

IMPLEMENTACIÓN DE LA PRUEBA DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD) PARA EVALUAR LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN ALPACAS

Fidel R. Mujica Lengua, Mijail Contreras Huamani¹, Crisstel Y. Guillén Palomino¹

Unidad de Investigación e Innovación de Ciencias Biológicas

Programa de Investigación: Biodiversidad y Gestión Ambiental -Línea de Investigación: Biodiversidad

E-mail: fidel.mujica@unsch.edu.pe

RESUMEN

La integridad de la cromatina espermática se considera ahora un factor importante en la fertilidad masculina y en el desarrollo embrionario temprano. Los objetivos de este estudio fueron: (1) Registrar las características seminales de las alpacas en estudio, (2) Implementar la prueba simple y barata de dispersión de la cromatina espermática (SCD) para evaluar la fragmentación del ADN espermático en alpacas y (3) adoptar un control positivo confiable para esta técnica. Se trabajó con 10 alpacas con tres repeticiones ($n = 10$; $r = 3$), ocho de las cuales eran del fenotipo Huacaya y dos del fenotipo Suri. Las características seminales fueron típicas de la especie, observándose una amplia dispersión en los datos. La prueba SCD permitió establecer el porcentaje de “Halos” de dispersión de la cromatina espermática (ausencia de fragmentación) y porcentaje de “No halos” (presencia de fragmentación); sin embargo, no se encontró diferencia significativa ($P = 0.05$) entre los promedios de porcentajes de “No halos”, entre los reproductores que mostraron de manera general “alta calidad” seminal o “baja calidad” seminal, basada en volumen, concentración y motilidad espermática. El tratamiento con NaOH 0.3M por 30 min, utilizado como control positivo, fue efectivo en la producción de fragmentación de ADN espermático. La prueba SCD es una técnica sencilla y barata que puede usarse para evaluar el daño del ADN espermático en alpacas.

Palabras clave: fragmentación del ADN, halo de dispersión, calidad seminal.

IMPLEMENTATION OF THE DISPERSION TEST OF THE SPERM CHROMATIN (SCD) TO EVALUATE THE DNA FRAGMENTATION IN ALPACAS

ABSTRACT

The integrity of sperm chromatin is now considered an important factor in male fertility and early embryonic development. The objectives of this study were: (1) To record the seminal characteristics of the alpacas under study, (2) To implement the cheap and simple test of dispersion of sperm chromatin (SCD) to evaluate the fragmentation of sperm DNA in alpacas and (3) adopt a reliable positive control for this technique. We worked with 10 alpacas with three replications ($n = 10$; $r = 3$), eight of which were of the Huacaya phenotype and two of the Suri phenotype. The seminal characteristics were typical of the species, observing a wide dispersion in the data. The SCD test allowed establishing the percentage of “Halos” of dispersion of the spermatid chromatin (absence of fragmentation) and the percentage of “No halos” (presence of fragmentation); however, no significant difference ($P = 0.05$) was found between the percentages of “No halos” percentages, among the broodstock that generally showed seminal “high quality” or seminal “low quality”, based on volume, concentration and sperm motility. Treatment with 0.3M NaOH for 30 min, used as a positive control, was effective in producing spermatid DNA fragmentation. The SCD test is a simple and inexpensive technique that can be used to assess sperm DNA damage in alpacas.

Keywords: *DNA fragmentation, halo of dispersion, seminal quality.*

INTRODUCCIÓN

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de las glándulas accesorias del aparato reproductor masculino, la porción líquida de dicha suspensión, se conoce como plasma seminal (SP). El semen de la alpaca presenta características limitantes particulares propias de la especie, tales como, baja concentración de espermatozoides, alto porcentaje de espermatozoides anormales, extrema filancia (formación de hilo) y un plasma seminal con alta viscosidad que dificulta el desplazamiento rápido de los espermatozoides (Banda *et al.*, 2010; Casaretto *et al.*, 2012). Estas limitaciones dificultan la implementación de biotecnologías reproductivas tan básicas como la inseminación artificial con semen congelado. El eyaculado de la alpaca varía en volumen de 0.4 a 6.6 ml con un color entre blanco lechoso a cristalino (Sumar y Leyva, 1981). La motilidad se encuentra entre 30 y 80%, teniendo una concentración de 30 a 150 millones por mililitro (Bravo *et al.*, 2000;

Vaughan et al., 2003; Rivera, 1998). También la vitalidad varía entre 44.15 y 70.04% (Fernández *et al.*, 2003; Ericsson *et al.*, 1989).

¹Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de Camélidos Sudamericanos. INIA-Ayacucho

Adicionalmente, la presencia de defectos en el material genético, tales como: anomalías en la condensación de la cromatina espermática, fragmentación del ADN espermático o la presencia de anomalías en los cromosomas (aneuploidías) durante la espermatogénesis, están estrechamente asociadas con la infertilidad masculina y afectan el desarrollo embrionario temprano (Aravindan *et al.*, 1997; Tsarev *et al.*, 2009). Se conocen diversas técnicas para evaluar estos defectos en el material genético, la mayoría de las cuales son poco accesibles porque son complicadas, caras y requieren de equipos sofisticados como microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007). La prueba SCD, por lo contrario, es sencilla, barata y no requiere de instrumentos sofisticados.

Diversos autores reconocen y recomiendan la prueba SCD para evaluar la fragmentación del ADN espermático con valor diagnóstico no solamente en animales, sino también en humanos (Portella *et al.*, 2013). El principio de la prueba SCD consiste en que cuando las células somáticas o los espermatozoides con ADN no fragmentado se sumergen en una matriz de agarosa, se tratan con una solución ácida y luego se exponen directamente a soluciones de lisis, al colorearse con Wright o Giemsa, los núcleos desproteinizados resultantes se observan al microscopio de campo claro como “Halos” extendidos de dispersión del ADN. Los halos corresponden a bucles de ADN relajados unidos a la estructura nuclear residual. Estos núcleos desproteinizados se denominan "nucleoides". Por lo contrario, la presencia de roturas de ADN promueve la expansión de los halos de los nucleoides, que se observan al microscopio de campo claro como “No halos” y es la base de la prueba SCD para detectar daños en el ADN (Fernández *et al.*, 2003). Estos resultados han sido confirmados mediante ensayos de DBD-FISH (del inglés, *DNA Breakage Detection-FISH*). En humanos, la prueba SCD se utiliza para calcular previamente el Índice de Fragmentación Espermática (IFE), antes de iniciar un procedimiento de ICSI (del inglés, *Intracytoplasmic Sperm Injection*) o IVF (del inglés, *In Vitro Fertilization*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y ubicación

Se trabajó con 10 reproductores entrenados, programados en el plan semanal de colecta de semen durante el período de evaluación (agosto a setiembre del 2019), pertenecientes a la Estación Experimental Agraria “Canaán” del INIA-Ayacucho, cuyas edades oscilaron entre 3 y 6 años y pesos entre 60 a 65 Kg, los mismos que se mantuvieron parcialmente estabulados con un régimen alimentario consistente en pasto natural, alfalfa, eno y avena.

Colección de semen

La colección de semen se hizo utilizando una vagina artificial acoplada a un maniquí en posición receptiva (Sumar y Leiva, 1981; Bravo, 1987). Luego de que el macho eyaculó completamente, la muestra de semen se transportó inmediatamente al laboratorio, manteniéndose la temperatura a 37°C en todo momento y protegiendo el material de la luz solar.

Evaluación de semen fresco

Cada muestra fue registrada en la bitácora del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de Camélidos Sudamericanos del INIA-Ayacucho, considerando: fecha, identificación del macho (número de arete), colecta (tiempo de eyaculación en minutos), volumen (cantidad de eyaculado en mililitros), color (transparente, semi-lechoso, lechoso o blanco-lechoso), filancia (en centímetros), espuma (en centímetros cúbicos), concentración (con equipo CASA, en millones/ml) y motilidad (con equipo CASA, en porcentaje).

Prueba SCD (dispersión de la cromatina espermática)

Tanto el control positivo como las muestras de semen fresco de alpaca, fueron procesados utilizando la prueba SCD (Fernández *et al.*, 2003; Gosálvez *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2012; Halotech DNA, 2016).

a) Control positivo

El control positivo consistió en un tratamiento con NaOH 0.3M por 30 min a temperatura ambiente, del semen fresco de alpaca, seguido de su evaluación por la prueba SCD (Carretero *et al.*, 2012).

b) Evaluación de la fragmentación del ADN espermático en alpacas

Las muestras de semen fresco de alpaca fueron diluidas en medio PBS 0.2 M a pH 7,2 para obtener concentraciones en el rango de 5 a 10 millones de espermatozoides/ml. Las muestras de semen que tuvieron concentraciones de 90 millones/ml o menos, no fueron diluidas. Una cantidad de 10 µl de suspensión de espermatozoides fue mezclada

con 90 μ l de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Promega, USA), para obtener una concentración final de 0.7% de agarosa, mantenida a 37°C en tubo Eppendorf de 200 μ l sobre la platina térmica. A continuación, alícuotas de 50 μ l de esta preparación fueron pipeteadas sobre láminas portaobjetos recubiertas con agarosa de punto de fusión normal al 0.5% (Cleaver Scientific, UK), secadas a 37°C; e inmediatamente cada gota fue cubierta con una laminilla cubreobjetos, dejándose solidificar a 4°C por 10 min. Luego las laminillas cubreobjetos fueron retiradas cuidadosamente y las láminas se colocaron horizontalmente por 7 min a temperatura ambiente en un recipiente conteniendo solución de HCl 0.08N, recientemente preparada. Las láminas fueron enjuagadas con agua corriente filtrada y luego las proteínas fueron eliminadas por transferencia de las láminas a otro recipiente conteniendo *Solución neutralizante y de lisis 1* (Tris 0.4M, EDTA 50 mM, SDS al 1% y mercaptoetanol al 5% a pH 7,5). El mercaptoetanol se añadió en el momento y el SDS se utilizó en reemplazo del lauril sarcosina. Se dejó reaccionar por 20 min a temperatura ambiente y luego se enjuagó con agua corriente filtrada. A continuación, las láminas fueron sumergidas en otro recipiente conteniendo *Solución neutralizante y de lisis 2* (Tris 0.4M, NaCl 2 M y SDS al 1% a pH 7,5). El SDS se utilizó en reemplazo del lauril sarcosina. Se dejó reaccionar por 5 min a temperatura ambiente. Luego se enjuagó con agua corriente filtrada y se dejó secar a temperatura ambiente. Las láminas fueron deshidratadas en baños secuenciales de etanol al 70%, 85% y 96%, durante 2 min en cada una y secadas al aire. Finalmente, la preparación fue coloreada durante 5 min con Wright diluido en buffer fosfato a pH 7,4 en proporción 1:1 y observadas al microscopio óptico de campo claro con el objetivo de inmersión (100X). Un mínimo de 200 espermatozoides fue evaluado por muestra (ver Figura 1).

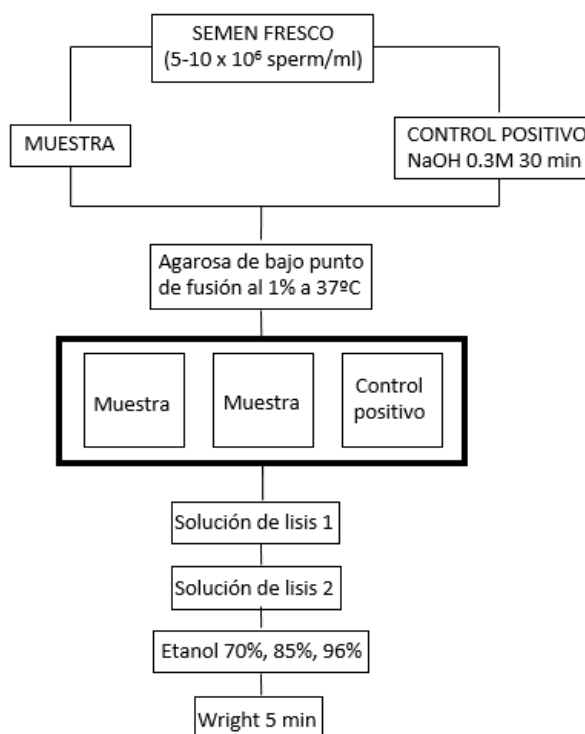


Figura 1. Diagrama de flujo del diseño experimental usado para el tratamiento de muestras de semen fresco de alpaca por la prueba SCD y evaluar la fragmentación del ADN espermático.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Colecta de semen de alpaca

Se realizó en las mañanas, a partir de las 7:30 a.m., de acuerdo al plan semanal de colecta de semen establecido por el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de Camélidos Sudamericanos del INIA-Ayacucho (ver Figura 2).

Evaluación de las características seminales de rutina

Los parámetros seminales de rutina, tanto macroscópicos como microscópicos (ver Tablas 3 y 4), fueron típicos de la especie y similares a los reportados previamente por otros autores (Bravo *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2010). Se observa una alta variación en los promedios de los parámetros espermáticos entre los reproductores (ver Tablas 1 y 2).

Control positivo de la prueba SCD

El tratamiento de semen de alpaca fresco con NaOH 0.3M por 30 min a temperatura ambiente y evaluado por la prueba SCD, produjo fragmentación del ADN en todos los espermatozoides de alpaca (ver Figura 3).

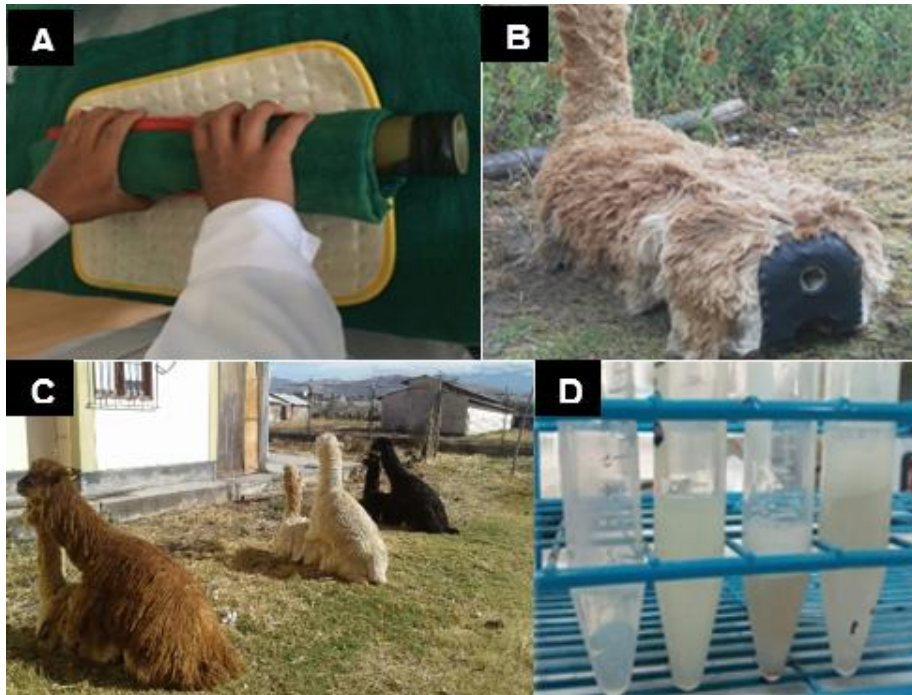


Figura 2. Colecta de semen de alpaca. (A) Preparación de la vagina artificial. (B) Maniquí con la vagina artificial acoplada. (C) Monta de los machos en los maniqués. (D) Semen de alpaca.

0

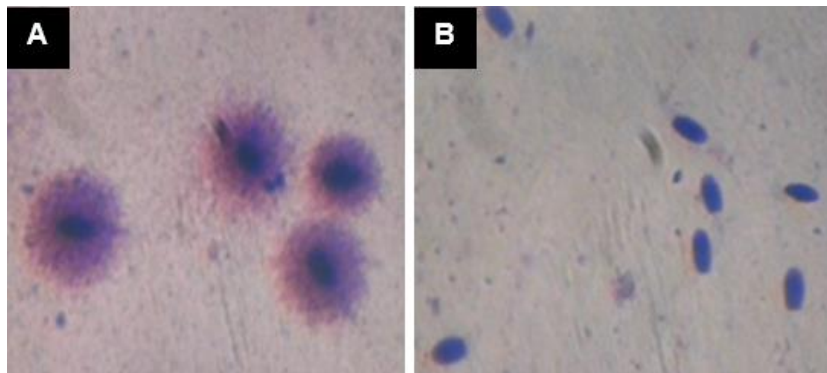


Figura 3. Patrones de la prueba SCD en alpacas. (A) Prueba SCD en semen fresco, donde se observan los núcleos con “Halos” de dispersión de la cromatina espermática. (B) Prueba SCD con el control positivo con NaOH 0.3M por 30 min, donde se observan los núcleos con “No halos”.

Tabla 1. Características seminales evaluadas en semen fresco (tiempo de colección, volumen, filancia, espuma, concentración y motilidad). Los valores están expresados en promedios individuales \pm SD ($r = 3$).

Nº	Macho (Nº arete)	Colección (min)	Volumen (ml)	Filancia (cm)	Espuma (cc)	Concentración (CASA, mill/ml)	Motilidad (CASA, %)
01	S/A	11.3 \pm 1.2	4 \pm 1.9	4 \pm 2.6	3.5 \pm 2.8	192 \pm 71.3	82.7 \pm 2.5
02	9210	12 \pm 1	1 \pm 0.2	1.3 \pm 0.6	1.7 \pm 0.6	81.3 \pm 6.5	49 \pm 6.5
03	30306	13.7 \pm 0.6	2.6 \pm 1.3	2.8 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3	108.7 \pm 68.6	42.7 \pm 2.5
04	643	20.3 \pm 1.5	1.3 \pm 0.3	0.6 \pm 0.4	0.4 \pm 0.1	76.3 \pm 22.7	61.7 \pm 2.9
05	12006	7.7 \pm 1.2	2.5 \pm 1.3	1.8 \pm 0.3	2.7 \pm 0.3	195 \pm 131.6	66.7 \pm 23.1
06	12010	14 \pm 1	3.6 \pm 0.8	2 \pm 0.5	4.7 \pm 0.6	209.3 \pm 19	61 \pm 3.6
07	13022	8.3 \pm 0.6	0.9 \pm 0.4	2.3 \pm 1.4	0.8 \pm 0.3	229 \pm 14	74.7 \pm 4.5
08	9184	14 \pm 1	0.5 \pm 0.1	2.6 \pm 0.4	0.4 \pm 0.1	289 \pm 7.9	81 \pm 3.6
09	9206	9.7 \pm 0.6	0.8 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	220 \pm 5	46 \pm 8.5
10	1989	13.3 \pm 0.6	0.5 \pm 0.1	2.2 \pm 0.3	1.6 \pm 0.2	63.3 \pm 6	51.7 \pm 6.5

Tabla 2. Promedio de las características seminales evaluadas en semen fresco ($n = 10$; $r = 3$).

	Colección (min)	Volumen (ml)	Filancia (cm)	Espuma (cc)	Concentración (CASA, mill/ml)	Motilidad (CASA, %)
Promedio	12.4	1.8	2	1.7	166.4	61.7
SD	\pm 3.6	\pm 1.3	\pm 1	\pm 1.5	\pm 77.8	\pm 14.4
Rango	7.7 - 20.3	0.5 - 4	0.6 - 4	0.1 - 4.7	63.3 - 289	42.7 - 82.7



Figura 4. Variación del volumen, concentración y motilidad en semen fresco de alpaca colectado por vagina artificial. Los valores están expresados en promedios ($n = 10$; $r = 3$).

Prueba SCD en semen fresco de alpaca

El porcentaje de “Halos” de dispersión de la cromatina espermática (ausencia de fragmentación) y “No halos” (presencia de fragmentación), se midió en los 10 reproductores ($r = 3$). Sin embargo, nuestro interés fue averiguar cómo varía el porcentaje de “No halos” entre los reproductores que mostraron de manera general “alta calidad” seminal o “baja calidad” seminal, basada en volumen, concentración y motilidad en ambos fenotipos Huacaya y Suri (ver Tablas 3 y 4). No se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P = 0.05$) entre los promedios de porcentajes de “No halos” de los cuatro reproductores del fenotipo Huacaya y de los dos reproductores del fenotipo Suri (ver Figuras 5 y 6). Adicionalmente, no se pudo correlacionar la fragmentación del ADN espermático individualmente con cada uno de los parámetros seminales considerados (volumen, concentración y motilidad) por no contar con una base de datos más grande, tanto en número de ejemplares como en repeticiones.

Tabla 3. Porcentaje de “Halos” y “No halos” de dispersión en muestras de semen fresco de “alta calidad” y de “baja calidad” de alpacas Huacaya, evaluados con la prueba SCD. Los valores están expresados en promedios \pm SD.

Macho (N° arete)	Fenotipo	Calidad seminal	Volumen (ml)	Concentración (CASA, mil/ml)	Motilidad (CASA, %)	Halos (%)	No halos (%)
13022	Huacaya	Alta	0.9 \pm 0.4	229 \pm 14	74.7 \pm 4.5	87.7 \pm 3.1	12.3 \pm 3.1
9184	Huacaya	Alta	0.5 \pm 0.1	289 \pm 7.9	81 \pm 3.6	89 \pm 1	11 \pm 1
643	Huacaya	Baja	1.3 \pm 0.3	76.3 \pm 22.7	61.7 \pm 2.9	85.7 \pm 1.5	14.3 \pm 1.5
1989	Huacaya	Baja	0.5 \pm 0.1	63.3 \pm 6	51.7 \pm 6.5	86 \pm 2.6	14 \pm 2.6

Tabla 4. Porcentaje de “Halos” y “No halos” de dispersión en muestras de semen fresco de “alta calidad” y de “baja calidad” de alpacas Suri, evaluados con la prueba SCD. Los valores están expresados en promedios \pm SD.

Macho (N° arete)	Fenotipo	Calidad seminal	Volumen (ml)	Concentración (CASA, mil/ml)	Motilidad (CASA, %)	Halos (%)	No halos (%)
S/A	Suri	Alta	4 \pm 1.9	192 \pm 71.3	82.7 \pm 2.5	87.3 \pm 3.5	12.7 \pm 3.5
12006	Suri	Baja	2.5 \pm 1.3	195 \pm 131.6	66.7 \pm 23.1	84 \pm 1	16 \pm 1

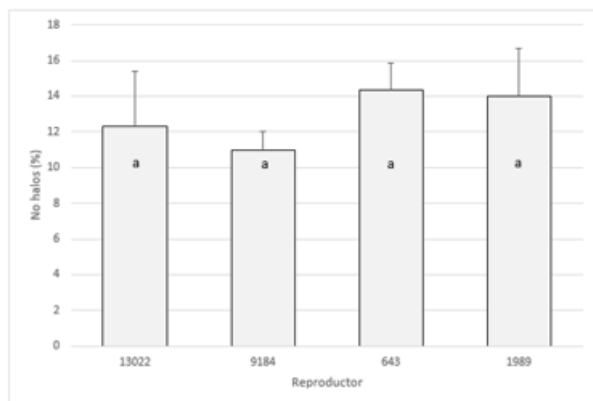


Figura 5. Promedio de porcentajes de “No halos” (presencia de fragmentación del ADN espermático) entre reproductores del fenotipo Huacaya, evaluados por la prueba SCD. Análisis de Varianza y Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$, $p>0.05$). Las medias con letras iguales no difieren significativamente.

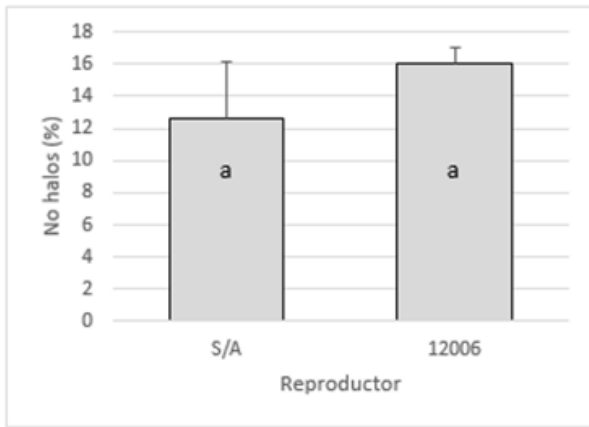


Figura 6. Promedio de porcentajes de “No halos” (presencia de fragmentación del ADN espermático) entre reproductores del fenotipo Suri, evaluados por la prueba SCD. Prueba t de Student. Las letras minúsculas iguales representan ausencia de diferencias estadísticas significativas ($P = 0.05$).

La colecta de semen se realiza de acuerdo al plan semanal establecido, de tal manera que cada macho hace el servicio en un promedio de dos veces por semana. Esta programación obedece a criterios técnicos donde se toma en cuenta la fisiología reproductiva del macho y el régimen alimentario, evitándose el desgaste en el rendimiento reproductivo del macho. El Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de Camélidos Sudamericanos del INIA-Ayacucho, maneja una bitácora donde se registra diariamente las condiciones de obtención de las muestras de semen y las características seminales. En general, es conocida la calidad seminal de los diferentes machos; sin embargo, con frecuencia se presentan casos de muestras de semen recientemente obtenidas pero que no muestran motilidad, las cuales no sirven para los diferentes procedimientos posteriores, es decir, deben ser descartadas. Incluso, aquellas muestras de semen fresco que tienen un bajo porcentaje de motilidad, menor a 50%, ya no sirven para posteriores experimentos que implican congelación en NL_2 a $-196^{\circ}C$ y descongelación, ya que es evidente que la criopreservación afecta significativamente la motilidad espermática, de tal forma que no es posible medir la diferencia.

La preparación y acondicionamiento de la vagina artificial (Figuras 2a y 2b) se hace diariamente a primera hora (7:30 a.m.), con la ayuda de todo el personal (trabajadores, tesistas y practicantes), ya que los machos posteriormente deben salir a pastear y no muestran interés por el maniquí. La conducta de los reproductores en relación a su interés por montar el maniquí es un tanto variable; si bien los machos están entrenados, en ocasiones no se logra colectar la muestra de semen (Figura 2c).

Las características seminales de rutina se reportan en la Tabla 1. La duración de la monta es variable entre los reproductores y dentro de cada reproductor, en promedio toma 12.4 min, con un rango de 7.7 a 20.3 min y una desviación estándar de ± 3.6 (Tabla 2). El personal debe estar muy atento al momento en que termina de eyacular el macho, ya que el exceso de tiempo posterior a la eyaculación afecta significativamente la motilidad espermática. No siempre se logra colectar una muestra completa de semen, en ocasiones, el macho solamente logra expulsar plasma seminal, que obviamente se descarta. El color normalmente varía en función de la concentración espermática, desde transparente, semi lechoso, lechoso hasta blanco lechoso (Figura 2d). La filancia y la espuma son características no deseables en general; sin embargo, son inevitables en las alpacas. Los parámetros espermáticos tales como volumen, concentración y motilidad (Tabla 1), muestran una dispersión marcada, es decir, que los datos individuales están bastante dispersos con respecto a la media. De acuerdo a la Tabla 2, en el volumen, se tiene un promedio de 1.8 ml, un rango de 0.5-4.0 ml y una desviación estándar de ± 1.3 ; en la concentración, se tiene un promedio de 166.4 mill/ml, con un rango de 63.3-289 mill/ml y una desviación estándar de ± 77.8 ; mientras que, en motilidad se tiene un promedio de 61.7% de motilidad progresiva, con un rango de 42.7-82.7%, con una desviación estándar de ± 14.4 . Esta elevada dispersión que se grafica en la Figura 4, explica probablemente por qué no existe estadísticamente diferencia significativa entre los reproductores que aparentemente muestran una “alta calidad” seminal frente a los que muestran una “baja calidad” seminal, cuando se relaciona la presencia de “No halos” de dispersión, es decir, de daño en el ADN espermático entre los reproductores, tanto del fenotipo Huacaya (Tabla 3 y Figura 5) y Suri (Tabla 4 y Figura 6). Pero también será necesario contar con una base de datos más grande, con mayor número de machos y con mayor número de repeticiones, para poder finalmente correlacionar, de manera individual, la fragmentación del ADN espermático con la edad de las alpacas, motilidad y viabilidad, conforme ha sido demostrado en humanos (Portella *et al.*, 2013).

La presencia de defectos en el material genético, tales como: anomalías en la condensación de la cromatina espermática, fragmentación del ADN espermático o la presencia de anomalías en los cromosomas (aneuploidías) durante la espermatogénesis, están estrechamente asociadas con la infertilidad masculina (Aravindan *et al.*, 1997; Tsarev *et al.*, 2009). Se conocen diversas técnicas para evaluar estos defectos en el material genético, la mayoría de las cuales son poco accesibles porque son complicadas, caras y requieren de equipos sofisticados como microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007).

Sobre la efectividad del tratamiento del control positivo con NaOH 0.3M por 30 min (ver Figura 9), ya Carretero *et al.* (2012) había concluido y recomendado utilizarlo en llamas por su facilidad de manejo. En su investigación, se emplearon tres tratamientos para los controles positivos: (1) incubación a 100°C por 30 min; (2) incubación con NaOH 0.3M por 30 min a temperatura ambiente; y (3) exposición a luz UV (36 W) por 2 h, con los cuales se observó que la fragmentación del ADN espermático se producía en todos los espermatozoides. Al respecto, Banks *et al.* (2005) observó que la integridad del ADN de los espermatozoides móviles de ratones recuperados de epidídimo se vio comprometida por el estrés del calor (42°C durante 30 min). Pérez-Crespo *et al.* (2008), utilizando el mismo tratamiento de choque térmico, obtuvo los mismos resultados en ratones con espermatozoides eyaculados. Con respecto al uso de una solución alcalina, Fernández *et al.* (2003) usando NaOH 0.03 M y NaCl 1 M obtuvo halos de dispersión más pequeños que cuando se usaba una solución ácida. En el estudio de Carretero *et al.* (2012), se utilizó una concentración mayor de NaOH (0.3M) y se indujo la fragmentación del ADN en todos los espermatozoides (se observaron espermatozoides sin halo), indicando que el aumento en la alcalinidad, además de la desnaturalización, parecería producir daño a la cromatina en todos espermatozoides, por lo que recomiendan su utilización como control positivo para las pruebas de integridad del ADN. La exposición a luz UV por 2 h (36 W) también fue igualmente eficaz en la producción de fragmentación de ADN. Este tratamiento estuvo basado en los estudios previos de Bordignon y Smith, 1999), donde se demostró que espermias de toro irradiados con UV utilizados en la FIV, fallaron para producir embriones que se desarrollaran más allá de la etapa de 2 células, sugiriendo que la irradiación UV puede destruir funcionalmente el componente genómico de los espermatozoides. Además, en la lamprea marina (Ciereszko *et al.*, 2005) y la trucha arcoíris (Dietrich *et al.*, 2005) los espermatozoides sometidos a radiación UV sufrieron un aumento en la fragmentación de ADN, pero no hubo cambios en la motilidad de los espermatozoides.

Diversos autores reconocen y recomiendan la prueba SCD para evaluar la fragmentación del ADN espermático con valor diagnóstico no solamente para animales, sino también para humanos (Portella *et al.*, 2013). Prueba de ello es que las principales clínicas de reproducción asistida de la capital de nuestro país, tales como Concebir, Miraflores, Procrear, CEFRA, Ricardo Palma, por citar algunas, utilizan los kits de Halotech DNA (España) para calcular previamente el Índice de Fragmentación Espermática (IFE), antes de iniciar un procedimiento de ICSI (del inglés, *Intracytoplasmic Sperm Injection*) o IVF (del inglés, *In Vitro Fertilization*). En nuestro caso, se puede decir que la prueba SCD para evaluar la fragmentación del ADN espermático en alpacas, está en proceso de implementación y requiere de mayores estudios. Encontrar las condiciones óptimas es un desafío. Ahora hemos tomado conocimiento de mayores detalles, desde el tratamiento inicial de las láminas portaobjetos, que debió hacerse lavándolas en agua caliente con detergente líquido, secándolas y limpiándolas con alcohol, pasando por el pretratamiento ácido con la aplicación de la solución desnaturalizante de HCl 0.08N en oscuridad, con lo que se generan motivos restringidos de ADN monocatenario (ADNss) a partir de las roturas del ADN, que facilitan la desprotección posterior (Fernández *et al.*, 2003); ajustar las concentraciones de los reactivos que comprenden la *Solución neutralizante y de lisis 1*, especialmente el DTT, SDS y el mercaptoetanol (Carretero *et al.*, 2012). Cabe precisar que, en nuestros ensayos no se utilizó DTT porque no se pudo conseguir. El DTT es fundamental porque permite mantener los grupos SH en estado reducido, minimizando la formación de uniones de disulfuro, que resulta clave para la desprotección del núcleo, es decir, para la eliminación de protaminas e histonas que se encuentran súper compactando el ADN unas 10 veces más que en una célula somática (DeRouchey *et al.*, 2013) y así permitir la formación de halos. Otra alternativa podría ser utilizar el reactivo lauril sarcosina en lugar del DTT (Carretero *et al.*, 20102).

En conclusión, se logró implementar, por primera vez, la prueba SCD para evaluar la fragmentación del ADN espermático en alpacas. El control positivo con NaOH 0.3M por 30 min a temperatura ambiente, produce daño en el ADN de todos los espermatozoides de alpaca. La fragmentación del DNA espermático en alpacas es mínima, con un rango entre 11 a 16% de “No halos” en semen fresco. Se logró registrar las características seminales del plantel de reproductores, las cuales dieron valores similares a los reportados por otros autores

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Estación Experimental Agraria “Canaán” del INIA-Ayacucho, por las facilidades brindadas en la colecta de semen. También queremos agradecer a las bachilleras en ciencias biológicas Harumi Orellana, Katherine Tacza y Marisol Vega por su disposición permanente de ayudarnos. Del mismo modo, nuestro agradecimiento al colega Blgo. Reynán Córdor por su colaboración en el análisis estadístico sobre parámetros

espermáticos y porcentajes de “no halos” o fragmentación del ADN espermático en alpacas macho de “alta calidad” seminal y “baja calidad” seminal, de los fenotipos Huacaya y Suri.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aravindan G, Bjordahl J, Jost L, Evenson D. Susceptibility of human sperm to *in situ* DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Exp. Cell Res.* 1997. 236(1): 231-237.
- Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú.* 2010. 21(2): 145-53.
- Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PTK. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction.* 2005. 129: 505–514.
- Bordignon V, Smith LC. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol. Reprod.* 1999. 61: 1513–1520.
- Bravo W, Skidmore A y Zhao X. Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. *Anim. Reprod. Sci.* 2000. 62: 173-193.
- Bravo W. Comparación de dos métodos de colección de semen en alpacas. 1987, X Reunión Científica Anual del APPA. UNA - PUNO Perú.
- Carretero M. I, Lombrado D, Arraztoa C.C, Giulian S. M, Gambarotta M.C, Neild D. M. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Anim Reprod Sci.* 2012. 131(1-2): 63-71.
- Casaretto, C, Martínez M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero I, y Miragaya M. Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer (Internet). Consultado el 23 de mayo del 2019. *Andrologia* 2012. 44:335-41.
- Ciereszko A, Wolfe TD, Dabrowski K. Analysis of DNA damage in sea lamprey (*Petromyzon marinus*) spermatozoa by UV, hydrogen peroxide, and the toxicant bisazir. *Aquat. Toxicol.* 2005. 73: 128–138.
- Cortés-Gutiérrez EI, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez. Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas.* 2007. 31(2): 120-131.
- Dietrich GJ, Szyrka A, Wojtczak M, Dobosz S, Goryczko K, Zakowski L., Ciereszko A. Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology.* 2005. 64(8): 1809–1822.
- Ericsson A, Garner L, Redelman D, Ahmad K. Assessment of the viability and fertilizing potential of cryopreserved bovine spermatozoa using dual fluorescent staining and two-flow cytometric systems (Internet). Consultado el 24 de mayo del 2019. *Gamete Res.* 1989. 22: 355-368. Disponible en:
- Fernández J, Muriel L, Rivero M, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez J. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl.* 2003. 24(1): 59-66.
- Gosálvez J., A. Gosálbez A, F Arroyo, JL Fernández, C López-Fernández. Assessing sperm DNA fragmentation in the field: an adaptation of sperm chromatin dispersion technology. *Biotechnic & Histochemistry.* 2008, 83(5): 247-252.
- Halotech DNA. Halomax, kit to assess sperm DNA fragmentation assessment in *Camelus dromedarius*. 2016. Madrid.
- Pérez-Crespo M, Pintado B, Gutiérrez-Adán A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Mol. Reprod. Dev.* 2008. 75(1): 40–47.
- Portella J, López M, Noriega L, Guzmán, L. (2013). Modelo predictivo de fragmentación de ADN espermático usando parámetros evaluados en un espermatograma. XVI Congreso Peruano de Medicina Reproductiva y I Congreso Latinoamericano de ISMAAR, 05-06 de setiembre. Lima.

Rivera, E. Uso de la yema de huevo y la glicerina en la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional del Altiplano. 1998. Puno-Perú.

Sumar J. y Leyva C. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). Memorias del IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. 22-27 Noviembre. 1981. Punta Arenas. Chile.

Tsarev I, Bungum M, Giwercman A, Erenpreisa J, Edessen T, Ernst E, Erenpreiss J. Evaluation of male fertility potential by toluidine blue test for sperm chromatin structure assessment. *Hum. Reprod.* 24(7): 1569-1574.

Vaughan J; Galloway D, Hopkins D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*): A report for the Rural Industries Research and Development Corporation (Internet). 2003 (Consultado el 24 de mayo del 2019). Barton ACT, Australia, RIRDC. 98 p.