aquellas células con ADN dañado (Amiri et al., 2012; Malvezzi et al., 2014; Santiso et al., 2010; Zini et al., 2000). Diversos estudios (Aitken & Baker, 2020; Barroso et al., 2009; Castillo et al., 2018; Middelkamp et al., 2020; Souza et al., 2019) sugieren que la infertilidad idiopática, las fallas de fecundación y anomalías en la progresión del desarrollo embrionario tienen origen en la alteración de los componentes localizados en el núcleo espermático, mas estos

elementos, no suelen ser evaluados en el análisis seminal convencional (espermograma).

## **2.7. FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO**

La fragmentación de ADN espermático es aquel estado donde el ADN sufre roturas tanto de cadena simple como doble de grado variable como consecuencia factores intrínsecos (apoptosis abortiva, defectos de empaquetamiento, estrés oxidativo) (Aitken & De Iuliis, 2010; Muratori, Marchiani, et al., 2019.) y extrínsecos (cambios de temperatura, infecciones, medicamentos, etc.) (González-Marín et al., 2012) que alteran la susceptibilidad del ADN al daño por otros mecanismos, como el estrés oxidativo (Portella-Ruiz & Gonzales, 2016). Si bien el espermatozoide tiene tanto ADN nuclear como mitocondrial, solo se toma en cuenta para la evaluación el primero dado que las mitocondrias paternas no participan en el proceso de fecundación en los mamíferos (Barroso et al., 2009), sin embargo sí podrían someter al espermatozoide a niveles anormales de radicales libres de oxígeno (ROS) bajo cualquier agente estresor comprometiendo la integridad del ADN nuclear (Aitken et al., 2014; Aitken & Baker, 2020).

Aitken & Koppers (2011) postulan que una amplia variedad de factores clínicos y medioambientales actuando solos o en combinación son capaces de producir estrés oxidativo en los testículos, este estrés perjudica la espermiogénesis resultando en la producción de espermatozoides defectuosos y con cromatina escasamente protaminada, favoreciendo el incremento de radicales libres de oxígeno (ROS) atacando la cromatina y posibilitando la formación de aductos oxidados de las bases nucleotídicas del ADN que darán como resultado rupturas de cadena nucleotídica,

exponiendo al ADN cada vez más a un daño continuo mediado por ROS lo que puede desencadenar en muerte celular y alteraciones de la fertilidad.

En los últimos años la evaluación de la fragmentación de ADN espermático ha ganado importancia como biomarcador de calidad seminal y potencial predictor de fertilidad (Fernández et al., 2005; Portella-Ruiz & Gonzales, 2016). Los estudios han permitido relacionar y explicar diversas situaciones observadas en reproducción asistida asociadas al daño en el ADN espermático como microdeleciones y mutaciones *de novo* (Aitken & Baker, 2020), retrasos en el desarrollo embrionario (Casanovas et al., 2019; Esbert et al., 2018), errores en la segregación cromática y formación de embriones mosaicos (Middelkamp et al., 2020), bajas tasas de fecundación y embarazo (Gosálvez et al., 2015; Tandara et al., 2014), aneuploidías cromosómicas detectadas en abortos espontáneos (Enciso et al., 2013; Kim et al., 2010; Portella-Ruiz & Gonzales, 2016) e incremento de condiciones neurológicas (epilepsia, esquizofrenia espontánea, autismo, trastorno bipolar) (Aitken et al., 2020), situaciones que obligan tomar medidas para su pronto detección previo ciclo de fecundación *in vitro*.

## **2.7.1. FACTORES QUE INCREMENTAN EL DAÑO AL ADN ESPERMÁTICO**

### **2.7.1.1. Defectos de empaquetamiento**

El espermatozoide maduro contiene, en su composición nuclear, protaminas con abundante cantidad de residuos de arginina que permiten el “superempaquetamiento” del ADN, para reducir el acceso de moléculas pequeñas

que puedan dañarlo (Portella-Ruiz & Gonzales, 2016). En los mamíferos la cromatina está empaquetada por nucleasas endógenas (topoisomerasa II) que cortan y ligan los *nicks* liberando el estrés de torsión (Sharma & Agarwal, 2018) y facilitando el reemplazo de histonas por protaminas, evento imprescindible de la maduración espermática, durante la espermiogénesis permitiendo restaurar la integridad del ADN durante el tránsito epididimario (Andrabi, 2007).

Una escasa protaminación por la presencia de *nicks* endógenos en el ADN espermático post tránsito epididimal (González-Marín et al., 2012) o defectos en los *checkpoints* del proceso de maduración espermática (Gosálvez et al., 2015) deja sitios lábiles en la cromatina susceptibles a roturas de cadena simple o doble por moléculas con actividad enzimática ROS provenientes de procesos metabólicos alterados lo que luego se refleja en el eyaculado como espermatozoides con valores anormalmente altos de fragmentación de ADN.

#### **2.7.1.2. Estrés Oxidativo**

La membrana plasmática de los espermatozoides tiene una composición lipídica muy diversa (fosfolípidos, esteroides, ácidos grasos saturados y poliinsaturados) que los vuelve fácilmente susceptibles al daño por ROS. La generación de bajos niveles de ROS es vital para el correcto funcionamiento espermático al intervenir en la modulación de genes y proteínas relacionadas en eventos de proliferación, diferenciación y función; desbalances entre la producción de ROS y las moléculas antioxidantes seminales puede traer efectos negativos en la calidad de los espermatozoides (Andrabi, 2007; Carretero et al., 2017).

Las células espermáticas son particularmente susceptibles al estrés oxidativo durante la espermiogénesis, las células de Sertoli son las encargadas de ejercer los mecanismos de *screening* (González-Marín et al., 2012) para controlar el exceso de ROS, las cuales proveen de antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión reductasa, transferasas y peroxidasas (Sharma & Agarwal, 2018). Un ambiente donde predomine el ROS condicionará la oxidación de los grupos tiol en el ADN generando protaminaciones defectuosas en las espermátidas (versiones inmaduras de los espermatozoides), disminución en la formación de puentes disulfuro y por tanto un incorrecto “superempaquetamiento” del ADN lo que aumenta los sitios lábiles a la fragmentación del ADN mediada por ROS.

El estrés oxidativo mediado por ROS acarrea tres fenómenos observados en infertilidad: disminución de la movilidad del espermatozoide asociado a daño en membrana espermática, deterioro del ADN espermático alterando la contribución genómica paterna hacia el embrión (Vásquez, 2012) y un fenómeno recientemente observado, la dinámica de la reprogramación genética que puede afectar la contribución epigenética del genoma paterno hacia el desarrollo embrionario (Castillo et al., 2018; Wyck et al., 2018) y las tasas de embarazo (Peña, Jr et al., 2017; Sharma & Agarwal, 2018).

### **2.7.1.3. Apoptosis abortiva**

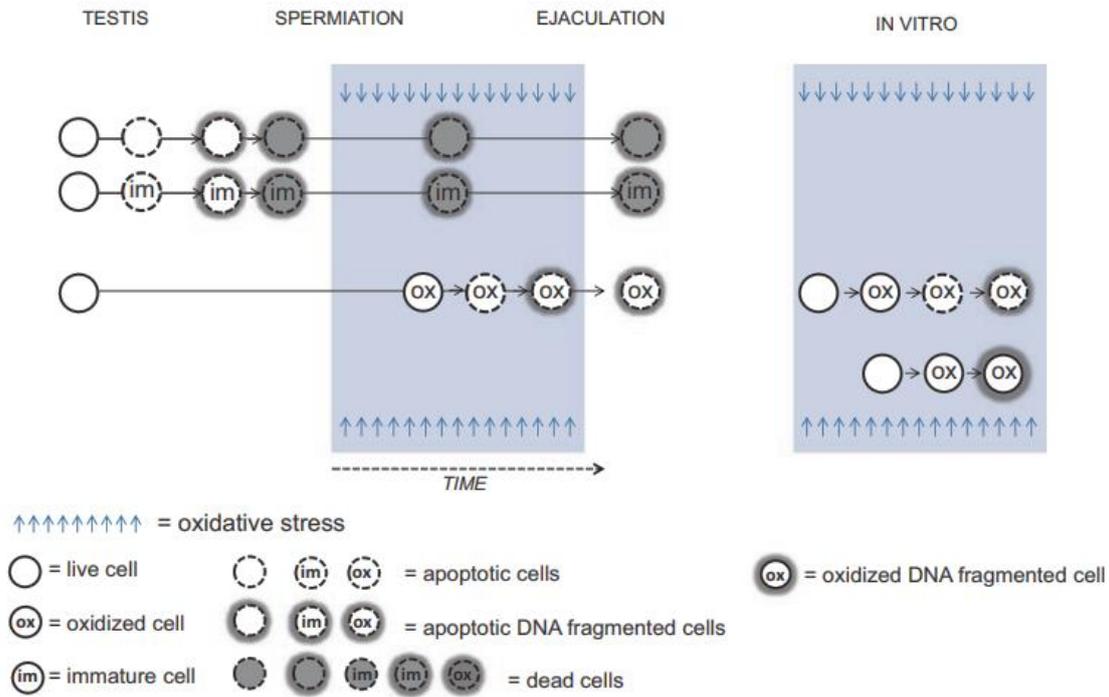
En los testículos mamíferos ocurre una expansión clonal de las células germinales, un evento bastante intenso que suele superar la capacidad de mantenimiento y *screening* de las células de Sertoli. La apoptosis que acompaña la

espermatogénesis surge como un evento de control donde aproximadamente el 75% de las espermatogonias son eliminadas por eventos de muerte celular programada evitando sobrepasar la capacidad de soporte de las células de Sertoli (Andrabi, 2007; Sharma & Agarwal, 2018).

Portella-Ruiz & Gonzales (2016) indican que la arquitectura del espermatozoide normal impide que exista translocación nuclear de nucleasas activadas y cofactores activadores de apoptosis evitando la inhibición de la vía del Inositol-3-fosfoquinasa (PI3K)- proteína quinasa B (AKT) lo que se traduce en pérdida de la movilidad, aumento del ROS mitocondrial, activación de caspasas en el citosol, externalización de fosfatidilserina, vacuolización del citoplasma y daño oxidativo del ADN.

Fallas a cualquier nivel en la eliminación de espermatozoides dañados o disfuncionales llevará a la acumulación de subpoblaciones de espermatozoides que escaparon de la muerte programada pero que externalizan ligandos Fas que al contacto con especies reactivas de oxígeno o nitrógeno reactivaran las vías intrínsecas y extrínsecas de la apoptosis desencadenando respuestas celulares letales y activando la vía de caspasas y produciendo una apoptosis tardía, la cual se asocia a los eventos de fragmentación de ADN (Andrabi, 2007; Carretero et al., 2017; Muratori, Marchiani, et al., 2019; Sharma & Agarwal, 2018).

En la figura 1 se resume esquemáticamente la manera en que a nivel celular los tres factores anteriormente descritos suelen implicarse en los mecanismos de incremento de fragmentación de ADN espermático.



**Figura 1.** Modelo esquemático del origen de la fragmentación espermática. *In vivo* la fragmentación de ADN espermático surge porque un grupo de células escapan de los procesos apoptóticos celulares. Estas células espermáticas muertas llegan al tracto genital donde el entorno oxidativo propio de las células vivas desencadena la apoptosis de las células muertas y fragmentando su ADN. Se hipotetiza *in vitro* que el fenómeno que ocurre es similar, aunque también es posible que altos niveles de oxidación rompan directamente el ADN sin la intervención de endonucleasas. Fuente: Muratori, Marchiani, et al., 2019.

## 2.7.2. TÉCNICAS PARA EVALUAR EL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO

En los años 80, Evenson et al. establecieron por primera vez una relación entre infertilidad y la fragmentación del ADN espermático mediante la aplicación de naranja de acridina (AO) y citometría de flujo, desde entonces diversas técnicas han surgido para la detección de este parámetro.

En la literatura (Andrabi, 2007; D. P. Evenson, 2016; Gosálvez et al., 2015) existen diversas técnicas para estudiar los defectos del ADN espermático conocido como fragmentación espermática, pudiendo dividirse en 2 grupos: los que incluyen metodologías de marcado sobre las hebras de ruptura simple y doble cuantificando el “daño actual” como el ensayo TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) y aquellas que cuantifican el “daño potencial”, es decir, miden la susceptibilidad del ADN a la desnaturalización como naranja de acridina (AO), ensayo de la estructura de la cromatina espermática (SCSA) y la prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD) (Carretero et al., 2017), esta última fue empleada en el desarrollo de este trabajo.

#### **2.7.2.1. Test de la Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD)**

La prueba SCD es simple, pero con un elegante concepto científico detrás que consta de tres pasos principales: (1) las células espermáticas son embebidas en una matriz inerte de agarosa, (2) seguidos de una incubación secuencial en una solución de lisis especie-específica con actividad ADN denaturante acompañada de una depleción controlada de las proteínas nucleares, y (3) tinción y visualización de baja complejidad (Fernández et al., 2011, 2018). Los espermatozoides con ADN íntegro producen halos de dispersión de cromatina (bucles de ADN hermanados a la estructura nuclear residual) a diferencia de aquellos con ADN fragmentado en donde se evidencia la formación de halos diminutos o sin halo.

Actualmente existen diversos estudios en infertilidad masculina principalmente humana donde se demuestra clara relación entre el incremento de espermatozoides con ADN fragmentado versus muestras con sospecha de infertilidad (Acosta et al.,

2015), infertilidad aparente con parámetros seminales normales (Choucair et al., 2016; Feijó & Esteves, 2014), infertilidad asociada a abortos recurrentes (Absalan et al., 2012; Kim et al., 2010), rearrreglos cromosómicos estructurales transmisibles (García-Peiró et al., 2011; Middelkamp et al., 2020), calidad embrionaria y éxito de preñez (Gosálvez et al., 2015; Tandara et al., 2014) e incremento de condiciones neurológicas en la descendencia (Aitken et al., 2020). Estudios realizados usando FIV han demostrado que los espermatozoides con ADN severamente dañado poseen capacidad fecundante y de producción de embriones sin embargo detienen su desarrollo durante la transcripción del genoma del embrión (4 – 8 células) al no poder activar y expresar correctamente el genoma paterno heredado (Barroso et al., 2009; Middelkamp et al., 2020) a la vez de repercutir negativamente en el desarrollo e implantación embrionaria (Barroso et al., 2009; Zandieh et al., 2019).

La prueba SCD ha tenido un amplio éxito en diversas especies como peces (López-Fernández et al., 2009), marsupiales (Johnston et al., 2007), humanos (Fernández et al., 2005; Fernández et al., 2003), y mamíferos diversos (Carretero et al., 2012; Cortés-Gutiérrez et al., 2009; de la Torre et al., 2007; Pawar & Kaul, 2011) teniendo resultados comparables frente a técnicas más complejas como DBD-FISH (Fernández et al., 2003), ensayo cometa (Ribas-Maynou et al., 2013), prueba de estructura de la cromatina espermática (SCSA) (Chohan, 2006) y TUNEL (Zhang et al., 2010) con el incentivo adicional de ser menos laboriosas, requerir menor instrumental y mayor procesamiento de muestras por día con un solo operador (Feijó & Esteves, 2014).

Lo anterior expuesto deja patente que los parámetros seminales estándar y la capacidad fecundante de un espermatozoide no son suficientes para asegurar la

integridad de su ADN, un factor trascendental si se plantea usar estos gametos en procesos de tecnologías reproductivas para lograr altas tasas de embriones y embarazos a término, de ahí la importancia de implementar metodologías de la detección del daño al ADN espermático como el test SCD.

## **2.8. FECUNDACIÓN IN VITRO**

La fecundación in vitro (FIV) es una es un proceso altamente complejo en el que los gametos homólogos previamente capacitados de una especie interactúan en medio de cultivo uniéndose para formar un embrión, esto es una versión sintética y dirigida de los procesos reproductivos naturales sin la interacción directa de los individuos.

La producción in vitro de embriones llevada a cabo en animales de producción tiene tres pasos importantes: una maduración *in vitro* del ovocito, la fecundación del ovocito madurado y el cultivo *in vitro* del ovocito fecundando hasta su etapa de blastocitos (Moawad et al., 2020). La literatura es amplia sobre los FIV llevados a cabo en camélidos sudamericanos usando espermatozoides epididimarios (Ayuque Araujo & Justiniano Huamancayo, 2013; Mamani, 2019; Ruiz et al., 2017) y bajo diversos medios y técnicas de cultivo (Del Campo et al., 1994; Martinez Chavez & Ramos Aponte, 2015; Moawad et al., 2020; Ruiz et al., 2017; Trasorras et al., 2013) donde son puestos a fecundar durante 18-24 horas luego del cual se comprueba la fecundación exitosa por observación directa de la extrusión del polocito o inicios del primer clivaje, tiempo del cual son cambiados a medios enriquecidos y nutricionalmente distintos.

## **2.9. CULTIVO DE EMBRIONES**

El cultivo embrionario es la fase crucial del correcto desarrollo embrionario, pues es sabido que el embrión tiene requerimientos nutricionales particulares según va progresando de estadio y la formulación de estos medios son cruciales para la producción de blastocisto de buena calidad con miras a una transferencia embrionaria. Se ha descrito que algunos componentes del medio son esenciales para mejorar la tasa de desarrollo en embriones preimplantacionales; dentro de estos se encuentra una gran variedad de suplementos tal como los aminoácidos, suero, fluido folicular, hormonas de origen diverso, ácido retinoico, cafeína L-carnitina y antioxidantes (Gadir Adam, 2016; Han & Niwa, 2003; Leisinger, 2013; Moawad et al., 2020).

En camélidos sudamericanos los protocolos de medio más usados son derivados de aquellos usados en rumiantes (Ruiz et al., 2017), siendo el medio SOFaa, KSOMaa y el CR-1 los más empleados, estos medios definidos son bastante estables en términos de osmolaridad permitiendo simplificar los sistemas de cultivo.

## **2.10. DESARROLLO EMBRIONARIO**

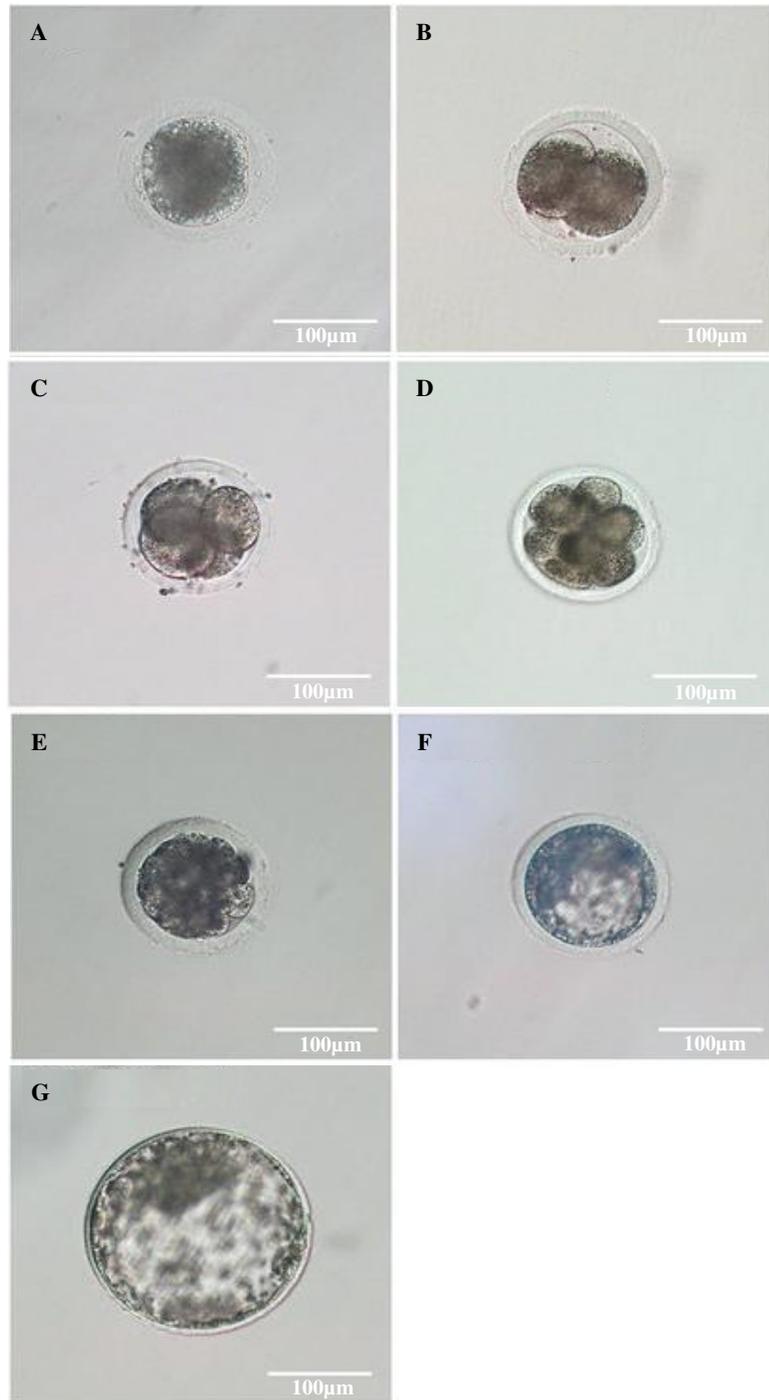
El desarrollo embrionario en mamíferos ocurre inmediatamente después de que los gametos se han fusionado para dar origen a una única célula totipotencial llamada cigoto, empieza con una reorganización de los componentes citoplasmáticos del ovocito donde determinantes citoplasmáticos actúan en la activación o inactivación de los genes y eventos controladores de los primeros clivajes, posteriormente los transcriptos maternos serán degradados y reemplazados por los del cigoto en un

cambio transitorio del control genómico materno al del embrión (Betts & Madan, 2008; Wei et al., 2017). La activación del genoma paterno puede ocurrir tempranamente en el desarrollo embrionario y parece estar mediado por factores de activación ovocitaria (Seli et al., 2004; Simões, 2010), algunos estudios llevados a cabo en bovinos (Comizzoli et al., 2000; Eid et al., 1994) demostraron que el factor paterno se manifiesta tan temprano como en la fase S del primer ciclo celular impactando en el inicio y duración del primer clivaje.

El primer clivaje se da como un “anillo” formado por actina y miosina que se extiende paralelo al eje polar del cigoto (polo animal- vegetal) y normal al eje longitudinal del huso mitótico (Georgadaki et al., 2016). El segundo clivaje se da paralelo al eje polar, para este punto el embrión paso de 2 a 4 células o blastómeros, los clivajes siguientes continuaran dividiendo al embrión en células. Después de las 8 células comienza experimentar un proceso de compactación progresiva a través de uniones estrechas (*tigh junctions*) y adherentes impidiendo la distinción de los contornos de las blastómeros e inicia la polarización embrionaria (Gardner & Balaban, 2016; Stringfellow & Sidel, 2000).

El embrión forma una cavidad en su interior, el blastocele, la cual se forma por la secreción de fluido de las células más externas hacia la mórula formando dos zonas: el trofoblasto y la masa celular (Mamani, 2019). Este estadio suele observarse en alpacas ente las 120 a 168 horas post fecundación in vitro (Pérez Durand et al., 2017).

Esta descripción anterior se ejemplifica en la figura 2, mostrando el desarrollo embrionario continuo de bovino post fecundación desde las tempranas etapas de cigoto, pasando por las primeras divisiones celulares, su posterior compactación o mórula hasta el blastocito tardío.



**Figura 2.** Imágenes microscópicas del desarrollo embrionario preimplantacional de bovinos desde cigoto (A) pasando por los estadios de 2 células (B), 4 células (C), 8 células (D), mórula (E), blastocitos temprano (F) y tardío (G). Fuente Wei et al., 2017, imagen modificada.

## 2.11. EVALUACIÓN DE EMBRIONES

La evaluación de embriones a través de la calidad es una estimación de la predicción de su sobrevivencia en el medio de cultivo, en términos generales un embrión saludable es aquel que presenta contorno regular y sin opacidades el cual es el primer signo de degeneración celular.

En este trabajo el desarrollo embrionario se llevó a cabo siguiendo la clasificación dada por Stringfellow & Sidel (2000), la que se resume de la siguiente manera:

- Grado 1 Excelente**, el embrión es casi perfecto, altamente simétrico, esférico con tamaño, color y texturas uniformes, masa celular activa y saludable sin defectos visibles, la zona pelúcida está intacta. El desarrollo embrionario correspondiente al día de su observación.
- Grado 2 Regular**, su masa celular esta activa y saludable sin embargo se detectan algunas imperfecciones, principalmente de forma (formas irregulares), algunos blastómeros se encuentran extruidos de la masa celular, puede presentarse algunas vesículas pequeñas.
- Grado 3 Malo**, su masa celular esta activa, pero el embrión presenta defectos muy definidos entre ellos detritus celulares, formas irregulares, alteraciones en el citoplasma y zona pelúcida. Hay pocas células degeneradas, blastómeros desprendidos y presencia de numerosas vesículas.

**Grado 4 Degenerado**, se incluye a los defectos del grado 3 el desarrollo retardado, ruptura de zona pelúcida, extrusión y/o desintegración con granulación y vacuolización de blastómeros. La masa celular no suele presentar signos de estar activa.

### **3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1. HIPÓTESIS**

Es posible evaluar la fragmentación de ADN espermático en alpaca mediante la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD) y usarlo como predictor de calidad espermática.

#### **3.2. OBJETIVOS**

##### **3.2.1. Objetivo General**

Determinar si el nivel de fragmentación de ADN en espermatozoides epididimarios de alpaca usando el test de dispersión de la cromatina es un predictor de calidad espermática y del desarrollo embrionario temprano.

##### **3.2.2. Objetivos Específicos**

Estandarizar el test de dispersión de la cromatina (SCD) en muestras epididimarias de alpacas para evaluar el grado de fragmentación del ADN espermático.

Identificar los patrones de dispersión de cromatina espermática propios de alpaca.

Determinar si existe correlación entre el índice de fragmentación espermática y parámetros espermáticos convencionales.

Comparar los estadios de desarrollo temprano y la fecundación con espermatozoides de índices de fragmentación de ADN espermático variable.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo se desarrolló en principalmente el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú), adicionalmente un grupo de muestras fue procesado en colaboración con el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica en el campus de la ciudad de Huancavelica.

### 4.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Se seleccionaron cuarenta y cinco pares de epidídimos provenientes de muestras testiculares de machos adultos de alpacas beneficiados en el Camal Municipal de Huancavelica (Centro poblado Callqui Chico - Huancavelica, Perú), cuyo peso testicular supere los 8 gramos como confirmatorio de adultez (Valdivia et al., 2019).

Una vez beneficiado el animal, los pares testiculares se lavaron en suero fisiológico (NaCl 0.9%) y fueron guardados individualmente y transportados en suero fisiológico 4°C con ayuda de *gelpacks* en contenedores termoaislantes.

Los ovocitos que se usaron para la fecundación in vitro (FIV), son ovocitos MII confirmados por la presencia de un único cuerpo polar, estos han sido previamente madurados dentro del marco del **proyecto FONDECYT contrato 428-2019**, estos

ovocitos proceden de ovarios colectados y transportados bajo las mismas condiciones que los testículos.

### **4.3. TRANSPORTE**

El envío de las muestras de testículos se realizó mediante servicio de transporte de carga desde la ciudad de Huancavelica hasta el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Campus Cercado de Lima, Lima - Perú) para su procesamiento 24 horas *post-mortem*

Una vez arribados a las instalaciones del laboratorio en Lima (24 horas *post mortem*), uno de los testículos fue usado para la evaluación de parámetros y análisis de fragmentación de ADN, el contralateral se guardó manteniendo la cadena de frío hasta su uso en la Fecundación In Vitro (FIV).

### **4.4. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS**

#### **4.4.1. Material para el Test de la Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD)**

##### **4.4.1.1. Medio de soporte**

Se usó láminas pretratadas con una delgada capa de agarosa de punto de fusión normal (NMP) de baja electroendosmosis al 0.65% (Cleaver Scientific, cat. CSL-

AG500) y tubos microcentrífuga que tuvieron 70µl agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 1% (Bio-Rad, cat. No. 1613111).

#### **4.4.1.2. Soluciones de trabajo**

La solución álcali denaturante se preparó disolviendo 58.44g (1M) de NaCl (Sigma-Aldrich, cat. No. S5886) y 1.2g (0.03M) de NaOH en un 1000mL de agua destilada, se ajustó el pH de la solución a 7.5.

La solución de lisis, por ser un proceso controlado de eliminación de proteínas nucleares, se usó diversas concentraciones de 1,4-Dithiothreitol (DTT) (Merck, cat. No 1.11474.0005) en la formulación (0.006M), 2.5M NaCl (Sigma-Aldrich, cat. No. S5886), 0.4M Tris (Sigma-Aldrich, cat. No. T6066), 50mM EDTA (Sigma-Aldrich, cat. No. E6758) y 1.5 mL Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, cat. No. X-100) completado con agua destilada hasta 1000mL, se ajustó el pH a 7.5.

Se usó PBS como dilutor de la muestra espermática y para los procesos de tinción, este fue formulado con 8g/L de Cloruro de Sodio (Sigma-Aldrich, cat. No. S5886), 0.2 g/L de cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, cat. No. P9333), 0.24 g/L de fosfato de potasio (Sigma-Aldrich, cat. No. P5379) y 1.62 g/L de fosfato dibásico de sodio (Sigma-Aldrich, cat. No. S5136) a pH 7.4, suplementado con 0.075 g/L de penicilina y estreptomina.

#### **4.4.1.3. Solución de tinción**

Se uso colorante Eosina-azul de metileno en solución según Wright (Sigma-Aldrich, cat. No. 101383), comúnmente llamado colorante Wright y una batería de alcohol etílico de diversos grados (50°, 70°, 100°).

#### **4.4.2. Reactivos de Tinción**

##### **4.4.2.1. Reactivo para evaluación de viabilidad celular**

Como reactivo de vitalidad se usó 50 mg de Eosina-Y en solución con 10 mL de cloruro de sodio al 0.9% (Sigma-Aldrich, cat. No. S5886).

##### **4.4.2.2. Reactivo para evaluación de integridad de membrana**

Se preparó una solución de 0.1470g de citrato de sodio y 0.2702g de fructosa disueltos en 20 mL de agua estéril, esta se alícuota en fracciones de 90 $\mu$ L y se congelan hasta su uso.

#### **4.4.3. Medios de cultivo**

##### **4.4.3.1. Medios de aislamiento**

Los espermatozoides fueron aislados en medio nutritivo mixto HAM F10 (Sigma-Aldrich, cat. No. N6635) suplementado con sales de lactato de calcio (Sigma-Aldrich, cat. No. L4388), bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich, cat. No. S5761), penicilina (Sigma-Aldrich, cat. No. P4875), estreptomycin y albumina bovina sérica fracción V (BSA) (Sigma-Aldrich, cat No. A3311).

#### **4.4.3.2. Medio de lavado y capacitación**

La capacitación espermática se llevó a cabo liberando los espermatozoides en medio Sil-Select Plus™ Washing medium (FertiPro, cat. No. WASH100G) y usando una solución stock de medio de fecundación TL (Minitube, cat. No. 19990/0030) suplementado con 0.6% de albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich, cat. No. A7030), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, cat. No. G1264) y 0.2 mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich, cat. No. P5280).

#### **4.4.3.3. Medio de fecundación in vitro**

El medio de fecundación se preparó a partir de una solución stock de medio de fecundación TL (Minitube, cat. No. 19990/0030) suplementado con 0.6% de albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich, cat. No. A7030), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, cat. No. G1264), 0.2 mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich, cat. No. P5280), 2 UI/mL de heparina (Sigma-Aldrich, cat. No. H3149), 20 µM de penicilamina (Sigma-Aldrich, cat. No. P4875), 10 µM hipotaurina (Sigma-Aldrich, cat. No. H1384) y 1 µM epinefrina (Sigma-Aldrich, cat. No. E4250) y cubierto con aceite mineral (LifeGuard Oil, cat. No. LGUA-500).

#### **4.4.3.4. Medio de cultivo de embriones**

Se utilizó medio KSOM+ aa (Merck, cat. No. MR-106-D) suplementado con 0.4% de albúmina bovina sérica libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich, cat. No.

A7030), 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, cat. No. G1264) y 2 mM de piruvato de sodio (Sigma-Aldrich, cat. No. P5280 y cubierto con aceite mineral (LifeGuard Oil, cat. No LGUA-500).

Para asegurar la esterilidad de los medios usados para los procedimientos implicados en producción de embriones, estos fueron filtrados con filtros de membrana de 0.22 µm (Millex-GV Merck).

#### **4.5. MATERIALES DE PLÁSTICO, METAL Y VIDRIO**

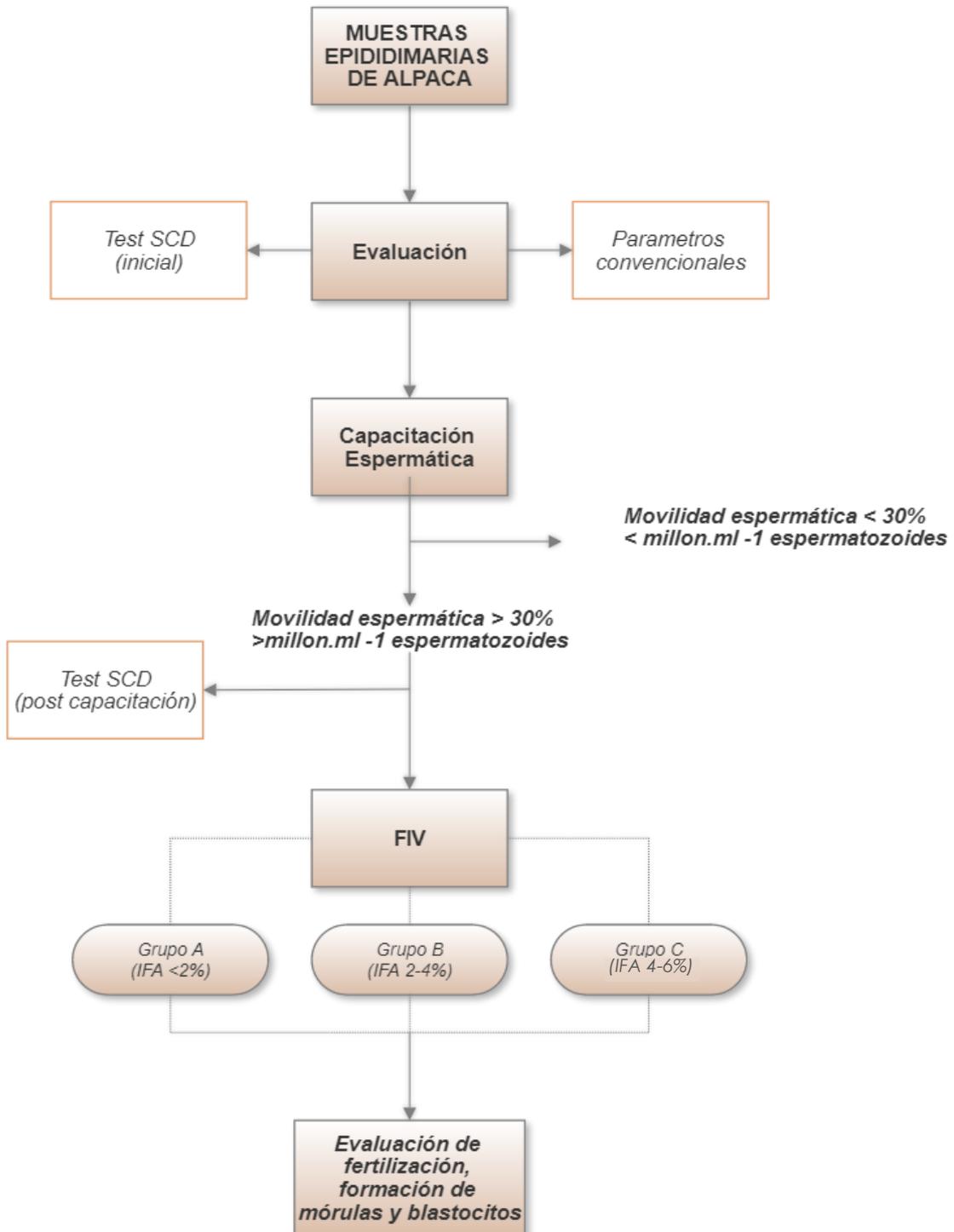
Placas de Petri, puntas para micropipeta de diferente volumen, láminas porta y cubreobjetos, tubos microcentrífuga de 1.5 mL, tubos centrífugos cónicos de 15 mL, tubos centrifuga cónicos de 50 mL, filtros de membrana de 0.22 µm (Millex-GV Merck), tijeras , pinzas de relojero, jeringas de 10mL, cámara de Neubauer (Boecco), guantes de nitrilo.

#### **4.6. EQUIPOS DE LABORATORIO**

Incubadora de CO<sub>2</sub> Thermo Scientific, cabina de flujo laminar Labconco, balanza analítica, potenciómetro digital Hanna Instruments, microscopio óptico e invertido, micropipetas de volumen variable, plancha termo controlada, refrigeradora.

#### 4.7. METODOLOGÍA

La metodología establecida de trabajo se resume en el flujograma presentado a continuación Figura 3, explicando en las líneas siguiente uno a uno los protocolos de este estudio.



**Figura 3.** Flujograma del trabajo experimental.

#### **4.7.1. Método de Recuperación de Espermatozoides Epididimarios**

Se retiró la túnica albugínea de uno de los pares de testículos por cada individuo, exponiendo el epidídimo, donde se seccionó la cola epididimaria, colocándola en placas Petri para un trozado fino en 500  $\mu$ l de medio de aislamiento temperado y estabilizado (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) para favorecer la salida de los espermatozoides según lo descrito por Bravo & Valdivia (2018).

Se obtuvo una “suspensión espermática” que fue utilizada en las evaluaciones siguientes, la suspensión deberá permanecer temperada y estabilizada en todo momento de la evaluación.

#### **4.7.2. Método de Evaluación de Parámetros Espermáticos**

##### **4.7.2.1. Movilidad Espermática**

Se colocó una alícuota de 10  $\mu$ L de la suspensión espermática sobre una lámina portaobjetos y se cubrió con una laminilla cubreobjetos, ambas temperadas previamente a 37°C, observándose directamente al microscopio de campo claro a 400X según lo descrito por Vásquez, González & Pino (2012). La movilidad se clasificó como progresiva (desplazamiento rectilíneo o circular grande), no progresivo (movimientos de cola sin desplazamiento) e inmóviles (WHO, 2010).

Adicionalmente las muestras se clasificaron según su movilidad progresiva siguiendo el criterio de Valdivia et al. (2019) para espermatozoides epididimarios

(ESPM) para la parte del análisis estadístico como un punto adicional de correlación, siendo este:

ESPM > 30% = muestras de buena calidad (BUENA)

ESPM =20-29% = muestras de calidad regular (REGULAR)

ESPM < 20% = muestras de mala calidad (MALA)

#### **4.7.2.2. Viabilidad Espermática**

Se diluyó la suspensión espermática con Eosina-Y al 0.5% en suero fisiológico a 37°C en proporción 1:1, observándose a 400x en el microscopio tomando en consideración como espermatozoides muertos a los que se tiñen de rosa en su totalidad y vivos aquellos que no están coloreados (WHO, 2010).

#### **4.7.2.3. Ensayo de Integridad de Funcional de Membrana Espermática (HOS)**

Se incubó 10 µL de suspensión espermática en 90 µL de solución hiposmótica previamente temperada a 37°C, se homogeneizaron y se dejó incubar a esa temperatura por espacio de 40 minutos, tiempo después fue analizado al microscopio de campo claro contando 200 espermatozoides tomándose como positivos al test de endosmosis los espermatozoides que presentaron las colas hinchadas o enrolladas lo cual indicó que la membrana plasmática se encontraba funcionalmente activa (Vásquez et al., 2012).

#### **4.7.2.4. Concentración Espermática**

Se usó la cámara Neubauer mejorada usando ambos pocillos bajo el microscopio, siguiendo la metodología de recuento descrita por la WHO (2010); el recuento se hizo fila por fila hasta obtener 200 espermatozoides, una vez contado 200 espermatozoides se acabará de contar todos los espermatozoides de dicha fila.

#### **4.7.3. Test de la Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD)**

El protocolo de partida fue el propuesto por Pratap et al. (2017) con algunas modificaciones. Las suspensiones espermáticas se diluyeron en medio de cultivo hasta una concentración de  $10-15 \times 10^6$  espermatozoides/mL, luego una fracción de esta se mezcló a 37°C con agarosa LMP al 1% (hasta obtener una concentración final de 0.7%) y se incluyó en el portaobjeto pretratado con agarosa NMP y cubriendo inmediatamente con un cubreobjetos. Se dejó solidificar a 4°C durante 10 minutos, pasado este tiempo se retira el cubreobjeto.

El portaobjetos se incubó en inmersión en solución álcali denaturante por 8 minutos a 4°C. A continuación, se le introdujo en solución de lisis por 8 minutos a temperatura ambiente. Las láminas tratadas fueron fijadas y deshidratadas en un batería de alcohol (50%, 70% y 100%) y se dejó secar al aire. La tinción se efectuó con Wright visualizándose al microscopio de campo claro a 400 aumentos.

Como control negativo (relajación y visualización de halos de cromatina) de la técnica se realizaron todos los pasos descritos anteriormente, sin usar la solución álcali denaturante, como control positivo de la técnica (espermatozoides sin halos de cromatina) se expusieron las suspensiones espermáticas a radiación electromagnética con un foco UV de 15 watts (Sylvania G15W) por 40 minutos y reposo post irradiación de 30 minutos, procesándose luego con normalidad. Se considera como un buen tiempo aquel que permita obtener al menos más del 85% de las muestras fragmentadas post exposición (Huanca Marca, 2016). Los ensayos se hicieron por duplicado.

La evaluación se hizo con al menos 200 imágenes de espermatozoides por muestra como mínimo, donde cada espermatozoide evaluado tuvo un *core* o nucleoide (núcleo residual), la zona del halo y el flagelo. Se excluyó del análisis los espermatozoides entrecruzados y/o incompletos. Las mediciones fueron ejecutadas en un software de captura y procesamiento de imagen (*Euromex ImageFocusAlpha ver.x64, 1.3.7.13814.20190120*), estableciéndose 4 categorías de evaluación:

Halo grande: la medición del halo es mayor al diámetro mayor del nucleoide.

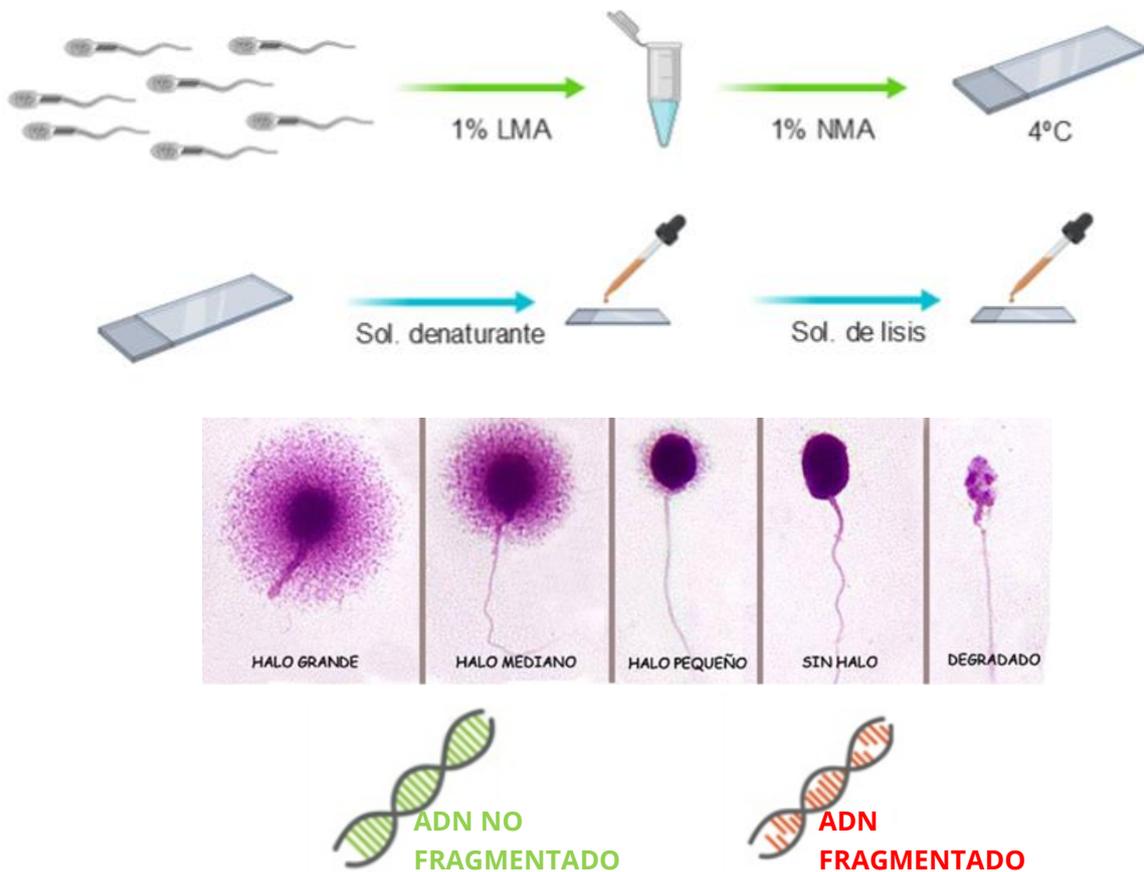
Halo medio: la medición del halo es igual al diámetro mayor del nucleoide

Halo pequeño: la medición del halo es menor al diámetro mayor del nucleoide.

Sin halo: ausencia de halo.

Se consideró como espermatozoides con daño de ADN o “fragmentados” a todos aquellos que tuviesen un halo pequeño o sin halo y “no fragmentados” aquellos con halo medio o grande, y se expresó como un índice de fragmentación de ADN espermático (IFA).

$$IFA = 100 \times \frac{\text{número de espermatozoides con daño de ADN}}{\text{número de espermatozoides contados}}$$



**Figura 4.** Resumen de la metodología de preparación de la técnica de SCD empleada.

#### 4.7.4. Selección y capacitación espermática por *Swim up*

Los testículos se temperaron gradualmente al ambiente, cortando hasta exponer el epidídimo; procesando de manera similar a lo descrito línea arriba, pero liberando

los espermatozoides en medio de lavado y luego se dejó temperar la muestra a 37°C por 10 minutos y se evaluó la presencia de movilidad alguna.

Se realizó una capacitación *swim up* a estas muestras, lavándose estas a 1600RPM por 8 minutos, recuperando el pellet sin desestabilizarlo y depositándolo en el fondo de un tubo microcentrífuga que tenía un volumen de 200µl de medio de capacitación previamente temperado y estabilizado en incubadora de CO<sub>2</sub> (38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% de humedad relativa), se dejó migrar los espermatozoides en un plano inclinado en incubadora de CO<sub>2</sub> por espacio de 1 hora.

Se recuperó un volumen entre 100 a 150µl de sobrenadante, y se evaluó la movilidad. Las muestras post *swim up* con movilidad suficiente (movilidad total mayor a 30%) y concentración mayor al millón.mL<sup>-1</sup> fueron destinadas para su uso en FIV, el resto se descartó.

#### **4.7.5. Fecundación in vitro y Evaluación del Desarrollo Embrionario In vitro**

La fecundación se llevó a cabo empleando 111 ovocitos MII y 9 muestras espermáticas con IFA variable, agrupándolos para su análisis en función al valor del IFA: Grupo A (IFA<2%), B (IFA 2-4%) y C (IFA4-6%). Se emplearon gotas de 50µL de medio de fecundación que contenían alrededor de 10 ovocitos madurados de alpaca (24h pre maduración y 38h de maduración final) por gota y se coincubó junto a los espermatozoides a una concentración final de 1-2 millones.mL<sup>-1</sup> en placas de cultivo de 35x 10mm, cubriendo con aceite mineral y se dejó a condiciones de incubación (38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% de humedad relativa) por un espacio de 20 horas.

Al día siguiente, 20 h post fecundación, se determinó la fecundación por la extrusión del segundo cuerpo polar u observación del primer clivaje, separando y pasándolos a medio de desarrollo a condiciones de incubación.

Se estableció para la evaluación morfológica del desarrollo 3 puntos de observación, tomándolo como referencia el desarrollo embrionario de bovino (figura 2):

**20h post fecundación:** evaluación de fecundación a través de la observación de la extrusión del segundo cuerpo polar u observación del primer clivaje.

**72-96h post fecundación:** evaluación y gradación de mórulas siguiendo el criterio de (Stringfellow & Sidel, 2000).

**120-168h post fecundación:** evaluación y gradación de blástulas siguiendo el criterio de (Stringfellow & Sidel, 2000).

#### **4.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software SPSS para Windows (IBM® *SPSS Statistics Ver. 23*), estableciéndose el nivel de significancia estadística para todas las pruebas del 5%.

Los datos se evaluaron con la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si seguían distribución normal. Debido a la naturaleza de los datos se optó por usar pruebas estadísticas no paramétricas. Se empleo correlación de Spearman y la prueba de U-Mann Whitney para demostrar asociación entre la variable de estudio y los parámetros espermáticos convencionales. Se usó la prueba de Chi-cuadrado como estadígrafo de

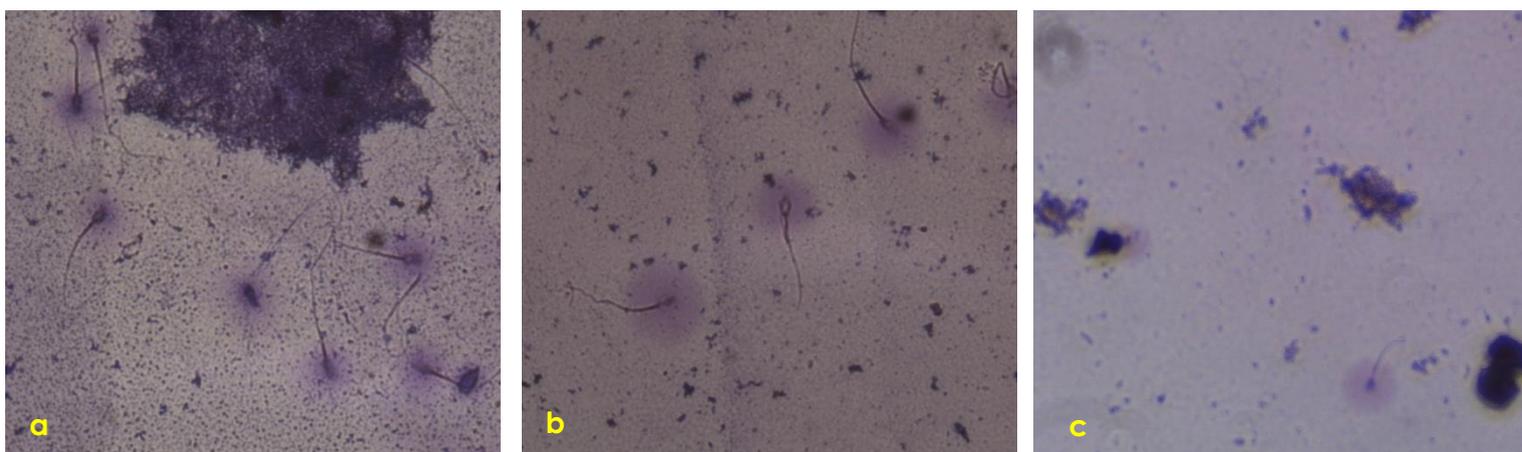
relacionamiento entre los grupos espermáticos usados en el FIV y la asociación con los estadios de desarrollo observado, ambos eran variables cualitativas.

## 5. RESULTADOS

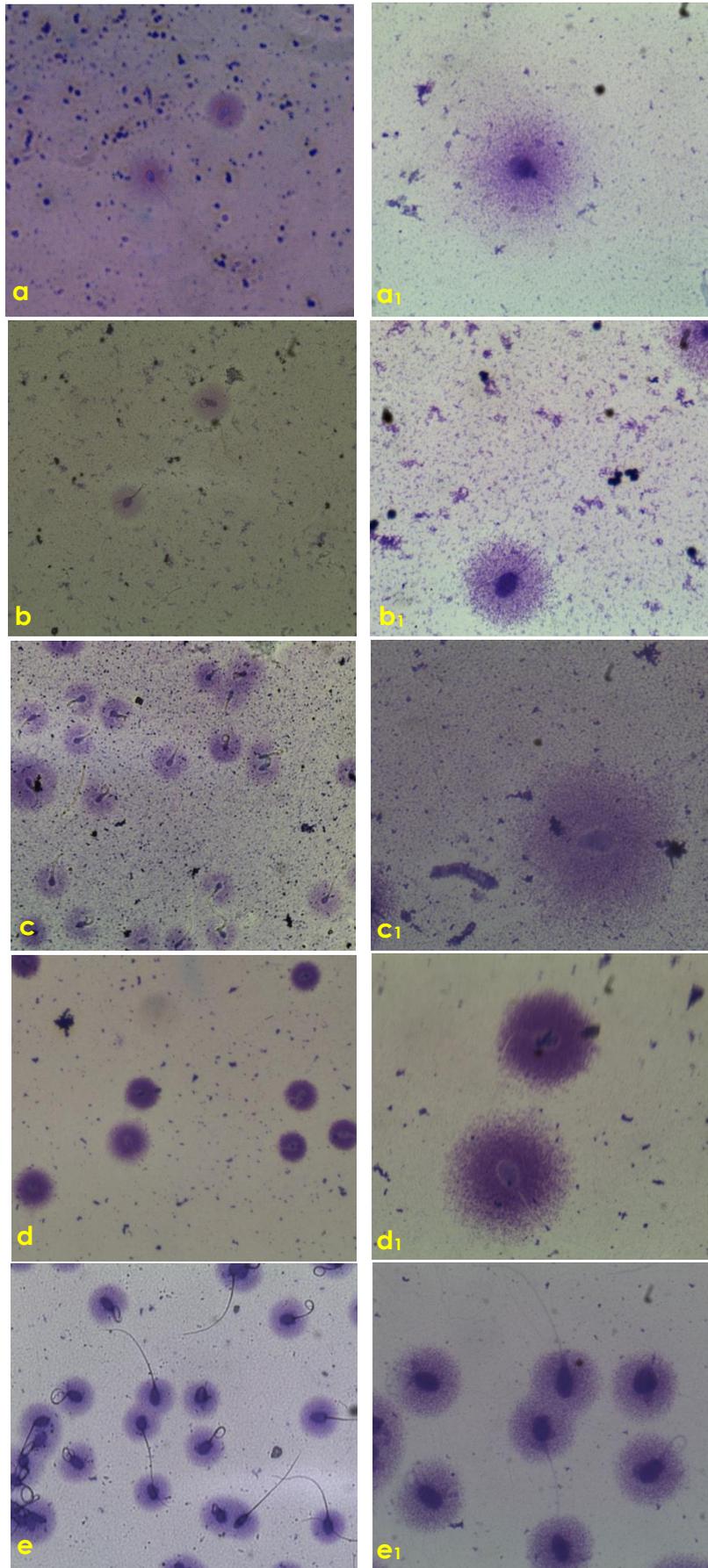
### 5.1. ESTANDARIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

En este trabajo extrapolamos y modificamos la técnica establecida para humanos por (Pratap et al., 2017) para su uso en alpaca, por lo cual se requirió estandarización de la metodología (correcta formulación y tiempo de exposición a las soluciones químicas) buscando obtener una lisis de proteínas nucleares controlada que permita obtener unos halos de cromatina uniformes sin distorsionar la información.

Se disminuyó sistemáticamente el tiempo de exposición de las muestras espermáticas embebidas en las láminas de agarosa variando en primer momento la solución denaturante y posteriormente la solución de lisis hasta obtener el tiempo de 8 minutos en cada una, estableciéndose estos tiempos como los mínimos requeridos para la observación de un halo uniforme claramente visible sin perder las estructuras del espermatozoide en cada una de las soluciones de trabajo (Figura 5 y 6) .



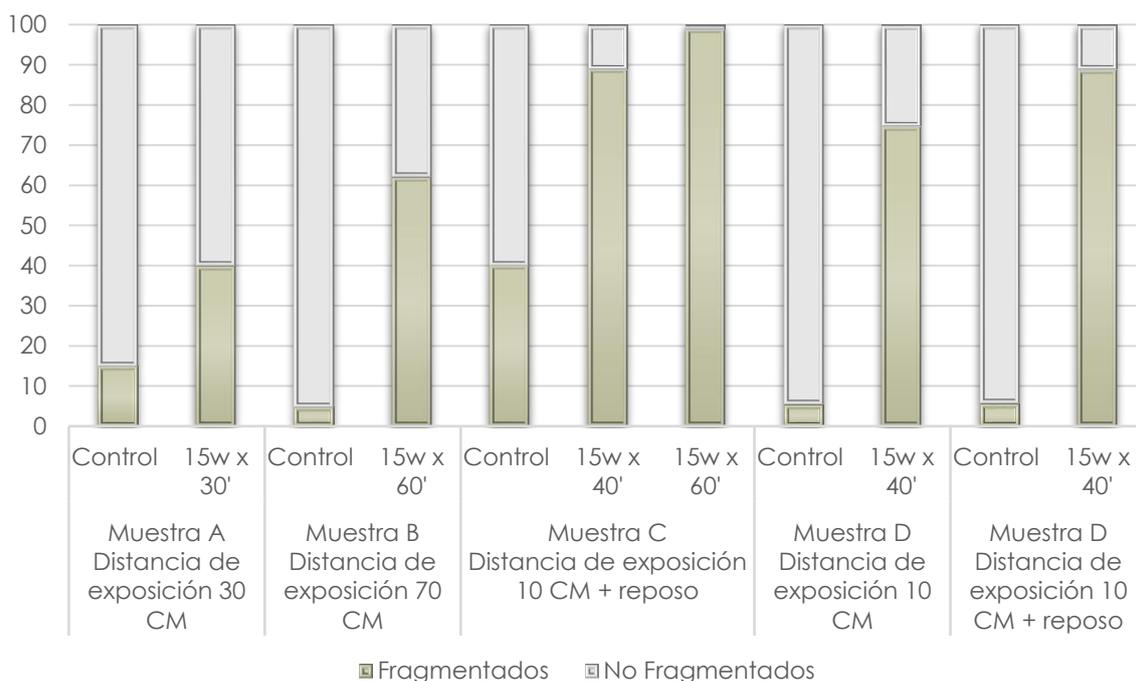
**Figura 5.** Estandarización del tiempo de solución denaturante. El tiempo de lisis fue fijo, siendo variables el tiempo de denaturación en 12 minutos (a), 10 minutos (b) y 8 minutos (c). Fotografías a 400 aumentos (a y b) y 200 aumentos (c).



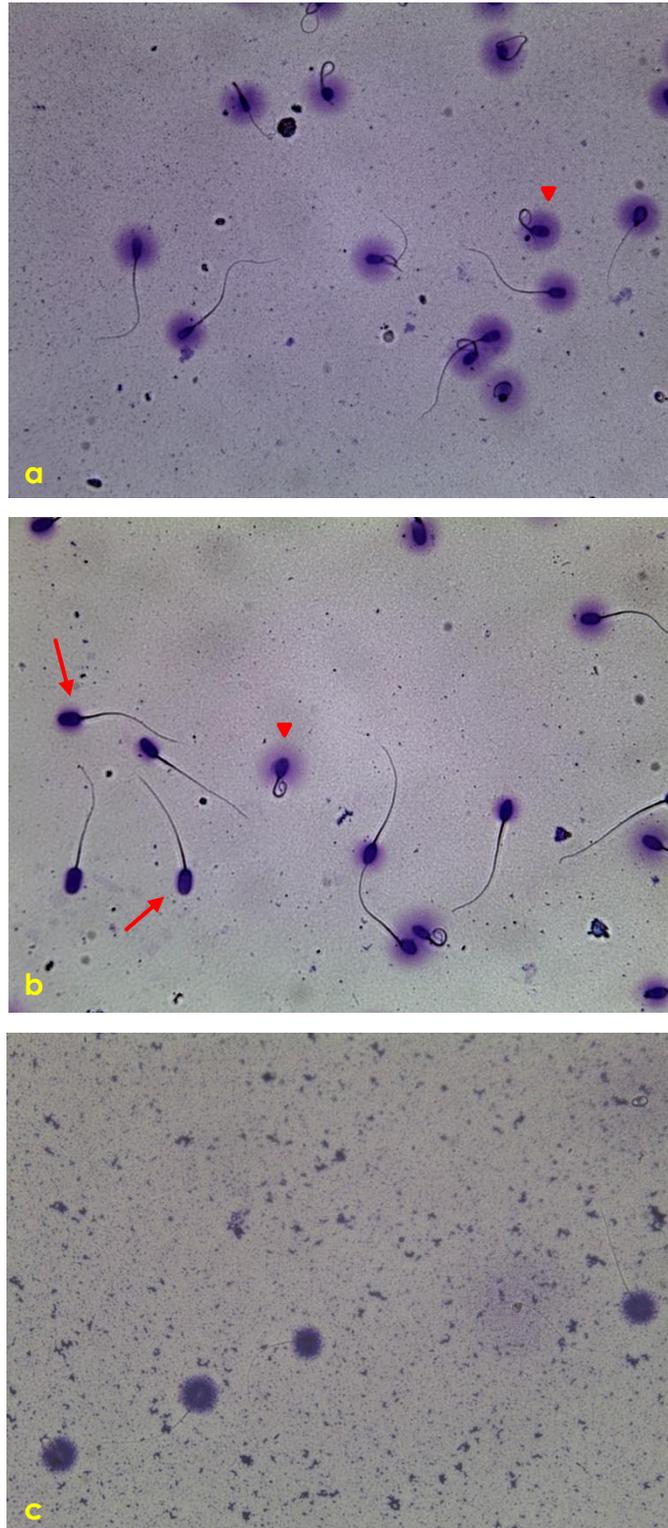
**Figura 6.** Estandarización del tiempo de solución lisis. Izquierda, corresponden a distintos tiempos de exposición a la solución, derecha corresponde a la misma lámina, pero mostrando espermatozoides a objetivo de inmersión. El tiempo de denaturación fue fijo de 8 minutos, siendo variables el tiempo de lisis en 18 minutos (**a**), 15 minutos (**b**), 12 minutos (**c**), 10 minutos (**d**) y 8 minutos (**e**). Fotografías tomadas a 200x (a-d), 400x (e) y 1000x (a<sub>1</sub>-e<sub>1</sub>).

## 5.2. EVALUACIÓN DE CONTROLES

Se usaron cuatro muestras para el control positivo y una para control negativo, se determinó que con una potencia de 15W por 40 minutos y un tiempo de reposo post irradiación de 30 minutos a una distancia de 10 centímetros es suficiente para obtener resultados. El control negativo se trabajó con el protocolo establecido en la metodología lo que resulto en una relajación parcial de la cromatina. El control positivo y el negativo se pueden evidenciar en la Figura 7 y 8 respectivamente.



**Figura 7.** Resultados del control positivo mediante la exposición a UV con tiempos, distancias y potencias variables.



**Figura 8.** Establecimiento de los controles. Fotografías a 400 aumentos de la muestra D. En **a** muestra sin exposición a UV; en **b** el control positivo (muestras expuestas a UV), nótese los diferentes tamaños de halo de cromatina (flecha) reflejo de grados de fragmentación diversos respecto a un espermatozoide no fragmentado (cabeza de flecha), en **c** el control negativo.

### 5.3. PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

Cuarenta y cinco pares de epidídimos de alpaca *post mortem* fueron usados como muestras en este estudio donde se evaluaron sus parámetros espermáticos convencionales y el índice de fragmentación de ADN espermático (IFA), estos datos se muestran en la Tabla 1.

Adicionalmente, a la data en bruto se le añadió una variable de “transporte de muestra” que está en función del tiempo transcurrido hasta su evaluación en laboratorio: cuarenta muestras de espermatozoides epididimarios de alpacas con 24 horas *post mortem* (muestra transportada), evaluadas en Lima, y cinco de 1 hora *post mortem* que se considera como muestra de evaluación en fresco (muestra no transportada) en la ciudad de Huancavelica, en las instalaciones del laboratorio Biotecnología Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica, esto último buscó determinar si la logística de transporte era la correcta y no estuviese alterando los valores basales de IFA connaturales a la alpaca.

<b>CALIDAD DE LA MUESTRA</b>	<b>TRANSPORTE DE LA MUESTRA</b>	<b>MUESTRA</b>	<b>MOVILIDAD PROGRESIVA (%)</b>	<b>MOVILIDAD NO PROGRESIVA (%)</b>	<b>INMÓVILES (%)</b>	<b>VIABILIDAD (%)</b>	<b>TEST DE HOS (%)</b>	<b>CONCENTRACIÓN (millones.mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>IFA (%)</b>
BUENA	Transportada	#1	30.5	15.5	54.0	60.0	52.0	200	3.2
MALA	Transportada	#2	0.0	0.4	99.6	60.0	65.0	31	11.2
MALA	Transportada	#3	0.2	1.0	98.8	28.0	60.0	119	1.8
REGULAR	Transportada	#4	23.6	30.0	46.4	72.0	79.0	135	88.1
BUENA	Transportada	#5	32.0	11.0	57.0	51.0	60.3	23	1.4
BUENA	Transportada	#6	41.0	30.0	29.0	78.0	-	39	13.9
MALA	Transportada	#7	15.2	13.6	71.2	41.0	53.0	7	100
MALA	Transportada	#8	11.5	17.0	71.5	69.6	61.0	182	2.0
REGULAR	Transportada	#9	22.1	24.2	53.7	68.0	57.0	207	0.6
BUENA	Transportada	#10	45.0	32.7	22.3	74.1	66.2	124	2.3
BUENA	Transportada	#11	34.1	31.8	34.1	74.0	67.8	66	4.8
MALA	Transportada	#12	18.1	23.7	58.2	61.0	41.0	885	40.1
REGULAR	Transportada	#13	21.7	21.8	56.5	67.0	52.0	24	3.5
REGULAR	Transportada	#14	27.0	24.3	48.7	68.0	58.0	137	0.5
MALA	Transportada	#15	2.9	23.2	73.9	55.0	50.0	76	3.8
MALA	Transportada	#16	2.6	30.8	66.6	60.0	57.0	11	3.4
BUENA	Transportada	#17	35.0	40.0	25.0	79.0	-	155	40.6
MALA	Transportada	#18	8.2	16.7	75.1	34.2	50.8	193	5.3
MALA	Transportada	#19	4.1	19.8	76.1	76.0	64.1	2	100
MALA	Transportada	#20	1.3	15.4	83.3	55.9	72.2	1	100
MALA	Transportada	#21	19.4	20.0	60.6	77.6	68.0	85	1.4
MALA	Transportada	#22	8.1	11.3	80.6	61.5	-	0.25	100
MALA	Transportada	#23	0.0	0.0	100.0	62.0	55.0	1.6	56.5

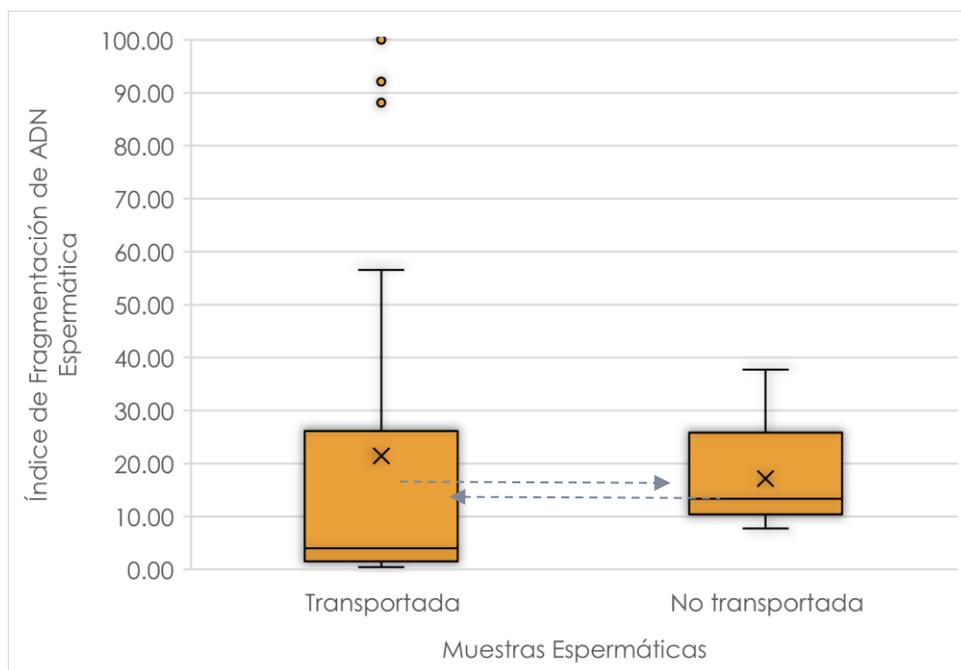
MALA	Transportada	#24	0.0	0.0	100.0	15.4	21.1	1.2	92.1
BUENA	Transportada	#25	30.1	17.6	52.3	72.2	77.0	248	8.0
REGULAR	Transportada	#26	29.8	24.8	45.4	81.8	79.9	121	30.2
REGULAR	Transportada	#27	29.8	28.1	42.1	72.0	63.9	381	4.5
BUENA	Transportada	#28	50.9	27.6	21.5	79.1	-	71	5.5
MALA	No transportada	#29	12.1	23.4	64.5	43.7	43.1	24	7.8
BUENA	No transportada	#30	42.9	28.3	28.8	84.5	72.6	205	13.0
MALA	No transportada	#31	14.9	22.8	62.3	46.4	46.3	61	37.7
REGULAR	No transportada	#32	22.8	24.2	53.0	61.2	57.0	64	13.4
REGULAR	No transportada	#33	28.7	23.7	47.5	70.3	67.8	234	14.0
BUENA	Transportada	#34	33.9	23.5	42.6	82.7	-	200	0.7
BUENA	Transportada	#35	41.2	25.7	33.1	74.4	-	230	0.5
REGULAR	Transportada	#36	28.7	21.0	50.3	83.0	-	98	4.2
BUENA	Transportada	#37	44.1	23.5	32.4	-	76.7	140	0.9
REGULAR	Transportada	#38	28.6	25.0	46.4	-	86.7	126	1.0
BUENA	Transportada	#39	52.2	18.7	29.1	-	66.8	391	1.3
MALA	Transportada	#40	2.2	6.5	91.3	-	-	60	11.4
BUENA	Transportada	#41	32.9	23.7	43.5	-	-	243	3.0
BUENA	Transportada	#42	37.4	26.7	35.8	55.8	81.6	194	2.9
BUENA	Transportada	#43	40.7	25.0	34.3	62.1	73.0	310	0.8
REGULAR	Transportada	#44	24.5	27.4	48.1	79.5	86.9	78	2.1
MALA	Transportada	#45	6.8	15.5	77.7	84.4	87.0	85	4.7

**Tabla1. Evaluación de los parámetros espermáticos de las muestras espermáticas evaluadas en este estudio.**

## 5.4. PRUEBAS ESTADÍSTICAS

### 5.4.1. Factor transporte

Buscando determinar si los IFA observados en laboratorio eran connaturales a los animales y no una alteración externa producida por las condiciones de transporte se procesó algunas muestras en la ciudad de Huancavelica y se contrastó estos datos con lo observado en Lima. Los estadísticos descriptivos y el análisis relacional no paramétrico se pueden evidenciar en el anexo N°1 y 2.



**Figura 9.** Diagrama de caja y bigotes de la distribución de los índices de fragmentación del ADN (IFA) según la variable de agrupación “transporte de la muestra”. Las flechas punteadas son las proyecciones de la media sobre la caja contigua.

Al segmentarse la data por la variable de agrupación “transporte de muestra”, la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney demostró que no existe la suficiente robustez estadística para considerar que los índices de fragmentación de ADN

espermático (IFA) en ambos grupos son distintos estadísticamente ( $p$ -valor= 0.11  $U= 55$ ). De la figura 9 de cajas y bigotes podemos llegar también a esta conclusión al proyectar los valores de la media sobre la caja contigua notando que estos caen dentro del 50 % de los datos evaluados.

Como la variable “transporte de la muestra” no es un factor que potencialmente haya incrementado los valores de IFA, se tomó los datos como una unidad para su análisis.

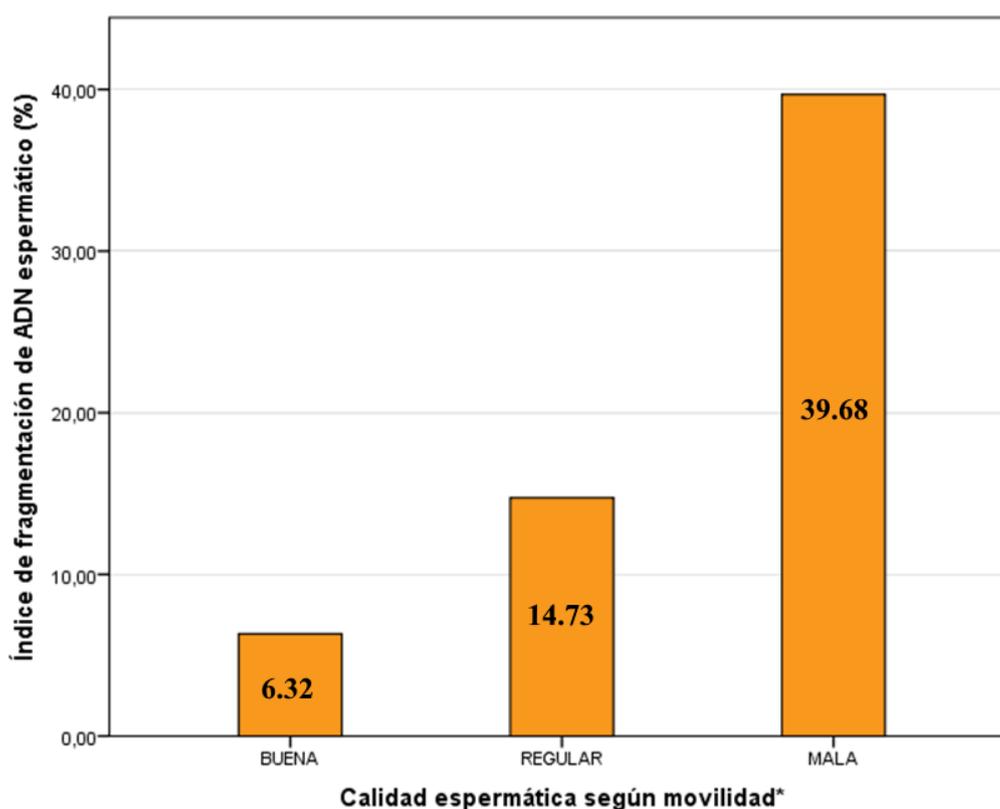
#### **5.4.2. De los parámetros espermáticos y el índice de fragmentación espermática (IFA)**

Los parámetros espermáticos y el IFA fueron sometidos a la prueba de Shapiro-Wilk para determinar si estos se distribuyen de manera normal, esta información se presenta junto con algunos estadísticos descriptivos (media, error estándar, desviación estándar y varianza) en el anexo N°3.

Los resultados mostraron que los datos analizados no siguen en su totalidad una distribución normal salvo en lo que refiere a movilidad progresiva, inmovilidad, test de HOS, por tanto, los análisis de asociaciones entre estas variables fueron evaluadas mediante contraste de hipótesis con test no paramétrico.

Mediante el estadígrafo de Spearman (ver anexo N°4) se observó que existe asociación estadísticamente significativa entre el índice de fragmentación de ADN (IFA) y las variables de inmovilidad ( $\text{sig.} = 0.02$ ;  $\text{Rho} = 0.34$ ), movilidad progresiva ( $\text{sig.} = 0.01$ ;  $\text{Rho} = -0.40$ ), y concentración espermática ( $\text{sig.} = 0.00$ ;  $\text{Rho} = -0.47$ ), siendo una correlación positiva baja para la primera variable y una correlación negativa moderada para las otras dos.

Si segmentamos la data en base a la calidad espermática (movilidad) según (Valdivia et al., 2019) y corremos el estadígrafo no paramétrico de Kruskal Wallis se demuestra con una probabilidad de error del 2% (p-valor= 0.02  $X^2= 8.00$ ) que el índice de fragmentación de ADN del espermatozoide es estadísticamente diferente según su movilidad (ver anexo N°4), esta información puede verse en la figura 10.



**Figura 10.** Gráfico de distribución de las medias aritméticas del IFA respecto a su la movilidad progresiva clasificadas según criterio Valdivia et al., 2019. buena = mp>30%, regular= 29%>mp>20%, mala<19% mp= movilidad progresiva

#### 5.4.3. Evaluación cualitativa de los patrones de SCD

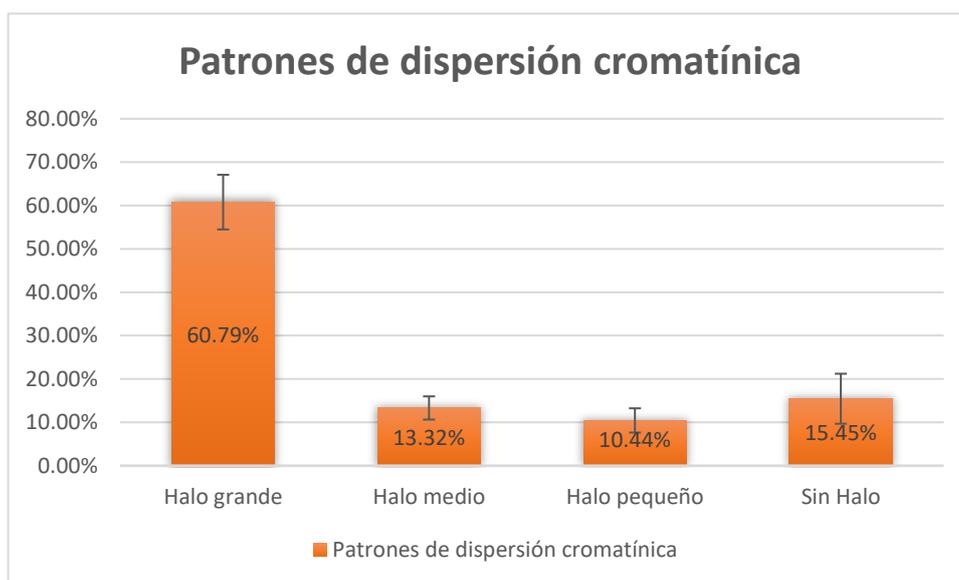
Tomando en cuenta la clasificación dada por Fernández et al. (2005), se elaboró la tabla 2 donde se clasificaron los halos de dispersión cromatínica en 4 patrones

expresando estos resultados en porcentajes, sus estadísticos descriptivos se muestran en el anexo N°6.

Muestra	Halo Grande (%)	Halo Medio (%)	Halo Pequeño (%)	Sin Halo (%)	IFA (%)
#1	64.52	32.26	2.15	1.08	3.23
#2	82.44	6.34	6.83	4.39	11.22
#3	95.81	2.40	0.00	1.80	1.80
#4	11.18	0.70	3.68	84.44	88.12
#5	95.37	3.23	1.40	0.00	1.40
#6	72.18	13.91	9.76	4.14	13.91
#7	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00
#8	90.56	7.44	1.50	0.50	2.00
#9	97.45	1.97	0.57	0.00	0.57
#10	93.35	4.34	2.02	0.29	2.31
#11	89.69	5.50	4.12	0.69	4.81
#12	39.26	20.66	37.19	2.89	40.08
#13	94.59	1.94	3.47	0.00	3.47
#14	99.55	0.00	0.45	0.00	0.45
#15	92.37	3.79	2.82	1.02	3.84
#16	91.66	4.89	2.01	1.44	3.45
#17	35.61	23.81	33.53	7.05	40.58
#18	90.42	4.31	5.27	0.00	5.27
#19	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00
#21	92.52	6.06	1.18	0.24	1.42
#22	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00
#24	20.22	23.24	42.95	13.59	56.54
#24	0.93	6.94	67.13	25.00	92.13
#26	62.77	7.01	13.52	16.70	30.22
#27	77.20	18.26	4.54	0.00	4.54
#28	73.81	20.70	4.93	0.55	5.48
#29	76.60	15.64	7.76	0.00	7.76
#30	46.75	40.26	11.32	1.67	12.99
#31	25.98	36.27	28.92	8.82	37.75
#32	34.45	52.19	11.50	1.86	13.36
#33	37.21	48.84	13.18	0.78	13.95

**Tabla 2.** Distribución de los patrones de halos de dispersión de la cromatina observados en las muestras epididimarias de alpaca. En la última columna de esta tabla se muestra el índice de fragmentación espermática (% halo pequeño + % sin halo) para cada muestra.

La media de los porcentajes de los patrones de SCD que se obtuvieron fue de  $60.79 \pm 35.05\%$  (halo grande),  $13.22 \pm 14.92\%$  (halo medio),  $10.44 \pm 15.57\%$  (halo pequeño) y  $15.45 \pm 32.15\%$  (sin halo), es decir más del 70% de espermatozoides analizados en este estudio presentan halos de dispersión grande y media lo que se traduce en espermatozoides no fragmentados.



**Figura 11.** Composición de las muestras espermáticas basados en los patrones de dispersión de la cromatina espermática (SCD). El grafico muestra solo el valor de las medias  $\pm$  SEM.

#### 5.4.4. Evaluación del Índice del Fragmentación de ADN en muestras espermáticas seleccionadas por *swim up* destinadas a Fecundación in vitro

En la tabla 3 mostramos los índices de fragmentación de ADN espermático inicial y post capacitación *swim up* en espermatozoides epididimarios, los estadísticos descriptivos se muestran en el anexo 8 donde se encontró que la media y la

desviación estándar para ambos grupos son numéricamente contrastables (IFA inicial= 12.04±21.57%; IFA post swim up= 6.78±6.77%) lo que sugirió una tendencia a la reducción de la fragmentación espermática asociado a la selección espermática. La prueba de rangos con signo de Wilcoxon desestimó esta suposición (n=17; Z= -.497; Sig.= .619), encontrando que no existe evidencia estadística suficiente que indique diferencias mediadas por la selección espermática. Cabe resaltar que no todas las muestras capacitadas fueron usadas en fecundación in vitro.

IFA (%)	
Inicial	Post swim up
88.12	14.21
3.47	1.95
0.45	5.21
4.54	4.81
5.48	3.00
7.76	11.56
12.99	3.87
37.75	25.41
13.36	18.42
13.95	5.81
0.67	1.89
4.18	2.38
0.89	2.29
1.33	1.61
2.97	3.45
2.14	2.50
4.65	6.86

**Tabla 3.** Datos de fragmentación espermática inicial y post capacitación *swim up* dentro de una misma muestra.

#### 5.4.5. Evaluación de la Fecundación In vitro

Se logró realizar 4 ensayos de Fecundación *in vitro* (FIV), empleándose 111 ovocitos madurados *in vitro* que fueron distribuidos y fecundados aleatoriamente con muestras espermáticas previamente capacitadas por *swim up*, clasificando los grupos de desarrollo según el grado de fragmentación de ADN: Grupo A (IFA < 2%), B (IFA 2-4%) y C (IFA 4-6%). La evaluación del desarrollo embrionario preimplantacional se realizó a las 20, 72-96 y 120-168 horas post fecundación. Esta data se resume en la tabla 4.

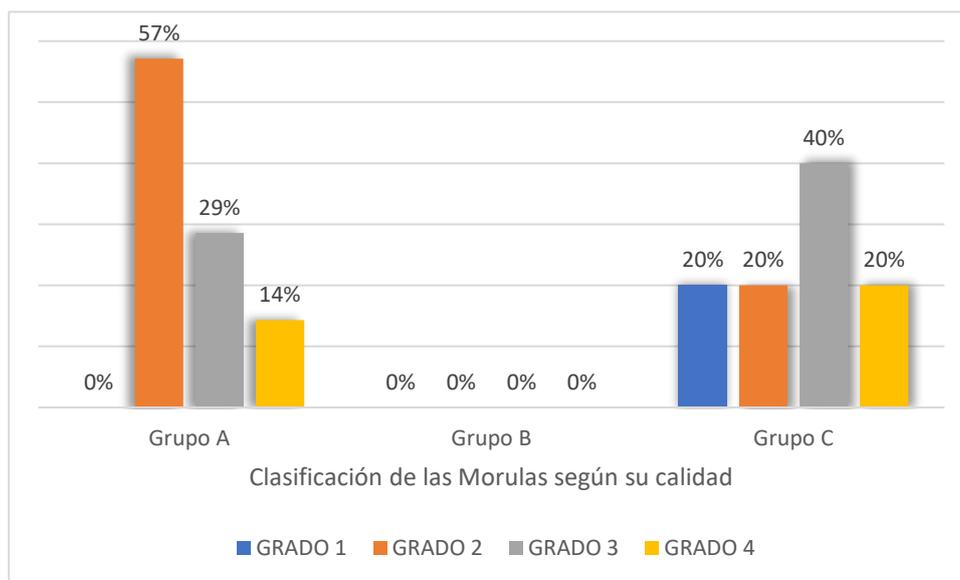
La primera observación realizada a las 20h post fecundación tuvo como objetivo determinar la tasa de fecundación de los grupos, siendo esta del 34.29% para el grupo A, 8.82% para el B y 33.33% para el C. El grupo B no consiguió proseguir el desarrollo más allá de unas pocas divisiones (2-4 células) es probable que este asociado a factores intrínsecos maternos de los ovocitos por tanto se evitará su interpretación en los análisis posteriores.

La evaluación realizada entre las 72 - 96 horas evidenció que en todos los grupos al menos se realizó el primer clivaje, sin embargo, solo el grupo A y C progresaron hacia mórula (20% y 11.90% respectivamente), los embriones restantes de los tres grupos presentaron evidentes anomalías de desarrollo (retraso en las divisiones celulares, falta de simetría en las divisiones de los blastómeros, presencia de vacuolas).

Las mórulas fueron evaluadas siguiendo la gradación dada por Stringfellow & Sidel (2000), la figura 12 muestra estos datos. Se obtuvo que el Grupo A está compuesto en su gran mayoría por mórulas grado 2 (57%) a diferencia del grupo

C donde el grupo mayor fue de grado 3 (40%), los embriones de grado 4 (degenerados) fueron del 14 y 20% respectivamente.

En la evaluación a las 168h post fecundación, se observó en los grupos A y C la presencia de mórulas (17.14% y 9.52% respectivamente) y ningún blastocito.



**Figura 12.** Clasificación de mórulas obtenidas según su calidad por grupo de IFA, expresado en porcentajes.

	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo C</b>	<b>P valor</b>
Total de ovocitos inseminados	35	42	-
<b>20 horas</b>			
Ovocitos fecundados y clivaje temprano	34.29%	33.33%	0.930
<b>72-96 horas</b>			
Embriones <8 células	14.29%	19.05%	0.431
Mórula	20%	11.90%	0.249
Degenerados	2.86%	2.38%	0.720
<b>120-168 horas</b>			
Embriones <8 células	11.43%	9.52%	0.563
Mórula	11.43%	9.52%	0.563
Blastocistos	0%	0%	-
Degenerados totales	11.43%	14.29%	0.464

**Tabla 4.** Comparación del desarrollo embrionario temprano in vitro en alpaca entre los grupos estudiados, expresado en porcentajes por grupo de IFA(p>0.05).

## **6. DISCUSIÓN**

### **6.1. DE LA ESTANDARIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO**

Durante mucho tiempo se le otorgó una importancia casi exclusiva al ovocito como predictor para llevar a buen término el desarrollo embrionario, si bien la evidencia clínica ha respaldado esta afirmación, la misma en tiempos recientes ha demostrado que alteraciones en los componentes espermáticos pueden repercutir tanto en la fecundación y desarrollo embrionario (Portella-Ruiz & Gonzales, 2016) como en la descendencia obtenida (Aitken et al., 2020; Aitken & Baker, 2020). Bajo esta nueva luz, es necesario establecer nuevos predictores de calidad embrionaria al implementar biotecnologías reproductivas en alpacas con el fin de maximizar los embriones de buena calidad, disminuir el impacto drástico en la ontogenia y aumentar el éxito de una preñez a término (Carretero et al., 2012, 2017; Fernández et al., 2018).

En este trabajo se buscó demostrar si el índice de fragmentación de ADN espermático (IFA) en los espermatozoides epididimarios puede ser utilizado como predictor de calidad espermática basado y teniendo como soporte estadístico algún nivel de asociación con los parámetros convencionales y los estadios de desarrollo embrionario.

Existen algunos trabajos usando el test SCD en alpaca (Huanca Marca, 2016; Huanca Marca et al., 2020; Ordoñez et al., 2015); sin embargo todos estos son hechos en eyaculado fresco y con kit comercial, a diferencia de los anteriores en nuestro trabajo las muestras son de origen epididimario de animales beneficiados en la provincia de Huancavelica y evaluadas en el mismo Huancavelica y otras transportadas durante 24

horas hasta su evaluación en Lima. El presente trabajo permitió estandarizar e implementar una modificación del test SCD en alpacas a bajo costo y tiempo de realización para muestras de espermatozoides epididimarios *post mortem* con valores de IFA coincidentes con resultados descritos en otros camélidos sudamericanos con muestras provenientes de eyaculado.

Se inició con la formulación y tiempos indicados según el autor de la técnica (Pratap et al., 2017); sin embargo se evidenció que no era útil para evaluar la fragmentación del ADN espermático en alpaca, dado que se degrada parcialmente la muestra y con mayores tiempos ocurre una degradación total.

Dada la naturaleza de las soluciones de trabajo, se optó por acortar los tiempos de exposición tanto de la denaturante como de la solución de lisis hasta evidenciar al microscopio las estructuras completas del espermatozoide (cabeza y cola) y el halo cromatínico con el mínimo tiempo de exposición, siendo estos tiempos de 8 minutos para ambas soluciones de trabajo donde puede visualizarse que el ADN supercompactado se relajó, formando un halo casi circular uniforme alrededor del *core* y la agresividad del tratamiento conservó y no deformó las estructuras espermáticas. Vistos a máximo aumento los halos formaron un círculo casi perfecto y cada una de las estructuras del espermatozoide fueron claramente distinguibles respecto a los otros tratamientos (Figura 5.c, 6.e-e<sub>1</sub>).

Los controles respondieron de manera correcta, el control negativo mostró la formación de un pequeño halo de cromatina, efecto visto en células que son expuestas a una solución de desproteínización sin desnaturación previa (Fernández et al., 2003). Para el control positivo los ensayos demostraron que para una potencia de 15 watts y una menor distancia de exposición al emisor de UV se obtiene un número más alto de

espermatozoides fragmentados, obteniendo porcentajes sobre el 70% con tiempos de exposición de 40 minutos a más pero al dejar reposar y evaluar 30 minutos después de la irradiación se observó que el IFA se incrementó alrededor de 10%, suficiente para generar un impacto y considerarlo como control positivo de fragmentación espermática. Este incremento del IFA en las muestras reposadas probablemente responda a que los espermatozoides al estar más tiempo en contacto con el ROS y especies reactivas generadas por el UV, estos compuestos pueden destruir componentes genómicos esenciales (Carretero et al., 2012) en más células por más tiempo observándose como un incremento en dicho valor.

## **6.2. DEL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN**

### **6.2.1. Factor transporte**

Se tiene conocimiento que los parámetros espermáticos de algunos animales se llegan a conservar si estos son mantenidos en a 4°C en el epidídimo (Bravo & Valdivia, 2018; James et al., 2002) también es sabido que ciclos de congelamiento y descongelamiento en algunos animales pueden condicionar a cambios a nivel de la cromatina (Hamamah et al., 1990; Vieira et al., 2013) e incrementar la generación de ROS (González-Marín et al., 2012).

En nuestro estudio se determinó que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los índices de fragmentación de ADN espermático cuando se analizan muestras transportadas durante 24 horas a 4°C y muestras analizadas en el lugar, esto se traduce como una ausencia de evidencia de cambios aparentes en el estado de la cromatina forzados por factores externos

como el frío prologando o un desbalance de ROS en el epidídimo. Vieira et al. (2013) refiere resultados similares en caballo con epidídimos refrigerados a 4°C hasta por 96 horas dando como explicación al bajo metabolismo de los espermatozoides epididimarios y las bajas temperaturas como factor de preservación correcta.

### **6.2.2. Relación del Índice de Fragmentación de ADN con los parámetros espermáticos**

De las 45 muestras evaluadas en nuestro estudio obtuvimos un IFA promedio del  $20.98 \pm 32.54\%$ , valor ligeramente diferente a los reportados por otros autores en evaluaciones hechas en camélidos sudamericanos mediante muestreos hechos por electro eyaculación en llama ( $0.68 - 37\%$ ) (Carretero et al., 2012) o en alpaca post copula ( $8.42 \pm 10.28\%$ ) y desviación del conducto deferente ( $36.44 \pm 22.50\%$ ) (Huanca Marca et al. 2020), ( $35.31 \pm 28.17\%$ ) (Ordoñez et al., 2015). A nivel epididimario hay menor cantidad de moléculas antioxidantes que en el plasma seminal del eyaculado por lo que deberíamos esperar tener valores mayores o iguales que lo expuesto por los autores anteriormente mencionados, mas esta diferencia de resultados responde al hecho de que la celeridad de degradación del ADN espermático varía dentro y entre las especies, asimismo, ésta se ve influenciada por el método de colecta (Huanca Marca et al., 2020).

No hay muchos estudios usando la técnica de SCD en alpaca a partir de espermatozoides epididimarios, por lo que este trabajo ofrece uno de los primeros aportes en este aspecto.

Se logró demostrar la existencia de correlación entre el IFA y algunos parámetros espermáticos convencionales, teniendo una correlación positiva baja para la inmovilidad y correlaciones negativas moderadas para la movilidad progresiva y concentración espermática pudiendo tomarse estos valores como referencia para un mayor criterio en la selección de muestras espermáticas de óptima calidad.

Evidencias similares se han reportado en humano (Acosta et al., 2015; Choucair et al., 2016; Zini et al., 2001) donde la fragmentación del ADN espermático se correlaciona con alteraciones de los parámetros de movilidad y concentración, no obstante, no se evidenció correlación con la integridad de membrana (test de HOS) o la viabilidad como lo reportado por Cheuquemán et al. (2012) en llamas. Esta posible inconsistencia estaría relacionada al hecho de usar animales machos de “descarte” beneficiados para consumo, no reproductores, donde factores como dieta, edad, ausencia de actividad sexual, genética y otros se ven reflejados en valores espermáticos que pueden llegar a ser bastante heterogéneos de individuo a individuo, lo que genera resultados muy variables.

Valdivia et al. (2019) propone una clasificación de calidad espermática basada en el grado de movilidad progresiva, con este criterio se segmentó el valor del IFA de la tabla 1 y se aplicó el estadígrafo no paramétrico de Kruskal Wallis obteniéndose diferencias significativas según el tipo de calidad espermática basado en la movilidad progresiva con lo que se pudo asumir al 2% de error que los valores de IFA son diferentes según su calidad espermática. La figura 10 mostró claramente que la media más baja de IFA (6.32%) se asocia a muestras de buena calidad en contraste con las de calidad mala (39.68%).

Con estos resultados podemos inferir que el uso de la movilidad progresiva y la concentración espermática van de la mano con el grado de IFA pudiendo usarse en conjunto como indicadores de calidad espermática.

### 6.2.3. Evaluación de los patrones SCD

Fernández et al. (2003) explican que el principio de formación de halos cromáticos se basa en la capacidad de las soluciones denaturantes de “soltar el ADN” y transformar las regiones que tienen roturas de cadena en motivos de cadena simple de ADN, estos motivos interactúan con el *core* residual de la cabeza impidiendo que los fragmentos de ADN se pierdan después de la eliminación de las proteínas nucleares por la lisis, con lo que se visualiza si el ADN está intacto en halos de dispersión, sin embargo, si el daño es muy extenso según explica Carretero et al. (2012) los fragmentos de ADN interactúan entre sí en la cabeza del espermatozoide por complementariedad de bases formando uniones cohesivas, como resultado no se produce halo en los espermatozoides fragmentados.

Analizando 33 muestras espermáticas aleatorias se estableció mediante la técnica empleada cuatro patrones de dispersión cromática o “halos”: grande, mediano, pequeño y sin halo, donde el patrón de mayor frecuencia fue el halo grande ( $60.79 \pm 35.05\%$ ) seguidos casi indistintamente por los otros patrones ( $13.22 \pm 14.92\%$ ,  $10.44 \pm 15.57\%$  y  $15.45 \pm 32.15\%$  respectivamente). Esta descripción de patrones de halos es la primera reportada en alpacas usando esta técnica y es contrastable con patrones similares reportados en llamas bajo la misma técnica donde el patrón de mayor frecuencia tiene valores similares a lo presentado (halo grande=

60.2±33.8%) (Carretero et al., 2012) aunque diferentes a lo visto en humanos ( Fernández et al., 2005; Fernández et al., 2003) donde se reporta un estado adicional de “degradación” aunque la aparición de este resultado está asociado al uso de kit comerciales (Carretero et al., 2017).

### **6.3. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO POST CAPACITACIÓN *SWIM UP***

Si bien no era parte de este estudio determinar si había asociación entre estos dos factores, sí fue necesario conocer el grado de IFA de las muestras destinadas a fecundación *in vitro* (FIV) así como avalar la inocuidad de la metodología de capacitación espermática.

Para nuestro grupo experimental, en términos generales no se evidenció diferencias significativas entre el IFA inicial y post capacitación *swim up*, es decir, no hay suficiente soporte estadístico para asumir daño iatrogénico a la muestra fecundante.

Estudios llevados a cabo en diferentes especies muestran discordancia en este punto. Algunos autores sostienen el decremento de la fragmentación de ADN post capacitación asociado al proceso de selección artificial (Santiso et al., 2010) mientras otros remarcan la presencia de un incremento variable promovido por los procesos de centrifugación (Contreras, 2017; Zini et al., 2000).

Muratori et al., 2019 indica que existe muchos estudios de comparación entre pre y post capacitación *swim up* donde no se suelen observar diferencias significativas, como en este trabajo, principalmente porque se toman valores promedios para comparar sin considerar la historia individual de la muestra. Espermatozoides de

individuos con baja fertilidad responden de manera diferente a los procesos de centrifugación respecto a individuos con fertilidad no alterada donde la integridad del ADN es un valor más sensible a estos fenómenos que la movilidad misma (Zini et al., 2000), lo cual puede verse reflejado en la variabilidad de los valores de IFA post *swim up* (ver tabla 3).

#### **6.4. FRAGMENTACIÓN ESPERMÁTICA Y DESARROLLO EMBRIONARIO**

En los últimos años han surgido estudios describiendo la fragmentación espermática en alpacas provenientes de diversos tipos de colecta y usando técnicas variadas de análisis (Contreras, 2017; Huanca Marca, 2016; Huanca Marca et al., 2020; Ordoñez et al., 2015; Ugarelli et al., 2018) sin embargo poco se ha abordado su impacto en el desarrollo embrionario de esta especie.

Este trabajo tuvo como uno de los objetivos determinar si existe algún grado de asociación entre el IFA y el desarrollo embrionario temprano mediante observación morfológica. De los resultados descritos en el anexo 9 y 10, tres grupos de desarrollo fueron establecidos en base al nivel de IFA espermático con el que fueron fecundados (Grupo A <2%, Grupo B 2-4%, Grupo C 4-6%) y tres tiempos de observación estadio-específico: 20, 72-96, 120-168 horas post fecundación que corresponde a fecundación, formación de mórulas y blastocitos respectivamente.

Los tres grupos establecidos alcanzaron a las 20 horas de observación el estadio de fecundación mediante la extrusión del segundo cuerpo polar u observación del primer clivaje. En los camélidos sudamericanos no se puede establecer otro tipo análisis más

informativo como el estado de los pronúcleos, distribución de los cuerpos precursores nucleolares o variaciones en el citoplasma ya que este último presenta un alto contenido de cuerpos lipídicos que lo oscurecen (Leisinger, 2013). El porcentaje de fecundación en los grupos A y C (34.29%-33.33%) fue similar entre ellos y a lo reportado por Mamani (2019) del 37% en cigotos de alpaca obtenidos por FIV en estadio de pronúcleos, aunque menor que lo reportado en llamas por del Campo et al (1994) de 57.1% ambos estudios usando espermatozoides de origen epididimario.

En los tres grupos, los embriones sufren un bloqueo en la etapa de división celular sin progresar más allá de 2-4 células, resaltando principalmente el grupo B donde los embriones obtenidos post fecundación no progresaron en desarrollo. Es sabido que los clivajes retrasados tanto como la formación de embriones aberrantes o degenerados se han asociados a daño por estrés oxidativo y fragmentación de ADN (Barroso et al., 2009; Wyck et al., 2018) pero también al factor materno, estos arrestos en los primeros clivajes se han asociados a la “ausencia de competencia ovocitaria” (Madan, 2011), este estado se caracteriza por una disminución de la cantidad necesaria de transcritos moleculares y proteínas lo que se traduce en un bajo perfil de expresión génica de genes importantes del desarrollo y afectando considerablemente la transición del control génico materno al embrionario resultando en embriones que no progresan su desarrollo más allá de unas pocas divisiones (Betts & Madan, 2008). Hay que considerar que los FIV fueron hechos con ovocitos heterólogos por tanto el grado de maduración nuclear y ovocitaria diferirá entre individuos y dada la naturaleza de la muestra es difícil tener acceso a informacional adicional como estatus genético, hormonal, edad, peso o dieta, factores que son partícipes en el estado de maduración ovocitaria y el subsecuente desarrollo embrionario tras la fecundación (Moawad et al., 2020).

Entre las 72-96 horas post fecundación se evidenció la formación de mórulas de grado variable, siendo para el grupo A de 20% y 11.90% para el C, sin embargo, estos valores no fueron estadísticamente diferentes. Otros autores han reportado en alpaca valores de 4.3% (Mamani, 2019), 52.9% (Martinez Chavez & Ramos Aponte, 2015), 45.5% (Ruiz et al., 2017) y en llama de 5.6% (Del Campo et al., 1994), 8% (Gamarra et al., 2009), 71.47% (Ayuque Araujo & Justiniano Huamancayo, 2013) para la producción de mórulas. Esta disparidad de resultados puede explicarse por las diferentes metodologías de obtención de gametos y de trabajo así como de la formulación de medios de cultivo optados por los autores en la producción in vitro de embriones (Moawad et al., 2020; Pérez Durand et al., 2017).

Las mórulas obtenidas de cada grupo se clasificaron siguiendo los criterios de Stringfellow & Sidel (2000), donde el grupo A tuvo una mayor producción de mórulas de grado 2 o regulares (57%) en contraste con el grupo C donde el grado 3 o malo es el grupo predominante (40%). Aunque estadísticamente la cantidad de mórulas producidas en ambos grupos no son diferentes, figuradamente sí estarían formados por subpoblaciones de calidades de mórulas diferentes, esto es un indicio de que podría existir alguna relación entre el IFA y el desarrollo embrionario sin embargo la evidencia no es estadísticamente robusta y por ello se recomendaría continuar los estudios con un mayor número de observaciones para confirmar este punto.

A las 120-196 horas de observación post FIV, ninguno de los grupos obtuvo progresión hacia blastocisto, sin embargo, aparece un fenómeno evidente desde la observación hecha entre las 72-96 horas post fecundación: la ocurrencia de embriones degenerados. Se obtuvo 11.43% y 14.29% de embriones degenerados totales para el Grupo A y C respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre estos valores ( $p > 0.05$ ).

No se encontró evidencia estadística suficiente que demuestre que los grupos A y C tienen desarrollos embrionarios distintos en función al IFA de la muestra espermática usada en el FIV, este resultado obtenido puede ser explicado desde tres aspectos: el primero fue mencionado líneas arriba y responde a la naturaleza muy heterogénea de las hembras de las cuales se extrajo los ovocitos a madurar, es probable que en éstos ovocitos se alcanzó maduración nuclear mas no maduración citoplasmática (Moawad et al., 2020) restándole competencia al ovocito para fecundar, lo cual podría ser la causa de que el grupo B tuviese tan pocos ovocitos fecundados. El segundo está asociado al proceso metodológico donde la baja tasa de fecundación, pocas o ninguna mórula y embriones en algunas fechas del FIV (ver anexo N°9) se atribuyen a la manera de trabajo. Ruiz et al. (2017) menciona que al usar ovocito maduros envejecidos (ovocitos maduros que permanecen mucho tiempo en el sistema de cultivo sin fecundar), estos ovocitos si bien tienen el potencial de ser fecundados, no desarrollan a embriones, presentado patrones alterados de gránulos corticales y microtúbulos; así también puede atribuirse a la ausencia de ciertos factores suplementarios del medio de cultivo (Leisinger, 2013; Moawad et al., 2020) o su ausencia en puntos clave del desarrollo. Han & Niwa (2003) reportaron en ratón que si bien el uso de suero fetal bovino era deletéreo en los primeros clivajes, promovía rápidamente la transición de mórula a blastocisto mejorando la calidad de estos últimos. Pérez Durand et al.(2017) refiere que existe un efecto positivo del medio ambiente oviductal al cultivar cigotos *in vivo* respecto al *in vitro* en alpacas, siendo solo en cultivo *in vivo* donde se pudo obtener blastocitos cronológica y morfológicamente correctos.

Una tercera causa puede estar asociada al estrés oxidativo intrínseco del embrión en formación, Betts & Madan (2008) proponen que el arresto embrionario en las

primeras etapas del desarrollo es un mecanismo de control de la integridad de los telómeros. Condiciones subóptimas de cultivo tanto de nutrientes como el uso de oxígeno a concentraciones atmosféricas (esta condición última es similar a la usada en nuestro caso), aunado a defectos en los transcritos maternos de reserva condicionan a que el metabolismo embrionario se altere incrementando los niveles de ROS y estrés oxidativo. Betts & Madan concluyen que este estrés oxidativo media la activación de algunas vías de senescencia celular y la inducción de daño telomérico oxidativo a nivel de telómeros resultando en un bloqueo permanente del desarrollo impidiendo el desarrollo de futuros embriones de baja calidad.

Se podría presuponer entonces que el uso de gametos con determinado nivel de ROS también devendría en embriones detenidos en los primeros clivajes, sin embargo Simões (2010) menciona que la apoptosis embrionaria puede deberse a factores relacionados al estrés oxidativo del embrión independiente del uso de espermatozoides fragmentados en la fecundación. Es cierto que existen factores espermáticos que son responsables de los primeros clivajes (Comizzoli et al., 2000; Simões, 2010) y se ha demostrado que un ADN alterado en estas células puede desencadenar bloqueos de desarrollo entre el segundo al tercer clivaje (Fatehi, 2006), similar a lo que se observado en este trabajo; sin embargo, no podemos inferir que sea producto de un ADN dañado ya que los grupos analizados no muestran diferencias significativas entre ellos en ninguno de los estadios observados.

Investigaciones llevadas a cabo en bovinos (Simões, 2010), ratón (Ahmadi & Ng, 1999) y humano (Simon et al., 2014) muestran que a niveles bajos de fragmentación de ADN espermático este no tiene influencia en el desarrollo embrionario preimplantacional y el ovocito puede reparar el daño génico paterno, con esto presente es presumible que con valores de IFA más elevados se pueda visualizar algún efecto

en el desarrollo por tanto sería recomendable aumentar los grupos de IFA en estudios posteriores y determinar cuál es el punto mínimo requerido de este valor para obtener un desarrollo embrionario correcto.

## 7. CONCLUSIONES

Se ha logrado implementar un test rápido y económico para determinar el Índice de Fragmentación del ADN en espermatozoides epididimarios de alpacas mediante la prueba SCD modificado.

Desde el punto de análisis de la fragmentación de ADN espermático, el transporte de las muestras bajo las condiciones establecidas en este estudio no es un factor que potencialmente incremente este valor.

Existe correlación proporcionalmente inversa entre los valores de IFA y los parámetros espermáticos asociados a la movilidad progresiva y concentración.

No existen diferencias significativas entre el IFA pre y post capacitación espermática usando la técnica de *swim up* ni con el desarrollo embrionario preimplantacional en alpacas.

## 8. RECOMENDACIONES

- Complementar la prueba SCD con otras pruebas que miden fragmentación espermática desde otras ópticas ya sea por inmadurez espermática a través de azul de toluidina, medición de ROS por TUNEL o a través de marcadores apoptóticos por citometría de flujo.
- Ampliar el número FIV realizados mejorando la metodología de desarrollo embrionario y los sistemas de cultivo usados (cultivar en hipoxia 5% O<sub>2</sub>) para maximizar el muestreo de embriones finales producidos, así mismo usar muestras espermáticas con valores de IFA más elevados.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Absalan, F., Ghannadi, A., Kazerooni, M., Parifar, R., Jamalzadeh, F., & Amiri, S. (2012). Value of sperm chromatin dispersion test in couples with unexplained recurrent abortion. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(1), 11-14. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9647-0>
- Acosta, L. G., Rivas, C. A., Chiscul, L. K., & Díaz Orrego, J. (2015). Correlación entre los parámetros seminales, fragmentación de ADN espermático y estrés oxidativo en pacientes atendidos en un centro de fertilidad en el norte del Perú. *Revista Iberoamericana De Fertilidad Y Reproducción Humana*, 32(4), 24-34.
- Adams, G. P., Ratto, M. H., Collins, C. W., & Bergfelt, D. R. (2009). Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology*, 71(1), 166-175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.005>
- Ahmadi, A., & Ng, S.-C. (1999). Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *The Journal of Experimental Zoology*, 284(6), 696-704. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19991101\)284:6<696::AID-JEZ11>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19991101)284:6<696::AID-JEZ11>3.0.CO;2-E)
- Aitken, R. J., & Baker, M. A. (2020). The Role of Genetics and Oxidative Stress in the Etiology of Male Infertility—A Unifying Hypothesis? *Frontiers in Endocrinology*, 11, 581838. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.581838>
- Aitken, R. J., & De Iuliis, G. N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 16(1), 3-13. <https://doi.org/10.1093/molehr/gap059>
- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., & Nixon, B. (2020). The Sins of Our Forefathers: Paternal Impacts on De Novo Mutation Rate and Development. *Annual Review of Genetics*, 54(1), 1-24. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043617>

- Aitken, R. J., & Koppers, A. J. (2011). Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, *13*(1), 36-42.  
<https://doi.org/10.1038/aja.2010.68>
- Aitken, R., Smith, T., Jobling, M., Baker, M., & De Iuliis, G. (2014). Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, *16*(1), 31.  
<https://doi.org/10.4103/1008-682X.122203>
- Amiri, I., Ghorbani, M., & Heshmati, S. (2012). Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim up Methods. *JOURNAL of CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH*.  
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/4198.2530>
- Andrabi, S. M. H. (2007). Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *24*(12), 561-569.  
<https://doi.org/10.1007/s10815-007-9177-y>
- Ayunque Araujo, A., & Justiniano Huamancayo, E. C. (2013). *Evaluación de diferentes tiempos para la maduración nuclear de ovocitos de llama (Lama glama) en el desarrollo de embriones producidos por fecundación in vitro* [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Huancavelica].  
<http://repositorio.unh.edu.pe/handle/UNH/752>
- Balasuriya, A., Speyer, B., Serhal, P., Doshi, A., & Harper, J. C. (2011). Sperm chromatin dispersion test in the assessment of DNA fragmentation and aneuploidy in human spermatozoa. *Reproductive BioMedicine Online*, *22*(5), 428-436.  
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.01.012>
- Barroso, G., Valdespin, C., Vega, E., Kershenovich, R., Avila, R., Avendaño, C., & Oehninger, S. (2009). Developmental sperm contributions: Fertilization and

- beyond. *Fertility and Sterility*, 92(3), 835-848.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.06.030>
- Betts, D. H., & Madan, P. (2008). Permanent embryo arrest: Molecular and cellular concepts. *Molecular Human Reproduction*, 14(8), 445-453.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gan035>
- Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J., & Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47(3), 619-626.  
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00020-4)
- Bravo, Z., & Valdivia, M. (2018). Follicular fluid stimulates capacitation and acrosome reaction in alpaca sperm (*Vicugna pacos*). *Reproduction in Domestic Animals*, 53(3), 629-635. <https://doi.org/10.1111/rda.13151>
- Brown, B. W. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 58(3-4), 169-195. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00081-0)
- Carretero, M. I., Giuliano, M. S., & Neild, D. M. (2017). Evaluación de la calidad del ADN espermático en camélidos sudamericanos y otras especies domésticas. *SPERMOVA*, 1(7), 18-26. <https://doi.org/10.18548/aspe/0005.04>
- Carretero, M. I., Lombardo, D., Arraztoa, C. C., Giuliano, S. M., Gambarotta, M. C., & Neild, D. M. (2012). Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Animal Reproduction Science*, 131(1-2), 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.02.008>
- Casanovas, A., Ribas-Maynou, J., Lara-Cerrillo, S., Jimenez-Macedo, A. R., Hortal, O., Benet, J., Carrera, J., & García-Peiró, A. (2019). Double-stranded sperm DNA damage is a cause of delay in embryo development and can impair implantation

- rates. *Fertility and Sterility*, 111(4), 699-707.e1.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.035>
- Castillo, J., Jodar, M., & Oliva, R. (2018). The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*, 24(5), 535-555. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy017>
- Cheuquemán, C., Merino, O., Giojalas, L., Von Baer, A., Sánchez, R., & Risopatrón, J. (2013). Assessment of Sperm Function Parameters and DNA Fragmentation in Ejaculated Alpaca Sperm ( *Lama Pacos* ) by Flow Cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(3), 447-453. <https://doi.org/10.1111/rda.12096>
- Chohan, K. R. (2006). Comparison of Chromatin Assays for DNA Fragmentation Evaluation in Human Sperm. *Journal of Andrology*, 27(1), 53-59. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05068>
- Choucair, F. B., Rachkidi, E. G., Raad, G. C., Saliba, E. M., Zeidan, N. S., Jounblat, R. A., Abou Jaoude, I. F., & Hazzouri, M. M. (2016). High level of DNA fragmentation in sperm of Lebanese infertile men using Sperm Chromatin Dispersion test. *Middle East Fertility Society Journal*, 21(4), 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2016.06.005>
- Comizzoli, P., Marquant-Le Guienne, B., Heyman, Y., & Renard, J. P. (2000). Onset of the First S-Phase Is Determined by a Paternal Effect During the G1-Phase in Bovine Zygotes1. *Biology of Reproduction*, 62(6), 1677-1684. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.6.1677>
- Contreras, M. (2017). *Efecto de los procedimientos de separación sobre la integridad del DNA espermático de Vicugna pacos «alpaca»* [Tesis de Grado, Universidad Nacional de San Cristobál de Huamanga]. <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2862>

- Cortés-Gutiérrez, E., Crespo, F., Serres-Dalmau, C., Gutiérrez de las Rozas, A., Dávila-Rodríguez, M., López-Fernández, C., & Gósalvez, J. (2009). Assessment of Sperm DNA Fragmentation in Stallion ( *Equus caballus* ) and Donkey ( *Equus asinus* ) Using the Sperm Chromatin Dispersion Test. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(5), 823-828. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01091.x>
- de la Torre, J., Lopez-Fernandez, C., Pita, M., Fernandez, J. L., Johnston, S. D., & Gosalvez, J. (2007). Simultaneous Observation of DNA Fragmentation and Protein Loss in the Boar Spermatozoon Following Application of the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test. *Journal of Andrology*, 28(4), 533-540. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.002246>
- Del Campo, M. R., Del Campo, C. H., Donoso, M. X., Berland, M., & Mapletoft, R. J. (1994). In vitro fertilization and development of llama ( ) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture. *Theriogenology*, 41(6), 1219-1229. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90479-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90479-3)
- Eid, L. N., Lorton, S. P., & Parrish, J. J. (1994). Paternal Influence on S-Phase in the First Cell Cycle of the Bovine Embryo1. *Biology of Reproduction*, 51(6), 1232-1237. <https://doi.org/10.1095/biolreprod51.6.1232>
- Enciso, M., Alfarawati, S., & Wells, D. (2013). Increased numbers of DNA-damaged spermatozoa in samples presenting an elevated rate of numerical chromosome abnormalities. *Human Reproduction*, 28(6), 1707-1715. <https://doi.org/10.1093/humrep/det077>
- Enciso, M., López-Fernández, C., Fernández, J. L., García, P., Gosálbez, A., & Gosálvez, J. (2006). A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*, 65(2), 308-316. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.044>

- Esbert, M., Pacheco, A., Soares, S. R., Amorós, D., Florensa, M., Ballesteros, A., & Meseguer, M. (2018). High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected. *Andrology*, 6(5), 697-706. <https://doi.org/10.1111/andr.12551>
- Evenson, D., Darzynkiewicz, Z., & Melamed, M. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*, 210(4474), 1131-1133. <https://doi.org/10.1126/science.7444440>
- Evenson, D. P. (2016). The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Animal Reproduction Science*, 169, 56-75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>
- FAO. (2005). *Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú* (p. 63). Food and Agriculture Organization (FAO). [https://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia\\_archivos/situacion%20alpcas%20peru.pdf](https://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia_archivos/situacion%20alpcas%20peru.pdf)
- Fatehi, A. N. (2006). DNA Damage in Bovine Sperm Does Not Block Fertilization and Early Embryonic Development But Induces Apoptosis After the First Cleavages. *Journal of Andrology*, 27(2), 176-188. <https://doi.org/10.2164/jandrol.04152>
- Feijó, C. M., & Esteves, S. C. (2014). Diagnostic accuracy of sperm chromatin dispersion test to evaluate sperm deoxyribonucleic acid damage in men with unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 101(1), 58-63.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.002>

- Fernández, J. L., Cajigal, D., López-Fernández, C., & Gosálvez, J. (2011). Assessing Sperm DNA Fragmentation with the Sperm Chromatin Dispersion Test. En V. V. Didenko (Ed.), *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo* (Vol. 682, pp. 291-301). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-409-8_21)
- Fernández, J. L., Johnston, S., & Gosálvez, J. (2018). Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Assay. En A. Zini & A. Agarwal (Eds.), *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage* (pp. 137-152). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71815-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71815-6_8)
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. *Journal of Andrology*, *24*(1), 59-66. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x>
- Fernández, J., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., Lafromboise, M., & Dejonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertility and Sterility*, *84*(4), 833-842. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.11.089>
- Fernández-Baca, S. (1993). Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal Reproduction Science*, *33*(1-4), 307-323. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90121-7](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90121-7)
- Fernandez-Baca, S., Madden, D. H. L., & Novoa, C. (1970). EFFECT OF DIFFERENT MATING STIMULI ON INDUCTION OF OVULATION IN THE ALPACA. *Reproduction*, *22*(2), 261-267. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0220261>
- Fowler, M. E., & Bravo, P. W. (2010). *Medicine and Surgery of Camelids: Fowler/Medicine and Surgery of Camelids*. Blackwell Publishing, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118785706>

- Gadir Adam, A. A. (2016). In Vitro Production of Embryos: Principles, Techniques and Applications. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 4(12).  
<https://doi.org/10.20431/2349-0365.0412003>
- Gamarra, G., Huaman, E., León, S., Carpio, M., Alvarado, E., Asparrin, M., & Vivanco, H. W. (2009). 157 FIRST IN VITRO EMBRYO PRODUCTION IN ALPACAS (LAMA PACOS). *Reproduction, Fertility and Development*, 21(1), 177.  
<https://doi.org/10.1071/RDv21n1Ab157>
- García-Peiró, A., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Abad, C., Guitart, M., Amengual, M. J., Gosálvez, J., & Benet, J. (2011). Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes: Sperm DNA fragmentation dynamics. *International Journal of Andrology*, 34(6pt2), e546-e553. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2011.01153.x>
- Gardner, D. K., & Balaban, B. (2016). Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and ‘OMICS’: Is looking good still important? *Molecular Human Reproduction*, 22(10), 704-718.  
<https://doi.org/10.1093/molehr/gaw057>
- Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 979-986. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>
- Gervasi, M. G., & Visconti, P. E. (2016). Chang’s meaning of capacitation: A molecular perspective: C HANG’S M EANING OF C APACITATION. *Molecular Reproduction and Development*, 83(10), 860-874.  
<https://doi.org/10.1002/mrd.22663>
- González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *International Journal*

*of Molecular Sciences*, 13(12), 14026-14052.

<https://doi.org/10.3390/ijms131114026>

Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J., Esteves, S., & Johnston, S. (2015).

Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: Ten frequently asked questions. *Journal of Reproductive Biotechnology and Fertility*, 4, 205891581559445. <https://doi.org/10.1177/2058915815594454>

Hamamah, S., Royère, D., Nicolle, J., Paquignon, M., & Lansac, J. (1990). Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: A comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reproduction Nutrition Développement*, 30(1), 59-64. <https://doi.org/10.1051/rnd:19900105>

Han, M.-S., & Niwa, K. (2003). Effects of BSA and Fetal Bovine Serum in Culture Medium on Development of Rat Embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 49(3), 235-242. <https://doi.org/10.1262/jrd.49.235>

Huanca Marca, N. F. (2016). *INDICE DE FRAGMENTACION DE ADN ESPERMATICO EN SEMEN DE ALPACAS (Vicugna pacos) UTILIZANDO EL INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM - ISAS* [Tesis de Grado, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. <http://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/UNSAAC/1800/253T20160614.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Huanca Marca, N. F., Ordoñez, C., Ampuero, E., & Cucho, H. (2020). Índice de fragmentación del ADN espermático de alpacas (*Vicugna pacos*) utilizando la prueba de dispersión de la cromatina espermática. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(4), e19025. <https://doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19025>

Huanca, T., Gonzáles, M., Cárdenas, O., Mamani-Cato, R. H., Naveris, M., & Huanca, W. (2013). Uso de la biotecnología reproductiva en la conservación de los

- recursos genéticos: Banco de germoplasma de alpacas de color y llamas. *SPERMOVA*, 3(1), 37-40.
- INEI. (2013). *IV Censo Nacional Agropecuario 2012* (p. 63). Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). <http://proyectos.inei.gob.pe/web/DocumentosPublicos/ResultadosFinalesIVCENAGRO.pdf>
- James, A. N., Green, H., Hoffman, S., Landry, A. M., Paccamonti, D., & Godke, R. A. (2002). Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*, 58(2-4), 401-404. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00883-X](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00883-X)
- Johnston, S. D., Lopez-Fernandez, C., Gosalbez, A., Zee, Y., Holt, W. V., Allen, C., & Gosalvez, J. (2007). The Relationship Between Sperm Morphology and Chromatin Integrity in the Koala (*Phascolarctos cinereus*) as Assessed by the Sperm Chromatin Dispersion Test (SCDt). *Journal of Andrology*, 28(6), 891-899. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.003350>
- Kadwell, M., Fernandez, M., Stanley, H. F., Baldi, R., Wheeler, J. C., Rosadio, R., & Bruford, M. W. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1485), 2575-2584. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1774>
- Kim, J. W., Lee, W. S., Yoon, T. K., Seok, H. H., Cho, J. H., Kim, Y. S., Lyu, S. W., & Shim, S. H. (2010). Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment. *BMC Medical Genetics*, 11(1), 153. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-153>

- Kumaresan, A., Das Gupta, M., Datta, T. K., & Morrell, J. M. (2020). Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm Animals: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 321. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00321>
- Leemans, B., Stout, T. A. E., De Schauwer, C., Heras, S., Nelis, H., Hoogewijs, M., Van Soom, A., & Gadella, B. M. (2019). Update on mammalian sperm capacitation: How much does the horse differ from other species? *Reproduction*, 157(5), R181-R197. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0541>
- Leisinger, C. A. (2013). *Factors affecting in vitro maturation of alpaca (Lama pacos) oocytes* [Tesis de Master, The Ohio State University]. [https://etd.ohiolink.edu/apexprod/rws\\_etd/send\\_file/send?accession=osu1373989536&disposition=inline](https://etd.ohiolink.edu/apexprod/rws_etd/send_file/send?accession=osu1373989536&disposition=inline)
- Linneo, C. (1758). *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis* (10th ed., Vol. 1). Impensis Direct. Laurentii Salvii. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/10277#page/3/mode/1up>
- López-Fernández, C., Gage, M. J. G., Arroyo, F., Gosálbez, A., Larrán, A. M., Fernández, J. L., & Gosálvez, J. (2009). Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. *REPRODUCTION*, 138(2), 257-266. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0105>
- Madan, P. (2011). 4.38—Arrest or Survive: A Decision of the Early Preimplantation Embryo That Influences Fertility. En M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 469-476). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00283-X>

- Malvezzi, H., Sharma, R., Agarwal, A., Abuzenadah, A. M., & Abu-Elmagd, M. (2014). Sperm quality after density gradient centrifugation with three commercially available media: A controlled trial. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 121. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-121>
- Mamani, P. M. (2019). *Producción de embriones pre implantacionales in vitro mediante ICSI Y FIV en Vicugna pacos* [Tesis de Grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10294/Mamani\\_hp.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/10294/Mamani_hp.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Marín, J. C., Zapata, B., González, B. A., Bonacic, C., Wheeler, J. C., Casey, C., Bruford, M. W., Palma, R. E., Poulin, E., Alliende, M. A., & Spotorno, Á. E. (2007). Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: Nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena de Historia Natural*, 80(2). <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2007000200001>
- Martinez Chavez, E., & Ramos Aponte, M. I. (2015). *Evaluar la capacidad fecundante de espermatozoides refrigerados en la producción de embriones in vitro en alpacas (vicugna pacos) Huacaya* [Tesis de Grado, Universidad Nacional de Huancavelica]. <https://repositorio.unh.edu.pe/bitstream/handle/UNH/763/TP%20-%20UNH%20ZOOT.%200035.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Middelkamp, S., van Tol, H. T. A., Spierings, D. C. J., Boymans, S., Guryev, V., Roelen, B. A. J., Lansdorp, P. M., Cuppen, E., & Kuijk, E. W. (2020). Sperm DNA damage causes genomic instability in early embryonic development. *Science Advances*, 6(16), eaaz7602. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz7602>

- Miragaya, M. H., Chaves, M. G., & Agüero, A. (2006). Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*, 61(2-3), 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.017>
- Moawad, A. R., Ghoneim, I. M., Darwish, G. M., Badr, M. R., El-Badry, D. A., & EL-Wishy, A. B. A. (2020). Factors affecting *in vitro* embryo production: Insights into dromedary camel. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 35(2), 119-141. <https://doi.org/10.12750/JARB.35.2.119>
- Muratori, M., Marchiani, S., Tamburrino, L., & Baldi, E. (2019). Sperm DNA Fragmentation: Mechanisms of Origin. En E. Baldi & M. Muratori (Eds.), *Genetic Damage in Human Spermatozoa* (Vol. 1166, pp. 75-85). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21664-1_5)
- Muratori, M., Tarozzi, N., Carpentiero, F., Danti, S., Perrone, F. M., Cambi, M., Casini, A., Azzari, C., Boni, L., Maggi, M., Borini, A., & Baldi, E. (2019). Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: Effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. *Scientific Reports*, 9(1), 7492. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43981-2>
- Nixon, B., & Bromfield, E. G. (2018). Sperm Capacitation. En *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 272-278). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64464-1>
- Ordoñez, C., Gonzales, G., Alarcón, V., Ampuero, E., Huanca Marca, N. F., & Cucho, H. (2015). *Comparación de la fragmentación del ADN espermático determinado con SCD y la desnaturalización de ADN evaluada con naranja de acridina en espermatozoides de alpacas*. VII Congreso Mundial en Camélidos Sudamericanos 2015, Puno. [https://www.researchgate.net/publication/322147088\\_Comparacion\\_de\\_la\\_frag](https://www.researchgate.net/publication/322147088_Comparacion_de_la_frag)

mentacion\_del\_ADN\_espermatico\_determinado\_con\_SCD\_y\_la\_desnaturalizacion\_de\_ADN\_evaluada\_con\_naranja\_de\_acridina\_en\_espermatozoides\_de\_alpacas

- Pawar, K., & Kaul, G. (2011). Assessment of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Sperm DNA Fragmentation Using a Sperm Chromatin Dispersion Test: Sperm Chromatin Dispersion Test in Buffalo. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(6), 964-969. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01766.x>
- Peña, Jr, S. T., Gummow, B., Parker, A. J., & Paris, D. B. B. P. (2017). Revisiting summer infertility in the pig: Could heat stress-induced sperm DNA damage negatively affect early embryo development? *Animal Production Science*, 57(10), 1975. <https://doi.org/10.1071/AN16079>
- Pérez Durand, M. G., Zevallos Aragón, J. P., & Pérez Guerra, U. H. (2017). Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 19(2). <https://doi.org/10.18271/ria.2017.274>
- Portella-Ruiz, J., & Gonzales, G. (2016). Fragmentación del ADN espermático: Origen, evaluación y repercusión en la fertilidad masculina. *Ginecología y Obstetricia de México*, 84(7), 462-473.
- Pratap, H., Hottigoudar, S., Nichanahalli, K., & Chand, P. (2017). Assessment of sperm deoxyribose nucleic acid fragmentation using sperm chromatin dispersion assay. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 8(2), 45. [https://doi.org/10.4103/jpp.JPP\\_187\\_16](https://doi.org/10.4103/jpp.JPP_187_16)
- Ratto, M. H., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. P. (2005). Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3(1), 29. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-29>

- Ribas-Maynou, J., García-Peiró, A., Fernández-Encinas, A., Abad, C., Amengual, M. J., Prada, E., Navarro, J., & Benet, J. (2013). Comprehensive analysis of sperm DNA fragmentation by five different assays: TUNEL assay, SCSA, SCD test and alkaline and neutral Comet assay. *Andrology*, *1*(5), 715-722. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00111.x>
- Ruiz, J., Landeo, L., Mendoza, J., Artica, M., Correa, J. E., Silva, M., Miragaya, M., & Ratto, M. H. (2013). Vitrification of in vitro mature alpaca oocyte: Effect of ethylene glycol concentration and time of exposure in the equilibration and vitrification solutions. *Animal Reproduction Science*, *143*(1-4), 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.009>
- Ruiz, J., Paulo Santayana, R., José Mendoza, M., Leandra Landeo, J., Huamán, E., Ticllacuri, F., Fidel Mujica, L., Silva, M., & Ratto, M. H. (2017). Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on in vitro embryo development in alpacas. *Theriogenology*, *95*, 127-132. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.03.006>
- Sakkas, D. (2018). The Preparation of Sperm. En *Encyclopedia of Reproduction* (pp. 139-142). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64850-X>
- San-Martin, M., Copaira, M., Zuniga, J., Rodreguez, R., Bustinza, G., & Acosta, L. (1968). ASPECTS OF REPRODUCTION IN THE ALPACA. *Reproduction*, *16*(3), 395-399. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0160395>
- Santiso, R., Tamayo, M., Gosálvez, J., Meseguer, M., Garrido, N., & Fernández, J. L. (2010). Swim-up procedure selects spermatozoa with longer telomere length. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *688*(1-2), 88-90. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.03.003>

- Seli, E., Gardner, D. K., Schoolcraft, W. B., Moffatt, O., & Sakkas, D. (2004). Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 82(2), 378-383. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.12.039>
- Sharma, R., & Agarwal, A. (2018). Defective Spermatogenesis and Sperm DNA Damage. En A. Zini & A. Agarwal (Eds.), *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage* (pp. 229-261). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71815-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71815-6_14)
- Simões, R. (2010). *Influência da fragmentação de DNA espermático na produção in vitro de embriões bovinos* [Tesis de Master, Universidade de São Paulo]. 10.11606/T.10.2010.tde-01042011-145008
- Simon, L., Murphy, K., Shamsi, M. B., Liu, L., Emery, B., Aston, K. I., Hotaling, J., & Carrell, D. T. (2014). Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Human Reproduction*, 29(11), 2402-2412. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu228>
- Souza, F. D., Asampille, G., Uppangala, S., Kalthur, G., Atreya, H. S., & Adiga, S. K. (2019). Sperm-mediated DNA lesions alter metabolite levels in spent embryo culture medium. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(3), 443. <https://doi.org/10.1071/RD18136>
- Stringfellow, D. A., & Sidel, S. M. (2000). *Manual de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS): Guía de procedimientos e información general para el uso de la tecnología de la transferencia de embriones con especial énfasis en los procedimientos sanitarios* (segunda). International Embryo Transfer Society.

- Sumar, J. (1994). Effects of various ovulation induction stimuli in alpacas and llamas. *Journal of Arid Environments*, 26(1), 39-45. <https://doi.org/10.1006/jare.1994.1006>
- Sumar, J. B. (1996). Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*, 42(1-4), 405-415. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01538-2](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01538-2)
- Tandara, M., Bajić, A., Tandara, L., Bilić-Zulle, L., Šunj, M., Kozina, V., Goluža, T., & Jukić, M. (2014). Sperm DNA integrity testing: Big halo is a good predictor of embryo quality and pregnancy after conventional IVF. *Andrology*, 2(5), 678-686. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00234.x>
- Trasorras, V., Giuliano, S., & Miragaya, M. (2013). In vitro production of embryos in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 136(3), 187-193. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.009>
- Ugarelli, A., Medranda, B., Santiani, A., & Evangelista-Vargas, S. (2018). *Preliminary study: Determination of basal percentage of DNA fragmentation in epididymal alpaca sperm*. VII Peruvian Congress Animal Reproduction Of The Asociación Peruana de Reproducción Animal. SPERMOVA, Cusco.
- Valdivia, M., Castañeda-Zegarra, S., Lévano, G., Lazo, J., Reyes, J., Bravo, Z., Santiani, A., Mujica, F., Ruíz, J., & Gonzales, G. F. (2019). Spermatogonial stem cells identified by molecular expression of *PLZF*, *integrin β1* and reactivity to *Dolichos biflorus* agglutinin in alpaca adult testes. *Andrologia*, 51(6), e13283. <https://doi.org/10.1111/and.13283>
- Vásquez, J., Florentini, E., & Valdivia, M. (2012). Hypoosmotic Swelling Test in Alpaca ( *Vicugna pacos* ) Epididymal Spermatozoa: Hypoosmotic Swelling Test in Alpaca. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), e83-e87. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01988.x>

- Vásquez, J. H. (2012). *Fisiología espermática, fragmentación del ADN y niveles de expresión génica de Prm1, Prm2, Tnp1 y Tnp2 en relación a la edad en ratones* [Tesis de Grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].  
<https://hdl.handle.net/20.500.12672/2671>
- Vieira, L. A., Gadea, J., García-Vázquez, F. A., Avilés-López, K., & Matás, C. (2013). Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity. *Animal Reproduction Science*, 136(4), 280-288.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.027>
- Wei, Q., Zhong, L., Zhang, S., Mu, H., Xiang, J., Yue, L., Dai, Y., & Han, J. (2017). Bovine lineage specification revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst†. *Biology of Reproduction*, 97(1), 5-17.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/iox071>
- WHO. (2010). *WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen* (5th ed.). World Health Organization.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241547789>
- Wyck, S., Herrera, C., Requena, C. E., Bittner, L., Hajkova, P., Bollwein, H., & Santoro, R. (2018). Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. *Epigenetics & Chromatin*, 11(1), 60.  
<https://doi.org/10.1186/s13072-018-0224-y>
- Yalta, C., Sotil, G., & Veli, E. (2015). Variabilidad genética y detección de error en filiación utilizando microsatélites en dos rebaños de alpacas Huacaya (Vicugna pacos). *Salud y Tecnología Veterinaria*, 2(2), 134-145.  
<https://doi.org/10.20453/stv.v2i2.2253>

- Zandieh, Z., Ashrafi, M., Aflatoonian, K., & Aflatoonian, R. (2019). Human sperm DNA damage has an effect on immunological interaction between spermatozoa and fallopian tube. *Andrology*, 7(2), 228-234. <https://doi.org/10.1111/andr.12574>
- Zhang, L., Qiu, Y., Wang, K., Wang, Q., Tao, G., & Wang, L. (2010). Measurement of sperm DNA fragmentation using bright-field microscopy: Comparison between sperm chromatin dispersion test and terminal uridine nick-end labeling assay. *Fertility and Sterility*, 94(3), 1027-1032. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.034>
- Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., & Zenzes, M. T. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile men. *Fertility and Sterility*, 75(4), 674-677. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01796-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01796-9)
- Zini, A., Nam, R. K., Mak, V., Phang, D., & Jarvi, K. (2000). Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing. *Fertility and Sterility*, 74(4), 824-827. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)01495-3](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)01495-3)

## 10. ANEXOS

**Anexo N°1.** Estadísticos descriptivos de los parámetros espermáticos segmentados por el factor “transporte de la muestra”.

		n	Media	Error estándar de la media	Desviación estándar	Varianza	Shapiro-Wilk		
							Estadístico	gl	Sig.
<b>Muestra Transportada</b>	<b>Movilidad progresiva</b>	40	22.94	2.50	15.78	249.07	.94	40	.03*
	<b>Movilidad no progresiva</b>	40	20.36	1.49	9.41	88.55	.94	40	.03*
	<b>Inmóviles</b>	40	56.70	3.63	22.94	526.43	.95	40	.06
	<b>Viabilidad</b>	35	65.01	2.71	16.03	256.95	.88	35	.00*
	<b>Host</b>	31	64.19	2.60	14.47	209.46	.95	31	.20
	<b>Concentración</b>	40	142.03	24.91	157.56	24824.87	.73	40	.00*
	<b>IFA</b>	40	21.46	5.43	34.32	1178.05	.62	40	.00*
<b>Muestra No transportada</b>	<b>Movilidad progresiva</b>	5	24.27	5.51	12.32	151.70	.94	5	.65
	<b>Movilidad no progresiva</b>	5	24.50	0.98	2.20	4.82	.78	5	.05
	<b>Inmóviles</b>	5	51.23	6.41	14.33	205.25	.91	5	.47
	<b>Viabilidad</b>	5	61.20	7.58	16.96	287.61	.94	5	.66
	<b>Host</b>	5	57.35	5.77	12.91	166.56	.92	5	.55
	<b>Concentración</b>	5	117.60	42.44	94.90	9006.30	.84	5	.18
	<b>IFA</b>	5	17.16	5.26	11.77	138.57	.73	5	.02*

El nivel de significancia se estableció en 0.05 para la evaluación de normalidad.

\*Los datos marcados no siguen una distribución normal.

**Anexo N°2.** Medida de la heterogeneidad del índice de fragmentación de ADN espermático (IFA) entre los grupos que componen el transporte de la muestra.

<b>IFA</b>	
<b>U de Mann-Whitney</b>	55,00
<b>Z</b>	-1,63
<b>Sig.</b>	,11

**Anexo N°3.** Estadísticos descriptivos de los parámetros espermáticos en su totalidad.

	n	Media	Error estándar de la media	Desviación estándar	Varianza	Shapiro-Wilk		
						Estadístico	gl	Sig.
<b>Movilidad Progresiva</b>	45	23.09	2.28	15.32	234.73	0.95	45	0.05
<b>Movilidad No Progresiva</b>	45	20.82	1.34	8.98	80.66	0.92	45	0.01*
<b>Inmovilidad</b>	45	56.09	3.29	22.10	488.29	0.95	45	0.07
<b>Viabilidad</b>	40	64.53	2.53	15.97	255.13	0.91	40	0.00*
<b>Test de HOS</b>	36	63.24	2.38	14.29	204.34	0.97	36	0.41
<b>Concentración</b>	45	139.31	22.55	151.27	22882.88	0.74	45	0.00*
<b>IFA</b>	45	20.98	4.85	32.54	1058.64	0.64	45	,000*

El nivel de significancia se estableció en  $p\text{-valor} < 0.05$  para la evaluación de normalidad.

\*Los datos marcados no siguen una distribución normal.

**Anexo N°4.** Correlación no paramétrica entre el índice de fragmentación de ADN espermático (IFA) y algunos parámetros espermáticos.

El nivel de significancia se estableció en  $p\text{-valor} < 0.05$ .

		Mov. Progresiva	Mov. No Progresiva	Inmóviles	Viabilidad	Test Hos	Concentración Espermática
<b>IFA</b>	<b>Rho</b>	-,40*	-.19	,34*	-.12	-.22	-,47*
	<b>Sig.</b>	.01	.21	.02	.45	.19	.00
	<b>n</b>	45	45	45	40	36	45

\*Los datos marcados son significativos.

**Anexo N°5.** Prueba de Kruskal Wallis para determinar la similitud de los valores de índice de fragmentación de ADN espermático (IFA) y la calidad espermática según Valdivia et al. (2019).

	<b>Chi-cuadrado</b>	<b>gl</b>	<b>Sig.</b>
<b>IFA</b>	8.00	2	.02

**Anexo N°6.** Estadísticos descriptivos para los patrones de dispersión de la cromatina espermática (SCD).

<b>Patrones de dispersión cromatínica</b>	<b>n</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media</b>	<b>Error estándar de la media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Varianza</b>
Halo grande	31	0	99.55	60.79	6.30	35.05	1228.85
Halo medio	31	0	52.19	13.32	2.68	14.92	222.68
Halo pequeño	31	0	67.13	10.44	2.80	15.57	242.53
Sin Halo	31	0	100.00	15.45	5.77	32.15	1033.57

**Anexo N°7.** Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para la heterogeneidad del índice de fragmentación de ADN (IFA) antes y después de la selección espermática.

	<b>N</b>	<b>Z</b>	<b>Sig.</b>
<b>Diferencial entre pre y post capacitación espermática</b>	17	-.497	.619

**Anexo N°8.** Estadísticos descriptivos de los índices de fragmentación espermática inicial y post capacitación swim up dentro de una misma muestra.

IFA	n	Media	Mediana	Error estándar de la media	Desviación estándar	Varianza	Shapiro-Wilk para la diferencia de las medidas		
							Estadístico	gl	Sig.
Inicial	17	12.04	4.54	5.23	21.57	465.36	0.33	17	0.00
Swim up	17	6.78	3.87	1.64	6.77	45.85			

Anexo N°9. Desarrollo embrionario por fechas.

Fecha 19/06/2019

IFA	Total de ovocitos maduros	20 horas post fecundación	72-96 horas post fecundación			120-168 horas post fecundación			Degenerados Total
		Fecundados	División	mórula	Degenerados del estadio	División	mórula	blastocito	
1.95%	6	3	2	1	0	1	0	-	2
5.21%	4	1	0	0	0	0	0	0	0

Fecha 24/09/2021

IFA	Total de ovocitos maduros	20 horas post fecundación	72-96 horas post fecundación			120-168 horas post fecundación			Degenerados Total
		Fecundados	División	mórula	Degenerados del estadio	División	mórula	blastocito	
3.53%	8	0	0	0	0	0	0	0	0
4.26%	33	12	7	5	1	4	4	0	4

Fecha 30/09/2021

IFA	Total de ovocitos maduros	20 horas post fecundación	72-96 horas post fecundación			120-168 horas post fecundación			Degenerados Total
		Fecundados	División	mórula	Degenerados del estadio	División	mórula	blastocito	
1.89%	17	5	1	4	1	1	4	0	1
4.91%	5	2	1	1	0	0	0	0	1
2.38%	14	1	1	0	0	1	0	0	0

Fecha 29/10/2021

IFA	Total de ovocitos maduros	20 horas post fecundación	72-96 horas post fecundación			120-168 horas post fecundación			Degenerados Total
		Fecundados	División	mórula	Degenerados del estadio	División	mórula	blastocito	
1.61%	12	4	2	2	1	2	1	0	1
2.29%	12	2	1	0	1	1	0	0	1

IFA	TOTAL DE OVOCITOS MADUROS INSEMINADOS	20 horas		72-96 horas			120-168 horas			DEGENERADOS TOTALES ACUMULADOS
		FECUNDADOS	EMBRIONES <8 CELULAS	MÓRULA	DEGENERADOS DEL ESTADIO	EMBRIONES <8 CELULAS	MÓRULA	BLASTOCITO		
<b>Grupo A</b>	Recuento	12	5	7	1	4	4	0	4	
(<2%)	35 % dentro del grupo	34.29% <sup>a</sup>	14.29% <sup>b</sup>	20% <sup>c</sup>	2.86% <sup>d</sup>	11.43% <sup>e</sup>	11.43% <sup>f</sup>	0% <sup>h</sup>	11.43% <sup>i</sup>	
<b>Grupo B</b>	Recuento	3	2	0	1	2	0	0	1	
(2-4%)	34 % dentro del grupo	8.82%	5.88%	0%	2.94%	5.88%	0%	0%	2.94%	
<b>Grupo C</b>	Recuento	14	8	5	1	4	4	0	6	
(4-6%)	42 % dentro del grupo	33.33% <sup>a</sup>	19.05% <sup>b</sup>	11.90% <sup>c</sup>	2.38% <sup>d</sup>	9.52% <sup>e</sup>	9.52% <sup>f</sup>	0% <sup>h</sup>	14.29% <sup>i</sup>	

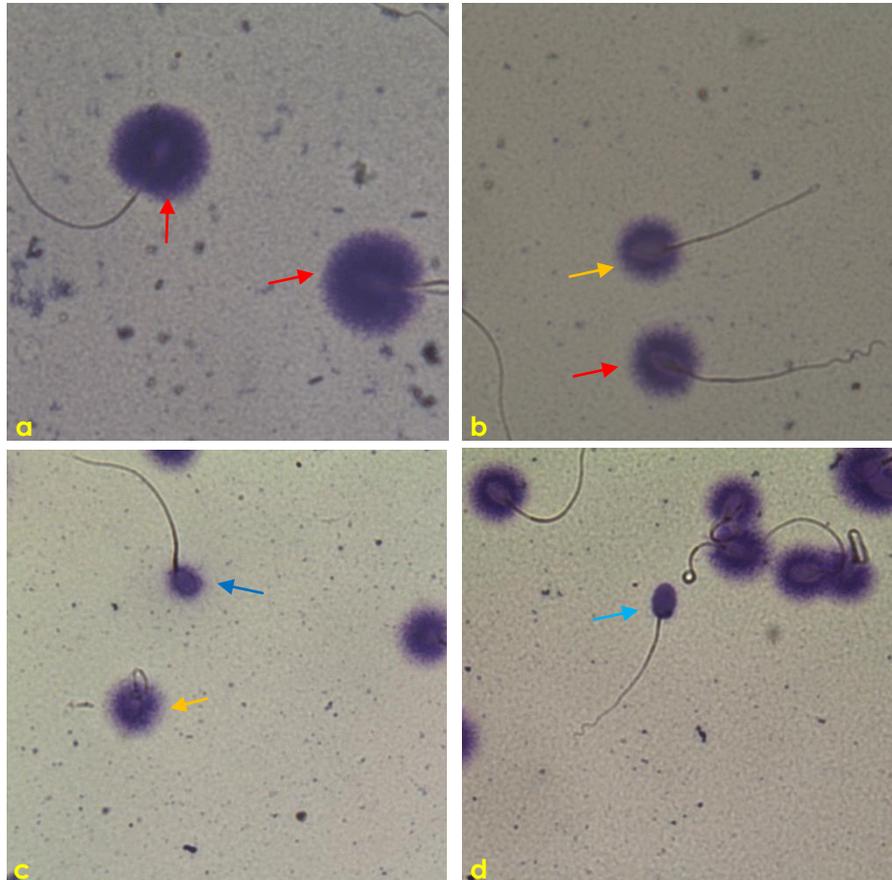
**Anexo N°10.** Resumen del desarrollo embrionario.

<sup>a,b,c,d,e,f,h,i</sup> Los superíndices iguales dentro de las columnas indican que no hubo diferencias significativas (p>0.05).

**Anexo N°11.** Pruebas de significancia usando el estadístico Chi-cuadrado.

		<b>Estadígrafo</b>	<b>gl.</b>	<b>Sig.</b>	
<b>Grupo A-C</b>	<b>20 h post FIV</b>	Fecundación	$X^2 = 0.008$	1	0.930
	<b>72-96 h post FIV</b>	Mórula	$X^2 = 1.330$	1	0.249
		División	$X^2 = 0.619$	1	0.431
		Degenerados	$X^2 = 0.013$	1	0.720
	<b>120-168 h post FIV</b>	División	$X^2 = 0.069$	1	0.563
		Mórula	$X^2 = 0.069$	1	0.563
		Degenerados totales	$X^2 = 0.248$	1	0.464

**Anexo N°12.** Patrones de halos de dispersión cromática de espermatozoides epididimarios de alpaca usando la técnica SCD



Muestras espermáticas de diferentes individuos visto a 40x al microscopio óptico.

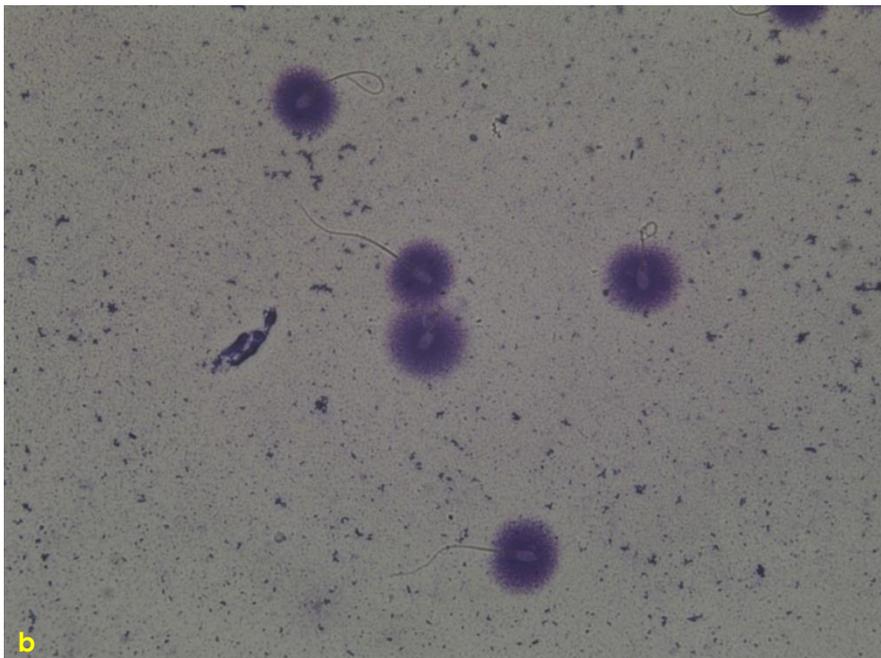
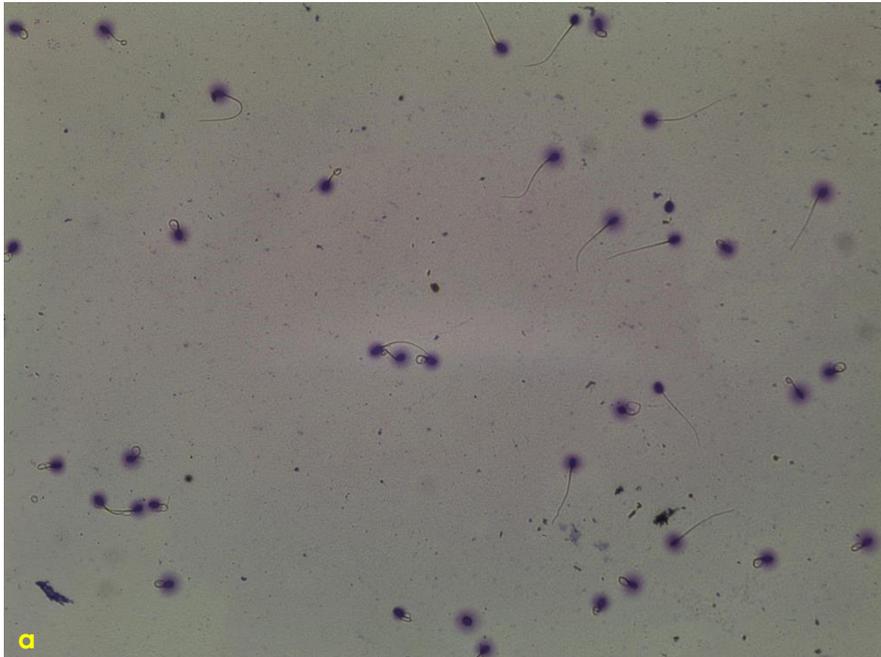
Flecha roja: espermatozoide con halo grande

Flecha naranja: espermatozoide con halo mediano

Flecha azul: espermatozoide con halo pequeño

Flecha celeste: espermatozoide sin halo

**Anexo N°13.** Foto de espermatozoides analizados por la técnica SCD

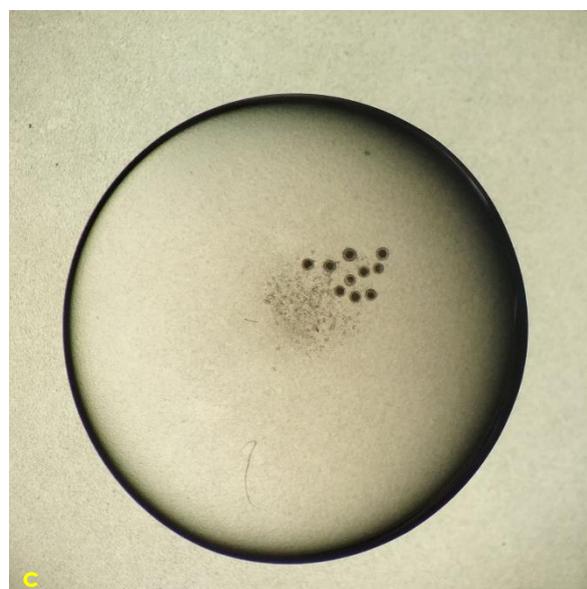


Muestras espermáticas analizadas por el ensayo SCD.

**a.** espermatozoides vistos a 20x al microscopio óptico de campo claro.

**b.** espermatozoides vistos a 40x al microscopio óptico de campo claro.

**Anexo N°14.** Registro fotográfico de la fecundación *in vitro*.

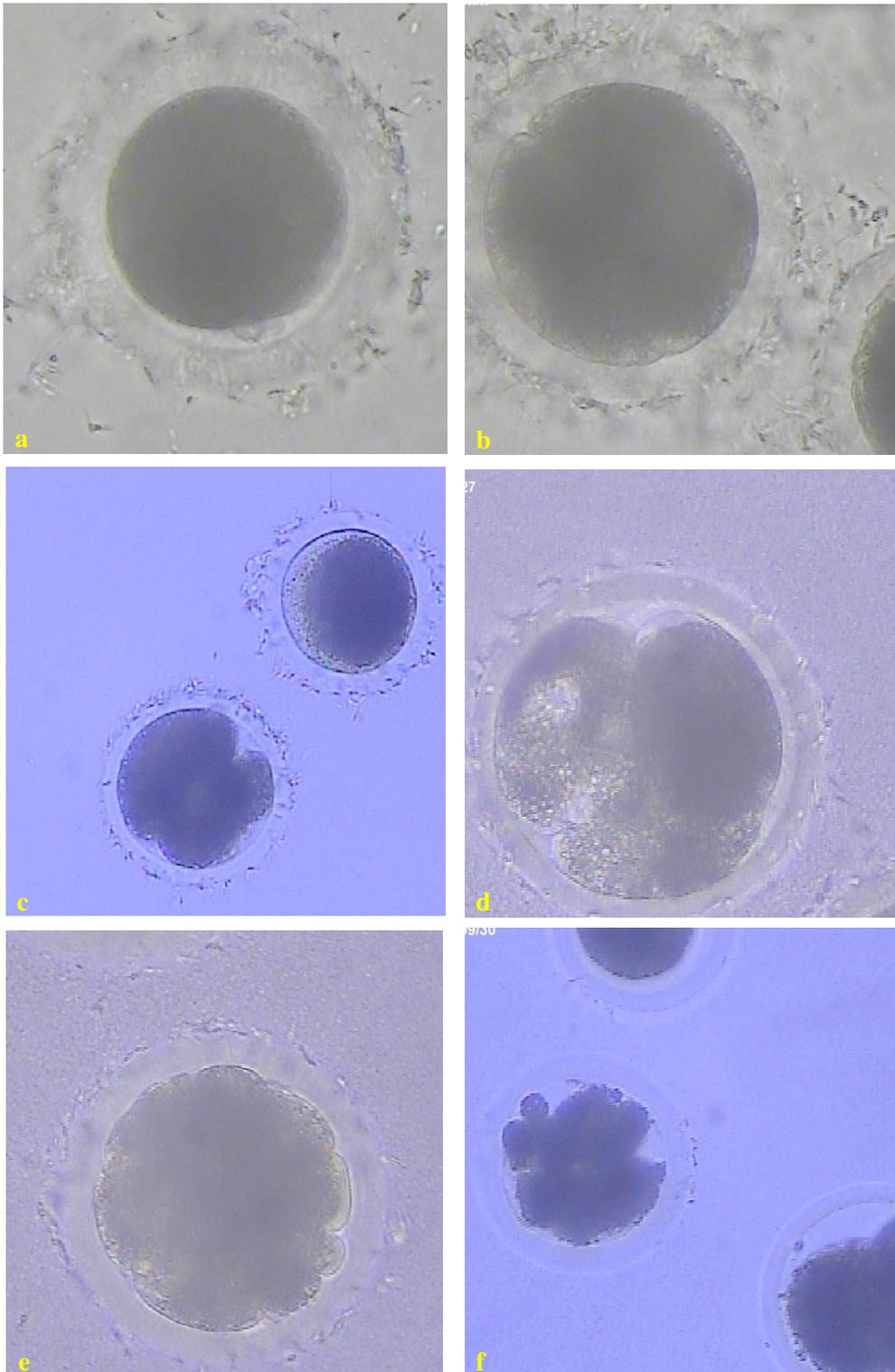


**a.** Preparación y carga de los gametos masculinos.

**b.** Fecundación en placa de cultivo.

**b.** Ovocitos vistos 4X al estereoscopio.

**Anexo N°15.** Fotos de embriones obtenidos.



**a.** Embrión visto a las 20h post FIV, nótese la extrusión del 2º polocito.

**b. y c.** Embriones detenidos en los primeros clivajes celulares.

**d.** Embrión detenido en tres células, visto a las 120h post FIV.

**e.** Mórula grado 2, 120h post FIV.

**f.** Mórula grado 4, visiblemente degenerada a las 168h post FIV.