Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
Unidad de Posgrado

Correlación entre los patrones de expresión del gen protamina 3 y 1 con parámetros de función espermática en alpacas

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal

AUTOR

Martha Alejandra UGARELLI GALARZA

ASESOR

Dr. Alexei Vicent SANTIANI ACOSTA

Lima, Perú

2023



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

Ugarelli M. Correlación entre los patrones de expresión del gen protamina 3 y 1 con parámetros de función espermática en alpacas [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Martha Alejandra Ugarelli Galarza.
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	70947689
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-1254-1571
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Alexei Vicent Santiani Acosta
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10650758
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9740-5490
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Adriana Pilar Urviola García
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	45999673
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Edwin Alberto Mellisho Salas
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	32042572
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Joel Ivan Pacheco Curie
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40112676
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	Alexei Vicent Santiani Acosta
Tipo de documento	DNI

Número de documento de identidad	10650758
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.3. Biotecnología en Recursos Genéticos
Grupo de investigación	Grupo de investigación en reproducción y Sanidad Animal- GIRESA
Agencia de financiamiento	Perú. Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) y cofinanciado por la Universidad Científica del Sur. E041-2016-01, contrato 118-2016.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: (Si se trata de una investigación en laboratorio, universidad, empresa o institución) País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Villa el Salvador y San Borja. Lugar: - Universidad Científica del Sur Coordenadas: Q2HF+88 Villa EL Salvador - Universidad nacional Mayor de San Marcos. Coordenadas: W296+8W San Borja
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Obligatorio. Ejemplo: Marzo 2018 - marzo 2022
URL de disciplinas OCDE	Biología reproductiva https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIA ANIMAL CON MENCIÓN EN PRODUCCIÓN Y REPRODUCCIÓN ANIMAL

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 11:00 horas del día viernes 13 de enero del 2023, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por la Mg. Adriana Pilar Urviola García y conformado por los siguientes miembros docentes: Mg. Joel Iván Pacheco Curie, Dr. Edwin Alberto Mellisho Salas y Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta (Asesor), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"CORRELACIÓN ENTRE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DEL GEN PROTAMINA 3 Y 1 CON PARÁMETROS DE FUNCIÓN ESPERMÁTICA EN ALPACAS", presentado por la Bachiller:

MARTHA ALEJANDRA UGARELLI GALARZA

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO, (18) DIECIOCHO**_____

A continuación, el jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal, a la Bachiller Martha Alejandra Ugarelli Galarza.

Siendo las 12:30 horas del día viernes 13 de enero de 2023, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

.....
Mg. Adriana Pilar Urviola García (P.A. T.C.)
Presidente

.....
Mg. Joel Iván Pacheco Curie (P.A.T.C.)
Miembro

UNMSM
Firmado digitalmente por SANTIANI ACOSTA Alexei Vicent FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 23.03.2023 14:15:31 -05:00

.....
Dr. Edwin Alberto Mellisho Salas
Miembro (Externo)

.....
Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta (P.P. T.C.)
Miembro (Asesor)

UNMSM
Firmado digitalmente por GAVIDIA CHUCAN Cesar Miguel FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 23.03.2023 18:50:53 -05:00

.....
Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado UNMSM

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

1. FACULTAD: **Medicina Veterinaria**

2. UNIDAD DE POSGRADO: **Medicina Veterinaria**

3. AUTORIDAD ACADÉMICA QUE EMITE EL INFORME DE ORIGINALIDAD: **Director UPG-FMV-UNMSM**

4. APELLIDOS Y NOMBRES DE LA AUTORIDAD ACADÉMICA: **Gavidia Chucán, César Miguel**

5. OPERADOR: **César Miguel Gavidia Chucán**

6. DOCUMENTO EVALUADO: **Correlación entre los patrones de expresión del gen protamina con parámetros de fertilidad espermática en alpacas.**

a. Proyecto de Tesis de Maestría ☐
b. Proyecto de Tesis de Doctorado ☐
c. Tesis de Doctorado ☐
d. Tesis de Maestría [x]
e. Trabajo de Segunda Especialidad ☐
f. Otros ☐

7. AUTOR DEL DOCUMENTO: **Martha Alejandra Ugarelli Galarza**

8. FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO: **29 de enero de 2021**

9. FECHA DE APLICACIÓN DEL PROGRAMA INFORMÁTICO DE SIMILITUDES: **01de febrero de 2021**

10. PROGRAMA UTILIZADO

a. Turnitin [x]
b. Ithenticate ☐
c. Otro (especificar) ☐

11. CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUDES

a. Excluye textos entrecomillados [x]

b. Excluye bibliografía [x]

c. Excluye cadenas menores a 40 palabras [x]

d. Otro criterio (especificar) [ ]

12. PORCENTAJE DE SIMILITUDES SEGÚN PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUES

5 %

13. FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS:
se adjunta reporte del programa

14. OBSERVACIONES:
Ninguna

15. CALIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD

a. Documento cumple criterio de originalidad, sin observaciones [x]

b. Documento cumple criterio de originalidad, con observaciones [ ]

c. Documento no cumple con criterio de originalidad. [ ]

16. FECHA DEL INFORME
02de febrero de 2021



Dr. César Gavidia Chucán
Director de la UPG

DEDICATORIA

A mi familia y amigos, que me acompañaron en todo este proceso. Su confianza y apoyo me brindo la fuerza necesaria para lograr esta nueva meta en mi vida. Sin ustedes nada de esto hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTO

Esta investigación se realizó como parte del proyecto "Caracterización de marcadores moleculares en genes relacionados a espermatogénesis y fertilidad espermática a partir de transcriptomas de testículo y epidídimo de alpaca" con código: E041-2016-01, contrato 118-2016, financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) y cofinanciado por la Universidad Científica del Sur.

A mi familia por todo el tiempo que me apoyaron a seguir, por perdonar todo el tiempo que tuve que sacrificar para cumplir este sueño, su paciencia y amor. Sin ustedes no hubiera podido lograr nada.

A la Mg. M.V. Shirley Evangelista por confiar en mí, en mis capacidades, actitudes, y ayudarme a iniciar un camino en la investigación. Gracias por creer en mí, tanto en las buenas como en las malas, he y sigo aprendiendo mucho de ti, no solo como colega y profesional, también como una buena amiga, gracias por todo.

A todos amigos y familiares que de alguna u otra manera supieron entenderme y apoyarme en todo este tiempo, tuvieron la paciencia de escucharme y darme apoyo moral. Muchas gracias.

ÍNDICE

DEDICATORIA…….. II

AGRADECIMIENTO……. III

ÍNDICE DEL CONTENIDO……..... IV

RESUMEN…….. VI

ABSTRACT…… VII

LISTA DE CUADROS…… VIII

LISTA DE FIGURAS……. IX

LISTA DE ANEXOS…….. X

I. INTRODUCCIÓN……... 1

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA……... 3

2.1 La importancia de la crianza de Camélidos Sudamericanos…….. 3

2.2 Criterios de selección de reproductores……. 4

a. Selección de reproductores por características fenotípicas…… 4

b. Selección de reproductores en base a la evaluación convencional de semen……..... 5

c. Selección de reproductores en base a evaluación de parámetros defunción espermática……..... 6

d. Selección de reproductores en base a marcadores moleculares……. 10

2.3 Marcadores moleculares de importancia reproductiva en animales de producción……..... 10

a. Gen protamina (PRM)…… 12

b. Proteínas protaminas (P)…… 13

III. MATERIALES Y MÉTODOS……..... 17

3.1 Muestreo…….. 17

a. Muestreo para la obtención del ARNm……. … 17

b. Muestreo para la obtención de los espermatozoides epididimarios…… 18

3.2 Procedimiento experimental…… 19

3.2.1 Procedimiento para determinar la expresión del gen PRM3…….. 19

a. Diseño de cebadores…….. 19

b. Extracción del ARN…….. 22

c. Formación del ADNc…… 22

d. Validación de cebadores in vivo …….. 23

e. Cuantificación de la expresión del gen PRM3……..... 24

3.2.2 Procedimiento para la evaluación de los parámetros de función espermática…….. 25

a. Evaluación de la integridad acrosomal, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial……..... 25

b. Evaluación del porcentaje de protaminas en el ADN espermático…… 25

c. Evaluación de resultados mediante citometría de flujo con imágenes….. 26

d. Lectura de resultados……. 26

3.2.3 Análisis estadístico……. 28

IV.RESULTADOS……..... 29

4.1 Determinación de la expresión del gen PRM3……. 29

4.2 Correlación entre la expresión del gen PRM3 y los parámetros de función espermática……. 30

4.3 Evaluación de los parámetros de función espermática……. 30

V.DISCUSIÓN…… 31

VI.CONCLUSIONES……. 37

VII.RECOMENDACIONES……. 38

VIII. LITERATURA CITADA……. 39

RESUMEN

La selección de reproductores en base a marcadores moleculares para genes relacionados a fertilidad en alpacas podría reducir todos los inconvenientes que se tiene al hacer una evaluación seminal básica o de función espermática. Las protaminas son proteínas asociadas a la hipercompactación del ADN espermático, confiriéndole mayor protección en su trayecto por el aparato reproductor de la hembra. Estas proteínas son expresadas por una familia de genes llamadas del mismo nombre, la cual posee variantes. El objetivo del presente estudio fue correlacionar los niveles de expresión de las variantes PRM3 y PRM1 con parámetros de función espermática en alpacas. Para esto se emplearon 47 testículos con sus respectivos epidídimos. Para la expresión, se obtuvo la muestra directamente de tejido testicular mientras que, los espermatozoides para la evaluación de la función espermática se recuperaron de la cola del epidídimo de los mismos testículos Primero se diseñaron los cebadores (fordward y reverse) *in silico*, de la PRM3 en base a la secuencia predicted dentro del NCBI,y para el gen PRM1 mediante el alineamiento de las secuencias homologas del gen en especies filogenéticamente relacionadas. Los cebadores seleccionados fueron corridos en gel de agarosa para visualizar la coincidencia de amplicones, quedándonos solo con un par de cebadores del gen PRM3. Los niveles de expresión relativa de este gen fueron de 79 con un Ct value de 32.75, lo que nos indica que poseen una expresión alta. Además, se encontró correlación significativa de -0.85 entre la expresión del gen y la ausencia de protaminas ($p<0.005$); sin embargo, la correlación entre la expresión relativa del gen PRM3 y parámetros de integridad acrosomal, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial no fueron significativos. Con este estudio se pudo determinar la presencia del gen protamina 3 en alpacas; además se determinó que la expresión del gen PRM3 fue alta, lo que indica alta producción de protamina 3 en el espermatozoide de alpaca.

Palabras clave: Alpaca, gen, expresión, PRM, protamina

ABSTRACT

The reproductive selection based on molecular markers of fertility genes could decrease all the inconveniences around basic seminal evaluation or sperm function in alpacas. Protamines are proteins attached to sperm DNA hypercompaction of, providing greater protection as it passess throug pass female tract. These proteins are expressed by a family of genes tat bear the same name and include diferente variants. The aim of this study was to correlate the expression levels of the PRM3 and PRM1 variants with sperm function parameters in alpacas. For this, 47 testicles with their respective epididymis were used. For expression, the sample was obtained directly from testicular tissue, while the spermatozoa for the evaluation of spermatic function were recovered from the tail of the epididymis of the testicles. First, the primers (forward and reverse) were designed in silico, from the PRM3 based on the sequence predicted within the NCBI, and for the PRM1 gene by aligning the homologous sequences of the gene in phylogenetically related species. The selected primers were run on agarose gel to visualize the coincidence of amplicons, leaving only a pair of primers for the PRM3 gene. The relative expression levels of this gene were 79 with a Ct value of 32.75, which indicates that they have a high expression. In addition, a significant correlation of -0.85 was found between the expression of the gene and the absence of protamines ($p<0.005$); however, the correlation between the relative expression of the PRM3 gene and parameters of acrosome integrity, viability, and mitochondrial membrane potential were not significant. With this study it was possible to determine the presence of the protamine 3 gene in alpacas. In addition, it was determined that the expression of the PRM3 gene was high, which indicates high production of protamine 3 in the alpaca spermatozoon.

Key words: Alpaca, gene, Expression, PRM, protamine

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Clasificación de las diversas pruebas de función espermática……. 9

Cuadro 2. Criterios para el diseño de los cebadores. Adaptado de Thornton & Basu, (2011) y Orozco-Ugarriza, Mauricio; Franco-Anaya, Piedad; Olivo-Martinez, (2016) (modificado de Abd-Elsalam (2003)) ..... …… 20

Cuadro 3. Secuencias y características de los *cebadores* diseñados mediante el programa Primerblast para el gen PRM3…… 21

Cuadro 4. Secuencias y características de los *cebadores* diseñados mediante el programa Primerblast para el gen PRM1. …….. 21

Cuadro 5. Temperaturas y ciclos empleados en el PCR convencional para obtener cDNA..... 22

Cuadro 6. Temperaturas y ciclos empleados en el PCR en tiempo real para

PRM 3…….. 24

Cuadro 7. Nivel relativo de expresión del gen Protamina 3 (PRM3) en alpaca….. 29

Cuadro 8. Correlación entre los cuatro parámetros de fertilidad espermática y la expresión del gen PRM3…….. 30

Cuadro 9. Promedio y desviación estándar de los parámetros de fertilidad espermática evaluados en espermatozoides epididimarios de alpaca…….. 31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación funcional en porcentaje (%) de los genes que codifican proteínas espermáticas encontradas en ratón. Tomado de: Dorus et al., (2010)…… 12

Figura 2. Esquema de la compactación que sufre la cromatina durante la transición de complejo nucleohistonas a nucleoprotamina en el proceso de espermiogénesis (Oliva, 2006) 1 6

Figura 3. Metodología de muestreo..... …… 19

Figura 4. Gel de agarosa al 1% TBE 1X para el gen de la protamina 3 (PRM3)..... 23

Figura 5. Gel de agarosa al 1% TBE 1X para el gen de la protamina 1 (PRM1).…… 24

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Niveles de expresión obtenido por cada uno de los individuos de la muestra…… 49

Anexo 2. amplificaciones obtenidas durante la estandarización del protocolo de RT-qPCR para el gen PRM3…….. 50

Anexo 3. Alineamiento de las 4 secuencias de especies filogenéticamente relacionas a la alpaca empleando la herramienta clustal w…… 52

Anexo 4. Se observan diversas imágenes de espermatozoides de alpaca incubados con FITC-PSA (Ch02), Yoduro de propidio (PI) (Ch05) y Mitotracker DeepRed FM (Ch11)…… 53

Anexo 5. Histograma representativo de la evaluación del potencial de membrana mitocondrial. Se observan 2 picos claramente diferenciado, siendo el mayor pico asociado apotencial de membrana mitocondrial alto…… 55

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es el país con la mayor población de alpacas a nivel mundial con aproximadamente 3.7 millones de cabezas (INEI-2012) y de estos, al menos un millón y medio de peruanos de más de 1000 comunidades de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Lima y Puno se dedican a su crianza como ingreso económico principal, corroborando que la alpaca es una especie importante para la economía del país.

Dentro de estos pequeños núcleos, la selección de reproductores se hace únicamente por evaluación fenotípica de los individuos. En esta, el 70% equivale a la valoración de la fibra, mientras que el otro 30% se reparte entre conformación y evaluación de los órganos reproductivos. En especies como ovinos y caprinos, además de la selección fenotípica, se realiza la evaluación de la motilidad, concentración y porcentaje de normalidad espermática (espermiograma básico). Sin embargo, ninguna de las evaluaciones mencionadas logra realmente demostrar la capacidad fértil del macho y por ende, podría darnos una errónea selección de reproductores (Kizilay *et al*., 2017; Oehninger *et al*., 2000, 2014) eso sin contar con todas las dificultades que conlleva la colecta y manipulación de semen (Muchotrigo *et al*., 2013).

Los avances en la genética han permitido el empleo de diversos marcadores moleculares para determinar regiones dentro de los cromosomas que influyen y detectan caracteres específicos (Cañón, 2006; Hashemi *et al*., 2018) En la actualidad, es muy común hablar de marcadores

moleculares para determinar caracteres de producción, identificación de portadores o resistentes a enfermedades, variabilidad de raza, conocimiento del genoma, pruebas de paternidad (Baltian, 2006) y selección de reproductores (Hashemi *et al*., 2018).

Existen diversos estudios en humanos (Dorus *et al*., 2010), ratones (Dorus *et al*., 2010; Sha *et al*., 2002), bovinos (Luo *et al*., 2013) e incluso camellos (Ataya *et al*., 2012), que identifican una serie de genes relacionados a fertilidad espermática, así como, el empleo de marcadores moleculares para la selección certera de animales con mejores características reproductivas. La ventaja de este tipo de selección es que no se necesita trabajar con muestras de semen, con una muestra de sangre, células bucales o folículo piloso es suficiente y, sobre todo, permite seleccionar animales que aún no se encuentren en edad reproductiva.

Se han estudiado muchísimos genes que cumplen un rol importante en la fecundación, entre estos se encuentran las Protaminas (PRM) (Aoki y Carrell, 2003; Oliva, 2006; Silva y Gadella, 2006; Barazani *et al*., 2014; Hamilton y Assumpção, 2019) que expresan proteínas llamadas protaminas. Estas proteínas se producen a nivel testicular, durante la fase de espermiogénesis (Hamilton y Assumpção, 2019). Cumplen diversas funciones reguladoras en el genoma paterno durante la espermatogénesis, así como el plegamiento y super compactación del ADN dentro del espermatozoide (Oliva, 2006; Silva y Gadella, 2006).

Aquí radica la importancia de la evaluación de las protaminas, sobre todo en una especie como la alpaca, en la cual aún se tiene muchos inconvenientes en la reproducción. Por lo explicado, el objetivo principal del trabajo fue determinar la correlacion entre los patrones de expresión del gen protamina 3 y 1 con parámetros de función espermática en alpacas, como la integridad acrosomal, viabilidad, potencial de membrana mitocondrial y porcentaje de ADN sin protaminas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 La importancia de la crianza de Camélidos Sudamericanos

Desde hace más de seis mil años, los Camélidos Sudamericanos forman parte del ambiente cultural, social y económico, no solo del país, sino de toda la región. Están conformado por 4 especies, 2 de vida silvestre, vicuña y guanaco, que viven en reservas bajoel control de centros de investigación y/o comunidades, y 2 especies de crianza doméstica, lallama y la alpaca.

La gran adaptabilidad que poseen para soportar climas extremos, a más de 3800 m,s.n.m, los ha convertido en el principal sustento económico de miles de familias por ser la única especie ganadera que puede adaptarse y producir en estas condiciones. De las dos especies domésticas, la alpaca es la de mayor crianza por la producción de fibra. Según el último Censo Nacional Agrario del 2012, existen alrededor 3.7 millones de cabezas, distribuidos en 17 de los 25 departamentos en el país, siendo Puno y Cusco los que concentran mayor número

de cabeza. Además, la alpaca tipo Huacaya es la más numerosa, con el 80.4%, mientras que la tipo Suri solo se encuentra en un 12.2% (*INEI-2012*)

La fibra de alpaca posee cualidades inigualables como la elasticidad y capacidad de tensión de hilado, sensación de suavidad al tacto, propiedad térmica, resistencia a flexibilidad, durabilidad y además presentan más de 22 diferentes tonalidades que hacen que sea muy cotizada a nivel mundial (McGregor., 2005; McGregor *et al*., 2011). Esto ha llevado a que se creen núcleos genéticos en base a la selección de animales genéticamente superiores, conel fin de lograr el mejoramiento de la fibra. Lamentablemente, uno de los principales problemas que afectan estos programas de mejoramiento es el bajo rendimiento reproductivo(Brown, 2000) basado, en parte, a la pobre selección de reproductores.

2.2 Criterios de selección de reproductores

a. Selección de reproductores por características fenotípica

El primer paso de cualquier sistema de selección es evaluar características fenotípicas. Para el caso de alpacas, García. (2009) y posteriormente la Comisión Nacional de registro genealógicos de alpacas y llamas del Perú indican en el reglamento de registros genealógicos de alpacas Huacaya y Suri, donde se establece los reglamento y criterios de selección de sementales en campo. Este divide la selección en 2 criterios: vellón, que cumple con el 70% del puntaje de selección y conformación general, que cumple el otro 30% del puntaje final. La evaluación de los órganos reproductivos externos se encuentra dentro del porcentaje de conformación general. A la revisión, se busca machos con descenso testicular y con un tamaño promedio a los 3 años de 4.0 x 2.4 cm (Melo, 2012). Respecto a la evaluación del pene, se observa algún tipo de signo de infección o inflamación, así como el grado de liberación de la adherencia pene prepucial. Aunque estos parámetros indican que el macho ya está listo para entrar a empadre, no nos permite deducir la capacidad fértil del macho hasta observar descendencia (Aitken *et al*., 2006). Lamentablemente, esto puede llegar a provocar

una selección deficiente, así como la posible comercialización de machos sub fértiles o infértiles.

b. Selección de reproductores en base a la evaluación convencional de semen

La evaluación convencional de semen es empleada en casi todas las especies, inclusive humanos, de manera rutinaria y en algunos centros alpaqueros tecnificados. Esta evaluación básica incluye la concentración, motilidad (o motilidad progresiva) y % de espermatozoides normales según la organización mundial de la salud (Ax *et al*., 2000; Aitken *et al*., 2006). En el caso de alpacas, debemos tener en cuenta dos aspectos importantes para realizar esta prueba: la técnica que se empleará para obtener la muestra y el manejo del plasma seminal.

Respecto a la técnica de colecta de semen, en alpacas podemos emplear la vagina artificial (Huanca y Aams, 2007; Morton *et al*., 2010), la electroeyaculación (Rodriguez *et al*., 2013; Choez *et al*., 2015), la fistula uretral, la desviación de conductos deferentes, la aspiración post coital (Alarcón *et al*., 2012) e inclusive la recuperación de espermatozoides epididimario (Abraham *et al*., 2017) como metodología en investigaciones. Lamentablemente, no todos los machos responden de la misma manera a las diversas técnicas de colecta. Muchotrigo *et al*., (2013) determinaron que solo el 47.5% de los machos logra ser entrenado para dar semen por vagina artificial, Morton, *et al*., (2010) determinaron que solo el 4% de las muestras obtenidas por electroeyaculación no poseen ningún rastro de orina, Bravo *et al*., (2000) mencionan que el volumen de eyaculado que se obtiene por aspiración post coital es bajo además que está sumamente contaminado con rastros vaginales, así como eritrocitos.

Luego de haber obtenido la muestra, el siguiente paso es la eliminación del plasma seminal. Este en alpacas es sumamente filante, impidiendo una adecuada observación de los espermatozoides, lo que conlleva a que se empleen distintos métodos físicos y químicos para lograr romperla y así poder evaluarlos con corrección Lamentablemente, de una u otra manera, estos tratamientos pueden afectar al espermatozoide, cambiando los valores reales a la evaluación (Tibary y Vaughan, 2006).

Sumado a todo lo que conlleva lograr la obtención de la muestra para evaluación, existen estudios que han encontrado que la evaluación convencional no determina el potencial fértil del macho (Aitken *et al*., 2006). Se ha demostrado que machos con valores de evaluación promedio no logran una fecundación o un desarrollo embrionario exitoso (Aitken *et al*., 2006; Barazani *et al*., 2014; Oehninger *et al*., 2014; Wang y Swerdloff, 2014; Niżański *et al*., 2016).

A pesar de que sabemos que la evaluación espermática no nos indica si el animal es fértil, aún se emplea como un posible indicador en muchas especies. Sin embargo, este tipo de evaluación no se realiza de manera rutinaria en alpaca, se realiza más que todo a nivel experimental o en centros muy especializados (Quispe *et al*., 2007). Esto podría darse debido a todas las complicaciones ya mencionadas del manejo del semen.

c. Selección de reproductores en base a evaluación de parámetros de función espermática

Las pruebas de función espermática fueron creadas específicamente para determinar el origen, naturaleza y causas de la infertilidad masculina, logrando así determinar varios aspectos relacionados a la funcionalidad del espermatozoide (Niżański *et al*., 2016).

Estas se pueden dividir en 3 categorias generales como se muestra en el cuadro 1: Pruebas que evaluan la interacción de gametos, pruebas que evaluan indirectamente defectos en la función espermática a traves de pruebas fluorescentes y el empleo del analizador de semen computarizado (CASA) (Oehninger *et al*., 2000; Silva & Gadella, 2006; Niżański *et al*., 2016ª; Kizilay *et al*., 2017).

En el caso de alpaca, algunas de estas pruebas ya se han realizado de forma experimental obteniendo valores interesantes. Respecto a pruebas de interacción de gametos, Bravo & Valdivia, (2018) emplearon el test de unión a zona pelúcida obteniendo un indice promedio de union de 2.7 en espermatozoides suplementados con suero fetal bovino en comparación al 1.7 del control. Respecto de la evaluación de la integridad acrosomal (Cuadro 1), Cheuquemán *et al*., (2013) obtuvieron un 87.9 ± 5% de acrosoma intacto empleando FITC-PSA, en semen colectado por vagina artificial y citometría de flujo, Santiani *et al*., (2016)

encontraron un 95.03 ± 6.39% y 93.34 ± 7.96 % de integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios empleando FITC-PSA y FITC-PNA respectivamente, y Ugarelli *et al*., (2017) encontraron 61.13 ± 4.35% de espermatozoides vivos con integridad acrosomal empleando FITC-PSA y PI en espermatozoides epididimarios y mediante citometría de flujo.

Entre los parámetros evaluados con fluorescencia en alpaca tenemos la evaluación del potencial de membrana mitocondrial (PMM), evaluación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el daño de ADN, entre otros (Cuadro 1). Respecto al PMM, Cheuquemán *et al*., (2013) obtuvieron 66.32 ± 9.51% empleando JC-1 en eyaculado y evaluado por citometría de flujo, Santiani *et al*., (2016) obtuvieron 65.03 ± 15.92% empleando MitoTracker CMXRos y 59.52 ± 19.19% empleando MitoTracker Deep Red en espermatozoides epididimarios y evaluado por citometría de flujo. Sobre la evaluación de ROS, Evangelista- Vargas y Santiani, (2017) determinaron 10.8 ± 3.8% de anión superóxido empleando dihidrioetidium (DHE) y 6.8 ± 0.7% de peróxido de hidrogeno empleando diacetato de diclorofluoresceina (H2DCFDA). Respecto a la evaluación del daño del ADN, tenemos la evaluación de la fragmentación y rupturas del mediante la técnica del TUNEL y la prueba de dispersión de la cromatina (SCD); así como la evaluación de la condensación, mediante la evaluación de la presencia de protaminas (Silva & Gadella, 2006). El TUNEL evalúa directamente la fragmentación o ruptura gracias a que incorpora nucleótidos marcados con fluorocromos en las zonas de ruptura del ADN; mientras que la técnica SCD trabaja en base a la desnaturalización del ADN y la extracción de las proteínas nucleares, lo que conlleva a que el ADN fragmentado no forme los halos característicos de un ADN normal (Góngora-rodríguez y Fontanilla-ramírez, 2010; Barazani *et al*, 2014). En alpacas, Cheuquemán *et al*., (2013) y Santiani *et al*., (2012) empelaron TUNEL encontrando 0.91 ± 0.9% en eyaculado fresco y 38.8 ± 16.2% en eyaculado crio preservado respectivamente, ambos leído en citometría de flujo; mientras que Huanca *et al*., (2020) determinaron que la colecta de muestra por desviación de conductos deferente obtuvo un porcentaje de fragmentación mayor (36.44%) en comparación a muestras obtenidas por electroeyaculación o lavado post copula (13.65 y 8.42% respectivamente) . Respecto a la evaluación de la condensación, las protaminas son proteínas que se encargan de hiper compactar el ADN por lo tanto a más presencia, más compactado (Oliva, 2006). En alpacas aún no se han determinado los valores de protamina basales siendo necesarios por la importante función que cumplen.

Las ventajas de estas pruebas son que permiten diagnosticar cualquier disfunción espermática, permite predecir mejor la fertilidad y, por ende, la gestación (Aitken *et al*., 2006; Oehninger *et al*., 2014; Niżański *et al*., 2016a Kizilay *et al*., 2017). Sin embargo, no son pruebas que se puedan realizar en cualquier laboratorio ya que implican acondicionar un ambiente adecuado, instalar equipos específicos y contratar personal especializado (Kizilay *et al*., 2017), haciendo de estas pruebas muy costosas para implementar en cualquier criadero.

Cuadro 1 Clasificación de las diversas pruebas de función espermática.

Tomado de (Oehninger *et al*., 2000; Silva y Gadella, 2006; Niżański *et al*., 2016; Kizilay *et al*., 2017).

Categoría de evaluación	**Técnicas de evaluación**	**Forma de evaluación**
Interacción de gametos	Test de hemizona (HZA)	Emplea dos hemizonas para comparar la capacidad de unión de la muestra a evaluar con una de macho fértil corroborado. Se trabaja bajo un índex (HZI).
	Prueba competitiva de unión a ZP intacta	Evalúa la interacción del espermatozoide a la zona pelúcida.
	Integridad acrosomal	Determina el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto y reaccionado.
	Prueba de penetración a ovocito de hámster sin zona pelúcida (SPA)	Se coloca al espermatozoide en el espacio peri vitelino y luego se observa unión bajo fluorescencia.
	Prueba de adhesión de hialuronidasa	Evalúa la selectividad del ácido hialuronico por asociarse a espermatozoides maduros.
	Prueba de adhesión a oviducto	Mide el número de espermatozoides que se unen en 0.1 mm^2 de epitelio oviductal.
	Prueba de hinchazón hipo osmótica (HOST)	Evalúa la hinchazón que ocurre en la membrana plasmática intacta del espermatozoide cuando este está en un medio hipo osmótico.
Detección por análisis fluorescentes	Función de la membrana plasmática	Permite observar la funcionalidad de la membrana.
	Capacitación	Evalúan directamente el proceso de capacitación.
	Función mitocondrial (PMM)	Evalúan directamente patrones de respiración y cambios de potencia en la membrana mitocondrial interna (MMI).
	Apoptosis	Evaluación de las interacciones que ocurren en la cascada de apoptosis.
	Especies reactivas de oxígeno (ROS)	Detección directa de los ROS.
	Peroxidación Lipídica (LPO)	Detección de Peróxidos lipídicos.
	Daño en el ADN	Evalúan grados de condensación, ruptura y fragmentación.
Sistema analizador de semen computarizado (CASA)	Sistema estándar CASA	Calcula diversos parámetros de movimiento individual como: movimiento lineal, curvilíneo y amplitud de desplazamiento.
	Evaluación de hiperactivación	Evalúa parámetros de movimientos relacionados a la hiperactivación espermática como: aumento de la velocidad, desplazamiento lateral, disminución de la longitud de onda y aumento de la profundidad de onda del flagelo.
	Análisis de movimiento grupal	Postula que seleccionas la población espermática con menos movimiento más lento comparado al promedio.

d. Selección de reproductores en base a marcadores moleculares

Ya mencionamos anteriormente que el espermiograma básico no predice la fertilidad, para eso contamos con las pruebas de función espermática, las cuales nos indican de manera muy confiable, la fertilidad del reproductor; sin embargo, son muy caras y no llegan a realizarse de manera rutinaria (Wang y Swerdloff, 2014). En cambio, la selección por marcadores moleculares permite lograr una selección más rápida y económica (Harayama *et al*., 2017)**.**

Estos marcadores moleculares son secuencias nucleotídica específicas e identificables dentro de un gen o en regiones cercanas a él (Van-Arendonk, 2014) y que estén relacionados con la herencia de una característica o de un gen vinculada a esta (Cañón, 2006), conocidos como genes candidatos (Casas, 2006). Entre sus múltiples usos se encuentra las pruebas de paternidad, el hallazgo de alelos favorable o desfavorables sobre características cualitativas, productivas o enfermedades (portadores), e inclusive en selección genómica (Casas, 2006; Van-Arendonk, 2014).

En el caso específico de las alpacas, Lang *et al*., (1996) diseñaron 15 microsatélites dinucleótidos específicos para reconocimiento parental. Muchos años después, Avila *et al*., (2014a) construyeron un mapa citogenético determinando por alrededor de 230 marcadores y Avila *et al*., (2014b) aportaron otros 44 marcadores; mientras que Fernández *et al.*, (2019) encontraron 22 marcadores en los posibles 31 genes candidatos asociados al crecimiento de la fibra en especies con alta producción de vellón y pelo como son el caprino, ovino e incluso el humano.

2.3 Marcadores moleculares de importancia reproductiva en animales de producción

Respecto al manejo reproductivo, Cruz *et al*., (2015) buscaron la relación entre edad al primer servicio, edad al primer parto, tiempo de cópula, diagnóstico de gestación, periodo de gestación, intervalo de partos, entre parámetros de fibra y los tipos huacaya y suri, sin encontrar correlaciones importantes. Respecto a parámetros relacionados específicamente con parámetros reproductivos, se conocen pocos genes que controlen la reproducción sin

embargo, la influencia que tienen es fuerte (Dunn *et al*., 2004). A nivel testicular, Sha *et al*., (2002) encontraron que el humano y el ratón comparten alrededor de 160 genes de los cuales, 101 son únicos y 54 conocidos. A nivel espermático, Sukhikh *et al*., (2012) encontraron más de 400 transcriptos que probablemente tenga implicancia en la fecundación. En bovino, Taylor *et al*., (2018) encontraron 18 659 marcadores con correlación positiva a fertilidad. Dorus *et al*., (2010) encontraron en ratones, más de 1000 proteínas expresadas a nivel testicular. Además, los clasificaron en ocho categorías funcionales: Estructural, unión de ADN/ARN, energéticas, metabolismo, transporte, misceláneo (cuando no se tenía una función específica) y desconocidos tal como se muestra en la figura 1. Panner y Agarwal, (2018) así como Jodar *et al*., (2017), encontraron una lista de 1000 proteínas diferenciales en pacientes con distintas anormalidades espermáticas como azoospermia, astenozoospermia y oligoastenozoospermia. Además, Harayama *et al*., (2017) determinaron proteínas específicas de diversas funciones espermáticas como las protaminas.

En alpacas existen unos cuantos estudios que evalúan la presencia de algunos genes reproductivos, por ejemplo, Evangelista, (2011) encontraron la presencia del gen SMCP (Proteína rica en Cisteína asociada a Mitocondrias Espermáticas) en tejido testicular además, determinaron que este gen tiene una correlación baja positiva con la motilidad espermática. También está el estudio de Tataje, (2013) quienes hallaron al gen CCNA1(indicar el acrónimo), encargado de regular el ciclo celular durante la espermatogénesis, con una baja correlación con la concentración espermática y por último, tenemos el trabajo de Florentini *et al*., (2011) que hallaron la presencia de los genes Calmegin (Chaperona durante la espermiogénesis) y ADAM2 (asociado a la unión del espermatozoide con la zona pelúcida). A pesar de que todos estos genes tienen implicancia importante en distintas funciones espermáticas; ninguna tiene relación al ADN como podrían ser las protaminas.

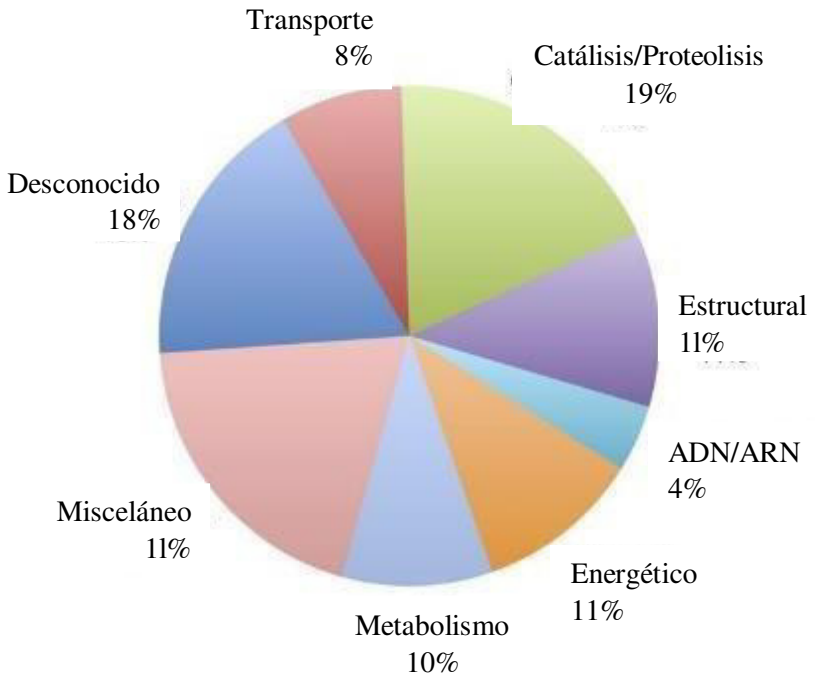


Figura 1. Clasificación funcional en porcentaje (%) de los genes que codifican proteínas espermáticas encontradas en ratón. Tomado de: Dorus *et al*., (2010)

a. Gen Protamina (PRM)

Las protaminas son proteínas nucleares específicas que reemplazan a las histonas durante la espermiogénesis (Oliva, 2006; Moore, 2014; Cho y Agarwal, 2018; Hamilton y Assumpção, 2019; Ribas-Maynou y Benet, 2019) y se encargan del super empaquetamiento y estabilidad estructural del ADN espermático (Moore, 2014).

Se conocen 2 tipos de genes, la protamina 1 (PRM 1), encargado de expresar a la proteína protamina 1 (P1), presente en todos los mamíferos, y la protamina 2 (PRM2), encargada de expresar la proteína protamina 2 (P2) y presente solo en algunos mamíferos como humanos, ratones, bovinos, perisodáctilos, lagomorfos y probocidos (Balhorn, 2007; Jodar yOliva, 2014; Harayama *et al*., 2017). Las secuencias genómicas de la PRM1 y PRM2 se

organizan formando un dominio de bucle junto con el gen de la proteína de transición 2 (TNP2) y una secuencia denominada gen4 o PRM3 (Oliva, 2006). La TNP2 se encarga de expresar un grupo de proteínas que apoyan el re- empaquetamiento del ADN (Jodar y Oliva, 2014). Respecto a la PRM3, existen varios postulados, Oliva, (2006) y Steger y Balhorn, (2018) mencionan que se origina en base a una duplicación de la PRM1 pero sin mayor implicancia en la hipercompactación en el ADN mientras que Balhorn, (2007), Francis *et al*., (2014) y Jodar y Oliva, (2014) mencionan que la secuencia de la PRM3 es una secuencia de marco abierto de lectura (ORF) entre la PRM2 y la TNP2 pero que su función no es la condensación, sino que aparentemente, está más relacionado en la regulación de la motilidad espermática. Esto se ve reflejado en que la PRM3 se encuentra en la fase de elongación del espermatozoide, pero no en el citoplasma de los espermatozoides maduros (Jodar y Oliva, 2014). Esto es importante ya que a pesar de que la PRM3 aparentemente no cumple ninguna función en la compactación, todos estos genes se agrupan muy cercanos y en pequeñas regiones de un mismo cromosoma. En humanos y ratones, los genes estan localizados en el cromosoma haploide 16 (Oliva, 2006; Steger & Balhorn, 2018) y en toros esta presente en el cromosoma 25 (Yathish *et a*l., 2018).

Respecto a la PRM1 y PRM2, se postula que en mamíferos están compuestas por 2secuencias exónicas y una intronica mientras que en aves y salmónidos solo posee una secuencia exónica y ninguna intronica (Balhorn, 2007; Jodar y Oliva, 2014).

b. Proteínas protaminas (P)

Cada gen expresa su propia proteína, La protamina 1 (P1) también encontrada en la mayoría de los mamíferos (Oliva, 2006; Moore, 2014; Hamilton y Assumpção, 2019) y la protamina 2 (P2) observado en espermatozoides de algunas especies (Moore, 2014) como en humanos, primates, porcinos, equinos y bovinos (revisado de Hamilton y Assumpção, 2019). Oliva, (2006) encontraron en su revisión que la P2 está formado por los componentes P2, P3 y P4 (Yathish *et al*., 2018) incluido en algunos mamíferos como el humano y ratones mientras que, Hamilton y Assumpção, (2019) encontraron en su revisión que la P3 es una isoforma de la P2 presente en humanos, ratones y algunos simios del nuevo mundo. Se menciona que la

diferencia entre los 3 componentes son la extensión N-terminal de 1 a 4 residuos, aunque el componente P2 es el más abundante (Oliva, 2006).

Estructuralmente, las protaminas son modificaciones de las histonas, con la mitad de tamaño de estas (Hamilton y Assumpção, 2019), con un núcleo rico en arginina y residuos de cisteína (Moore, 2014) que le confieren la carga positiva necesaria para formar un super complejo con el ADN espermático (Oliva, 2006). En muchas especies, como el humano, la ratio P1/P2 es igual a 1, observando infertilidad cuando esta ratio cambia (Torregrosa *et al*., 2006; Francis *et al*., 2014). Además, de la hipercomtactación del ADN, Oliva, (2006) propuso algunas otras funciones que podrían cumplir: (1) La formación de un núcleo hidrodinámico que le permite al espermatozoide tener mayor velocidad y ser el primero en fecundar, (2) al promover la hipercompactación de la cromatina, permite una protección extra ante nucleasas o potenciales agentes mutágenos del medio interno o externo. Este punto es importante porque, existen estudios que determinan la correlación entre la deficiencia de las protaminas y la infertilidad (Cho y Agarwal, 2018). (3) Regula la competición y remoción de factores transcripcionales de la espermátida, (4) proporciona una marca epigenética en algunas porciones del genoma espermático, y (5) podrían estar implicadas en la espermiogénesis y en la fecundación.

La transición de histonas a protaminas se da durante la fase de capuchón en la espermiogénesis (Olivera *et al*., 2006). Las histonas que permanecían en las espermátidas son hiperacetiladas (figura 2) y al mismo tiempo ocurre la activación de la topoisomerasa, lo que permite la modificación de los nuclehistonas para su posterior desmontaje, así como la separación reversible de esta (figura 2) (Oliva, 2006; Jodar y Oliva, 2014). Ocurrido esto y gracias a la topoisomerasa, las proteínas de transición (TNP´s) se unen al ADN (Jodar y Oliva, 2014). Las protaminas necesitan pasar por una fosforilación para reemplazar a las TNP y unirse al ADN (Oliva, 2006). En la fase final de la espermiogénesis, los TNP se eliminan y las protaminas fosforiladas se unen rápidamente al ADN para formar una estructura toroidal del genoma paterno (Figura 2) (Jodar y Oliva, 2014). Otro mecanismo que permite estabilizar aún más el complejo nucleoprotamina formado, es la la formación de enlaces disulfuro entre las protaminas (Jodar y Oliva, 2014) durante la fase de maduración

(Figura 2). Esta reorganización es reversible ya que, es necesario que estén presentes las histonas durante la fecundación. Como se ve en la Figura 2, en algunas especies, como el humano, el 85% del ADN tiene esta re-compactación, mientras que el otro 15% mantiene la formación de nucleosomas de células somáticas.

Respecto a la evaluación de las protaminas, las técnicas directas es la extracción y evaluación en gel de poliacrilamida (PAGE); sin embargo, existen otras técnicas fluorescentes muy usadas también como el Chromomycin A3 (CMA3) (Cho y Agarwal, 2018). El CMA3 es un fluorocromo que compite con las protaminas por los mismos puntos de unión en el ADN (Oliva, 2006; Moore, 2014; Cho y Agarwal, 2018; Hamilton y Assumpção, 2019). Este fluorocromo permite evaluar la deficiencia de protamina por lo que tiene una alta asociación con un bajo empaquetamiento del ADN (Silva & Gadella, 2006; Oliva, 2006; Cho & Agarwal, 2018).

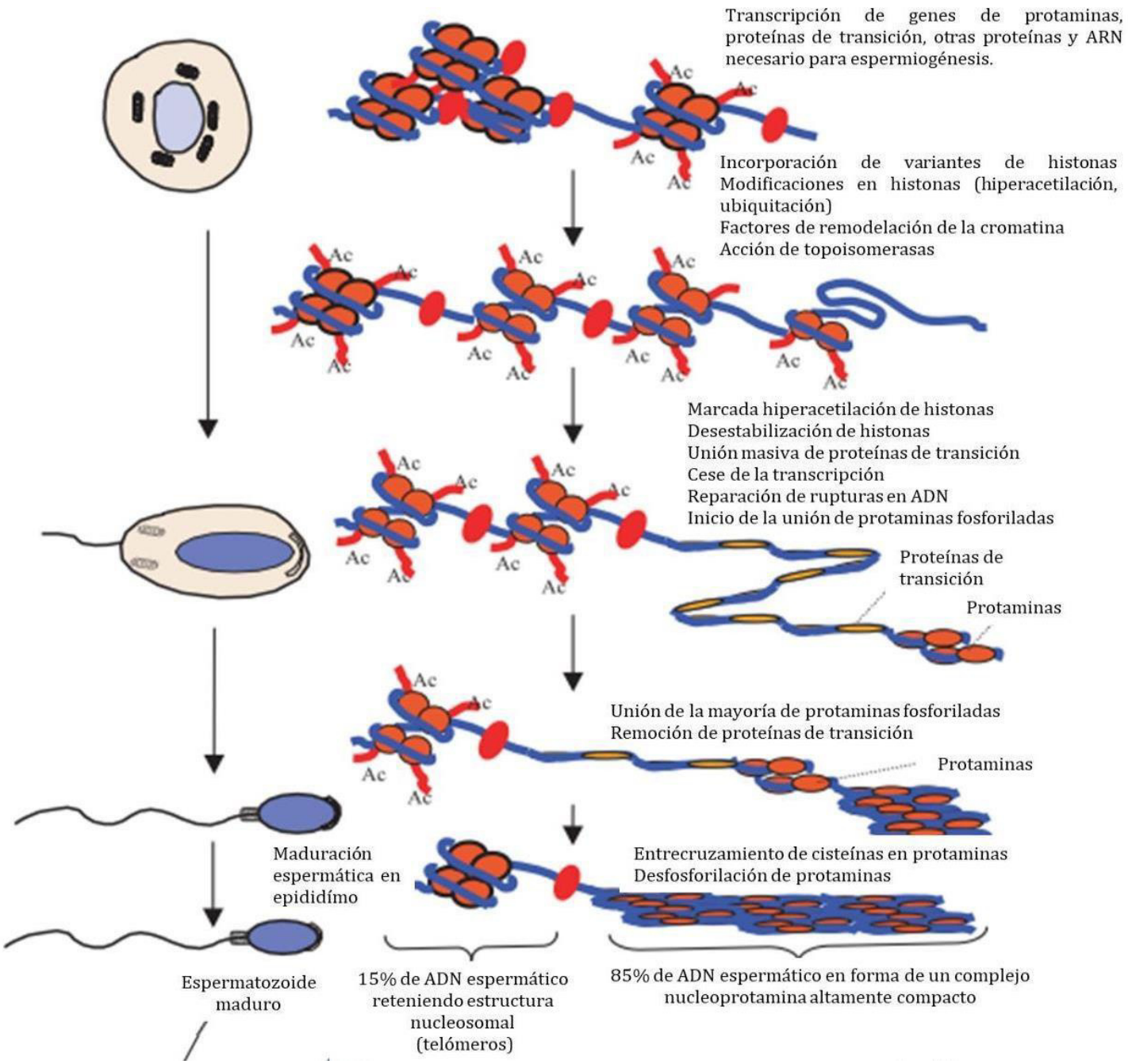


Figura 2. Esquema de la compactación que sufre la cromatina durante la transición de complejo nucleohistonas a nucleoprotamina en el proceso de espermiogénesis (Oliva, 2006)

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestreo

Los animales muestreados se encontraban para beneficio en el Camal Municipal de Huancavelica. Se trabajaron con machos entre 3 a 4 años según lo determinado por evaluación de la formula dentaria. Además, se verifico que se encontraran en buen estado sanitario al momento del beneficio. De todos los animales que encajaron con los parámetros mencionados, solo nos quedamos con los testículos que presentaron una longitud mayor o igual a 3 cm (Abraham *et al*., 2016). Esto dio un total de 50 testículos

a. Muestreo para la obtención del ARNm

Se tomó una muestra de 1 cm^3 del parénquima de cada testículo seleccionado (Figura 3b) y se colocó en crio viales con RNAlater® (R0901, Sigma-Aldrich, USA), que es un inhibidor de ARNasas, e inmediatamente se sumergieron los crio viales en nitrógeno líquido para su almacenamiento y transporte a Lima para su posterior procesamiento en el laboratorio de Biotecnología reproductiva y celular de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas de la Universidad Científica del sur.

b. Muestreo para la obtención de los espermatozoides epididimarios

Para la evaluación de los parámetros espermáticos, los epidídimos junto al resto del parénquima testicular fueron colocados en bolsas conteniendo suero fisiológico a 5°C (Figura 3c) para su transporte al laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en la ciudad de Lima.

Al llegar las muestras al laboratorio luego de unas 20 horas post colecta, se les separaron las colas de los epidídimos del resto de testículo e inmediatamente fueron lavados con PBS temperado a 37°C luego, las colas se colocaron en placas petri temperadas con 1 mL de Tris base (2.71 g de Tris, 1.40 g de ácido cítrico, 1 g de fructosa y agua destilada hasta completar 100 mL) a 37.5°C, para luego realizar cortes seriados con una hoja de bisturí y así permitir la liberación de los espermatozoides según la metodología aplicada por Banda *et al*., (2010). A las 50 muestras obtenidas se les evaluó la concentración y motilidad, seleccionando las muestras que tuvieron concentraciones mayores a 50 $x10^6$ de espermatozoides por ml y motilidades mayores al 30%. De todas las muestras que pasaron la selección inicial, se seleccionaron 47 muestras que cumplieron con las condiciones establecidas.

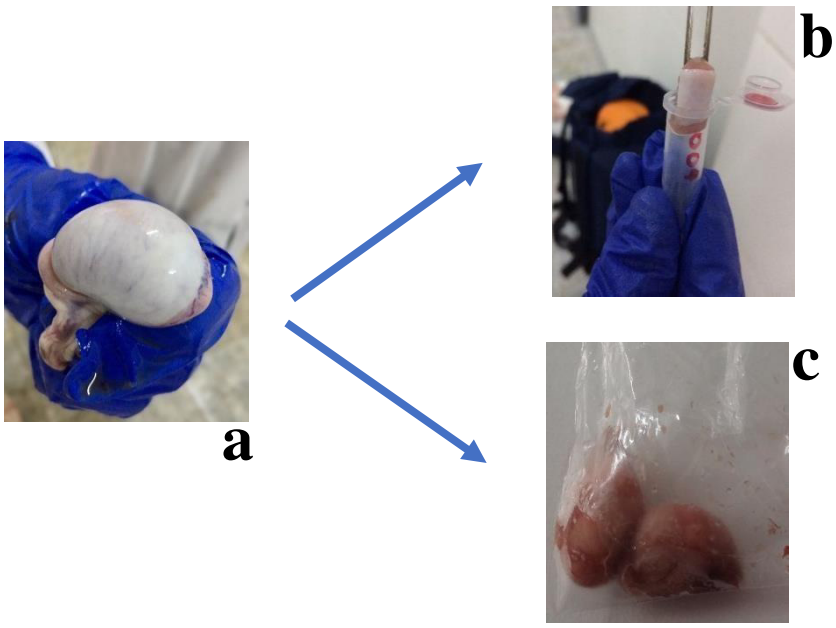


Figura 3. Metodología de muestreo a. Imagen del testículo y epidídimo completamente limpios y listos para ser procesados. b. Técnica de corte y almacenamiento de tejido testicular para obtención del ARNm. c. Técnica de transporte de testículo con epidídimo para la obtención de espermatozoides epididimales.

3.2 Procedimiento experimental

3.2.1 Procedimiento para determinar la expresión del gen PRM3

a. Diseño de cebadores

Para el siguiente trabajo se decidió diseñar 2 juegos de cebadores:

A. Protamina 3 (PRM3): Se diseñó en base a la secuencia nucleotídica Fasta PREDICTED de la alpaca (*Vicugna pacos*) (Accession: XM_006204352.3), que se encuentra en el Gen bank, perteneciente a la Librería Nacional de Medicina (NIH) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).
B. Protamina 1 (PRM 1): Se diseño en base a alineamientos de secuencias nucleotídicas

FASTA de especies filogenéticamente relacionada a la alpaca. (porcino, equino, bovino y ovino) encontradas en el NCBI, ya que este gen no está registrado en la base de datos en alpaca.

- Alineamiento para el gen PRM 1

Para el alineamiento se empleó la herramienta Clustal W, dentro del software Mega 7 (https://www.megasoftware.net/home) y se emplearon las siguientes secuencias:

- *Bos taurus* (Gene ID: 281423, Accesión: NM_174156).
- *Sus scrofa* (Gene ID: 397487, Accesión: NM_214253.1).
- *Ovis aries* (Gene ID: 100302352, Accesión: NM_001163050.1).
- *Equus caballus* (Gene ID: 100036554, Accesión: NM_001083596.1).

- Generación y selección de cebadores

Se diseñaron los cebadores *in silico* empleando la herramienta PRIMER BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi) del NCBI y las consideraciones del Cuadro 2.

Cuadro 2. Criterios para el diseño de los cebadores. Adaptado de Thornton y Basu, (2011) y Orozco-Ugarriza *et al*., (2016) (modificado de Abd-Elsalam (2003))

Criterio	**Descripción**
Tamaño del primer	Rango ideal de 18-28 pb
Tamaño del amplicón	Rango ideal de 80-200 pb, con un promedio de 120 pb
Contenido % GC	Mínimo 35, optimo 65 y máximo 80%
Temperatura de fusión (Tm) de los cebadores	Rango ideal de 59 a 64 °C, teniendo una diferencia entre forward y reverse no mayor a 1-2°C
Auto complementariedad	Debe ser lo mínimo posible
Similaridad	Debe alinearse al 100% con la cadena molde.

% GC: porcentaje de guanina -citosina

El programa lanzó 7 pares de cebadores para la PRM 3 como se ve en el Cuadro 3. Respecto a la PRM1, del alineamiento se lograron obtener 2 pares de cebadores como se observa en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Secuencias y características de los cebadores diseñados mediante el programa Primerblast para el gen PRM3.

#	Primer	Secuencia (5' A 3')	Longitud	Tm (ºC)	%GC	Tamaño de amplicón (pares de bases-pb)
1	Forward	TGCGTGAGTCAGGACAACTT	20	59.54	50	192
	Reverse	TCAAGAGTGTGTCTGCTCGG	20	59.68	55	
2	Forward	CTGCGTGAGTCAGGACAACT	20	59.97	55	240
	Reverse	CTCTTTGAAACAGCGGCAGG	20	59.76	55	
3	Forward	GCGTGAGTCAGGACAACTTC	20	58.86	55	192
	Reverse	ATCAAGAGTGTGTCTGCTCGG	21	60.07	52.38	
4	Forward	CTCCATGAAGAAGCTTGTGGC	21	59.53	52.38	229
	Reverse	GGCCATCGTCATGGATCAAG	20	58.77	55	
5	Forward	GCCAAAGCAGGTGATGGGTT	20	61.19	55	108
	Reverse	AAGTTGTCCTGACTCACGCAG	21	60.54	52.38	
6	Forward	CCGAGCAGACACACTCTTGAT	21	60.07	52.38	71
	Reverse	TCTTCTCTTTGAAACAGCGGC	21	59.13	47.62	
7	Forward	CCTCCATGAAGAAGCTTGTGG	21	58.91	52.38	219
	Reverse	TGGATCAAGAGTGTGTCTGCTC	22	60.03	50	

Cuadro 4. Secuencias y características de los cebadores diseñados mediante el programa Primerblast para el gen PRM1.

#	Primer	Secuencia (5' A 3')	Longitud	Tm (ºC)	%GC	Tamaño de amplicón (pares de bases-pb)
1	Forward	AGAAGATGTCGCAGACGAAGG	21	60.14	52.38	78
	Reverse	TACAACGGTGTAGCGGCGG	19	62.63	63.16	
2	Forward	TGGCCAGATACCGATGCTGC	20	62.67	60	76
	Reverse	CGTCTGCGACATCTTCTTCGG	21	61.38	57.14	

De los cebadores obtenidos para PRM3, se seleccionaron los que cumplieron los criterios del diseño de cebadores tal como se observa en el Cuadro 2, seleccionando el par 2 y el par 4. En el caso de la PRM1, se trabajó con el único par diseñado.

Luego de tener los cebadores candidatos, se evaluaron la cantidad de horquillas que formaban, así como, los homodímeros y heterodímeros empleando la herramienta OLIGOANALYZER (https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer) para lograr seleccionar a los más idóneos.

b. Extracción del ARN

La extracción del ARN se realizó de la biopsia de 1 cm3 que se encontraba en nitrógeno líquido y empleando la metodología presentada por el Kit TRI Reagent® RNA Isolation Reagent (93289, Sigma Aldrich, EE. UU.). La muestra obtenida fue almacenada en crioviales a -24°C hasta su posterior manejo.

c. Formación de ADNc

La formación de ADNc se realizó empleando el kit iScript ™ cDNA Synthesis (Bio-Rad. EE. UU.) con el protocolo para PCR convencional indicado en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Temperaturas y ciclos empleados en el PCR convencional para obtener cDNA.

	CICLOS	TEMPERATURAS (°C)	TIEMPO (HH:MM: SS)
Incubación	1	95	00:02:00
Amplificación	40	Desnaturalización: 95	00:00:40
		Hibridación: 58	00:00:40
		Elongación: 72	00:00:40
Disociación	1	72	00:10:00
Enfriamiento	1	4	00:01:00

d. Validación de los cebadores

En el caso de la PRM3, a pesar de que ambos cebadores se encontraban en el rango de amplicón obtenido *in silico*, el transcrito más específico fue el del par 4 (Figura 4). En el caso de la PRM 1, A pesar de que el protocolo de extracción de ARN y la amplificación del ADNc fueron exitosos ya que se observaron amplicones, estos no coincidieron con los resultados obtenidos *in silico*, tal como se muestra en la Figura 5. Esto implica que los únicos cebadores que se pudieron emplear para cuantificar fue el par 4 de la protamina 3 (PRM3).

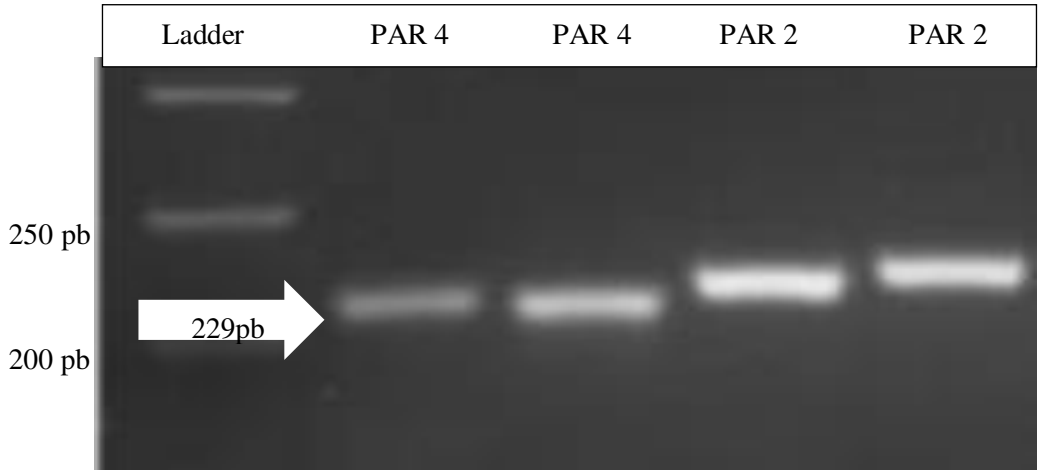


Figura 4. Gel de agarosa al 1% TBE 1X para el gen de la protamina 3 (PRM3). La flecha blanca indica donde el tamaño del amplicón esperado. Las bandas presentes pertenecen al ADNc de los 2 pares de cebadores seleccionados (par 2 y par 4).

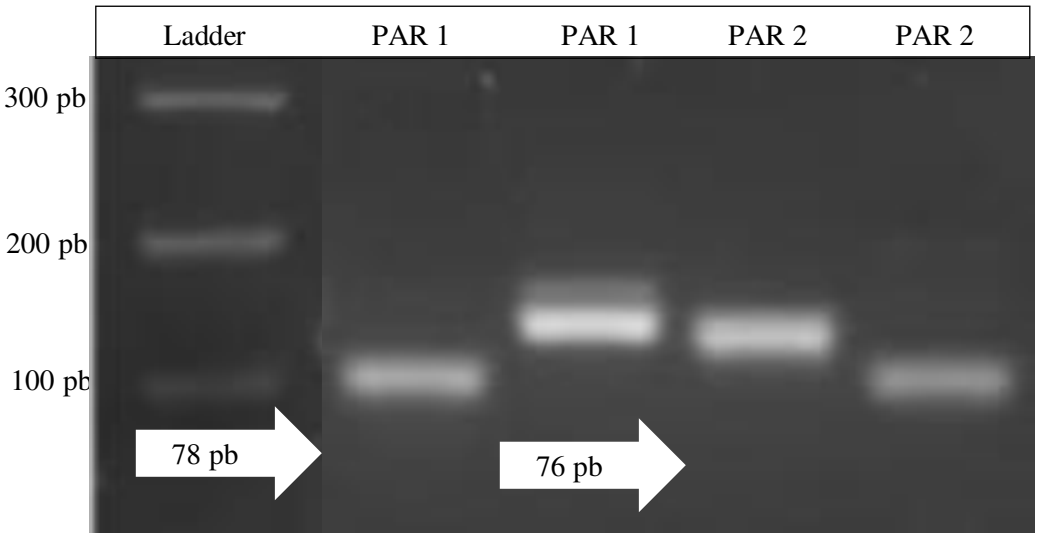


Figura 5. Gel de agarosa al 1% TBE 1X para el gen de la protamina 1 (PRM1). La flecha blanca indica donde el tamaño del amplicón esperado. Las bandas presentes pertenecen al ADNc de los 2 pares de cebadores obtenidos *in silico* (par 1 y par 2).

e. Cuantificación de la expresión del gen PRM3

La RT-qPCR (transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) se realizó con el equipo Real-Time PCR system Step One (Applied Biosystem, EE. UU.). Como *housekeeping* se empleó los cebadores diseñados para el gen GADPH (Griceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa) por Murga et al., (2018 y protocolo presentado en el Cuadro 6). El modelo matemático que se empleó para hallar el umbral del ciclo (Ct), fue el 2-ΔΔCt (Livak y Schmittgen,2001), ya que, al no tener valores referenciales del gen que se está estudiando, calculamos la expresión relativa del *housekeeping*.

Cuadro 6. Temperaturas y ciclos empleados en el PCR en tiempo real para PRM 3

	CICLOS	TEMPERATURAS (°C)	TIEMPO (HH:MM:SS)	RAMPA (°C/s)
Incubación	1	94	00:05:00	4.8
Amplificación	40	Desnaturalización: 94	00:00:10	4.8
		Hibridación: en base a pcr convencional 58	00:00:10	2.5
		Elongación: 72	00:00:10	4.8
Disociación	1	94	00:05:00	-
		65	00:01:00	0.03
Enfriamiento	1	4	00:01:00	2

3.2.2 Procedimiento para la evaluación de los parámetros de función espermática

Luego de pasar la primera fase de evaluación (motilidad y concentración), cada muestra seleccionada fue dividida en 2 alícuotas y centrifugadas a 600G por 8 minutos:

a. Evaluación de la integridad acrosomal, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial

La evaluación de la integridad del acrosoma se realizó empleando el fluorocromo FITC-PSA (Sigma Aldrich, EE. UU.). La presentación de 2 mg fue diluida con 20 mL de PBS para lograr una concentración de 100 µg/mL (Ugarelli *et al*., 2017). La determinación de los espermatozoides muertos se realizó empleando el fluorocromo Yoduro de propidio (PI; Sigma Aldrich, EE. UU.). Este fue preparado diluyendo 10 mg del PI en 10 mL de PBS para llegar a una concentración de 1 mg/mL. Para la evaluación de la membrana mitocondrial se trabajó con el fluorocromo Mitotracker DeepRed FM (Invitrogen TM, EE. UU.). La solución stock se preparó diluyendo 50 µg del fluorocromo en 94 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido)

para llegar a una concentración de 1 mM; mientras que la solución de trabajo se preparó diluyendo 2 µl de la solución stock con 100 µl de PBS para llegar a una concentración de 20 µM.

A una alícuota con 100 µL de muestra se le añadió 2.5 µL de solución Stock de FITC-PSA (Concentración final 2.5 µg/mL), 0.5 µL de solución Stock de PI (Concentración final 5 µg/mL) y 0.5 µL de solución de trabajo de Mitotracker DeepRed FM (Concentración final 100 nM) para luego ser incubado por 8 minutos a 38 °C en oscuridad (Santiani *et al*., 2016) para su posterior lectura.

b. Evaluación del porcentaje de protaminas en el ADN espermático

La determinación de la cantidad del porcentaje de protaminas fue evaluada empleando el fluorocromo Chromomicyn A3 (CMA3; Sigma Aldrich, EE. UU.). La solución stock se preparó diluyendo 5 mg del fluorocromo con 20 mL del buffer McIlvane para llegar a una concentración final de 0.25 mg/mL (pH 7.0).

La segunda alícuota con 100 µL de muestra fue lavada por centrifugación a 600 g por 10 min, se eliminó el sobrenadante, se reconstituyó en 100 µL de la solución de trabajo del CMA3 y se incubó en oscuridad a 38°C por 20 minutos. Pasado ese tiempo, se le agrego 500 µL de PBS y se centrifugo a 600 g por 8 minutos, se eliminó el sobre nadante y se re suspendió el pellet en 100 µl de PBS para su lectura. (Lolis *et al*., 1996).

c. Evaluación de resultados mediante citometría de flujo con imágenes

Para la evaluación se utilizó un equipo FlowSight (Amnis Estados Unidos) equipado con un sistema analizador de imágenes. El software de adquisición usado fue INSPIRE® versión 100.2.1955 (Seattle, EE. UU.) y el software para analizar los datos fue el IDEAS® versión 5.0 (Seattle, EE. UU.). Se adquirieron 10 mil eventos compatibles con espermatozoides en base a su ratio largo/ancho y tamaño.

En caso del grupo 1, Para el FITC-PSA y PI se empleó el láser de excitación con longitud de onda de 488 nm y potencia de 20 mW y fueron medidos empleando el canal de detección de 505 a 560 nm (Ch02) y 642 a 740 nm (Ch05) respectivamente. En el caso del Mitotracker DeepRed FM, se empleó el láser de excitación con longitud de onda de 642 nm y potencia

de 60 mW y medido empleando el canal de detección de 642-740 nm (Ch11). Cabe resaltar que se registraron las imágenes de los espermatozoides en campo claro y oscuro para poder verificar que este correcta la localización de la fluorescencia. En el grupo 2, para el Chromomicyn A3 se empleó el láser de excitación con longitud de onda de 405 y potencia de 30 mW y el canal de detección 505 a 560 nm (Ch08).

d. Lectura de resultados

1. Evaluación de la integridad del acrosoma: El fluorocromo FITC-PSA no puede ingresar a la célula si el acrosoma está intacto, por lo que no se observa fluorescencia verde en la zona acrosomal; en cambio, sí el acrosoma estuviera dañado, observaríamos fluorescencia verde en la zona acrosomal.

2. Evaluación de la viabilidad: El fluorocromo PI se añade al ADN del espermatozoide sí está muerto o en proceso de muerte, observando fluorescencia roja en la cabeza; en cambio, si está vivo, no se observa ninguna fluorescencia en la cabeza del espermatozoide.

3. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial: El fluorocromo Mitotracker Deep Red emite fluorescencia dependiendo de la actividad de la mitocondria; entonces, un espermatozoide con una mitocondria muy activa tiene fluorescencia alta en la pieza media (alto potencial de membrana mitocondrial); en cambio, un espermatozoide con baja actividad en las mitocondrias presenta una baja fluorescencia en la pieza media (bajo potencial mitocondrial)

4. Evaluación del porcentaje de protaminas: El fluorocromo CMA3 ocupa los espacios que no están ocupadas por protaminas en el ADN espermático. La baja cantidad de protaminas o la ausencia de estas en el ADN espermático se observa con una alta fluorescencia verde en la zona de la cabeza; mientras que, una alta cantidad de protaminas se observa con una baja o nula fluorescencia verde en la zona de la cabeza.

3.2.3 Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico Prism® v. 3.0. Los porcentajes de motilidad, concentración, integridad acrosomal, viabilidad, potencial de membrana mitocondrial y CMA3.

Para determinar la correlación, se realizó el análisis de correlación de Spearman para los parámetros de integridad acrosomal, viabilidad, potencial de membrana mitocondrial y CMA3 con la expresión génica de PRM 3.

IV RESULTADOS

4.1 Determinación de la expresión del gen PRM3

Los resultados obtenidos de la expresión del gen Protamina (PRM3) para la técnica de PCR en tiempo real se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Nivel relativo de expresión del gen Protamina 3 (PRM3) en alpaca.

	Media	**CT value**
Nivel relativo de expresión (%)	79	27.95-32.75

4.2 Correlación entre la expresión del gen PRM3 y los parámetros de función espermática

Los resultados obtenidos de la correlación entre cada parámetro de función espermática (integridad acrosomal, viabilidad, potencial de membrana mitocondrial y presencia de protaminas) y la expresión del gen Protamina 3 (PRM3) se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Correlación entre los cuatro parámetros de fertilidad espermática y la expresión del gen PRM3.

Correlación	Valor r	Valor p
Integridad acrosomal vs Expresión génica	0.12	0.05
Viabilidad vs Expresión génica	0.31	0.05
Potencial de membrana mitocondrial vs Expresión génica	0.62	0.75
CMA3 alto vs Expresión génica	-0.85	0.01

Valor de P< 0,05 indica correlación significativa

4.3 Evaluación de los parámetros de función espermática.

Los datos obtenidos de las muestras evaluadas empleando FITC-PSA, PI, Mitotracker DeepRed FM y CMA3, así como los promedios de motilidad total y concentración se presentan en el Cuadro 9.

Parámetros evaluados	Promedio	D.S
Concentración (10^6 spz/ml)	140.45	54.56
Motilidad (%)	58.5	17.9
% integridad acrosomal	93.95	3.75
% viabilidad	66.80	14.17
% potencial de membra mitocondrial alta	63.4	14.40
% CMA3 alto	6.25	8.76

Cuadro 9. Promedio y desviación estándar (D.S) de los parámetros de fertilidad espermática evaluados en espermatozoides epididimarios de alpaca

V DISCUSIÓN

La alpaca es una especie con gran importancia sociocultural-económica en el país; sin embargo, el mejoramiento genético no es tan sencillo debido a muchos factores, siendo uno de los más importantes, las limitaciones que se encuentran al momento de realizar la evaluación reproductiva de los sementales, lo cual genera que se pueda seleccionar como reproductor a un individuo sub fértil o infértil. Los avances en la reproducción han permitido conocer que existen otras técnicas que permiten la selección de manera más eficaz como son las pruebas de función espermática y el empleo de marcadores moleculares (Dorus *et al*., 2010; Sukhikh *et al*., 2012; Harayama *et al*., 2017; Jodar *et al*., 2017; Taylor *et al*., 2018).

Ya se conoce que las pruebas de función espermática nos brindan bastantes indicios sobre la fertilidad de los sementales (Kizilay *et al*., 2017; Love, 2018; Wang & Swerdloff, 2014); sin embargo, las alpacas, en su mayoría, son manejadas por pequeñas comunidades en zonas altoandinas del país, por lo que se podría complicar realizar este tipo de evaluaciones. la selección de reproductores en base a sus genes podría solucionar muchísimo estos inconvenientes. Respecto a la selección por marcadores moleculares, en alpacas se ha venido investigando distintos PNS (polimorfismos de nucleótido simple) en genes relacionados a caracteres productivos como la fibra (Fernández *et al*., 2019); sin embargo, solo existen algunos trabajos que hayan determinado genes relacionados a parámetros de función espermática como el gen SMCP (Proteína rica en Cisteína asociada a Mitocondrias Espermáticas; Evangelista., 2011), CCNA1(Ciclina A1;Tataje., 2013), Calmegin (Chaperona durante la espermiogénesis; Ganoza., 2022) y ADAM2 (asociado a la unión del espermatozoide con la zonapelúcida; Cho., 2012) pero ninguno relacionado a ADN como la protamina.

Para este trabajo se seleccionaron 2 variantes del gen protamina, la protamina 3 (PRM3) por encontrarse en formato PREDICTED dentro del genoma de alpaca, contenido en la base de datos del NCBI, y la protamina 1 (PRM1) por pertenecer a la ratio P1/P2 presente en la mayoría de los mamíferos (Oliva, 2006; Jodar *et al*., 2017) y ser el gen del clustal más estudiado (Grzmil*et al*., 2008). Esto debido a la implicancia directa con el ADN espermático, una de las organelas más evaluadas.

Respecto al diseño de los cebadores, los amplicones más cercanos a las obtenidas in *silico,* empleando softwares bioinformáticos fueron para el gen PRM3. Esto pudo deberse a que la secuencia empleada, a pesar de ser predicted, se encuentra dentro del banco de genes, perteneciente a la Librería Nacional de Medicina (NIH) del Centro Nacional de información Biotecnológica, lugar donde se tienen registrados los genomas completos de muchas especies, incluyendo al humano. Esto nos confirma que los cebadores diseñados sí encajan perfectamente con alguna porción del gen.

En el caso del gen PRM1, a pesar de que es uno de los genes más estudiado en mamíferos, no se encontraba ningún tipo de secuencia en el gene bank, por lo que se tuvo que armar una secuencia en base a secuencias complete cd de especies filogenéticamente relacionadas a la alpaca (Evangelista, 2011; Tataje, 2013). A pesar de esto, no pudimos corroborar que los cebadores diseñados encajen perfectamente con el gen, por lo que no pudimos incluirlo en la segunda fase de la investigación. Las razones de este evento han podido deberse a que las secuencia molde al no ser especifica, no logro darnos cebadores específicos,pudiendo unirse a cualquier parte del ADN, como, por ejemplo, el gen PRM2 que se encuentra muy cercano al PRM1 en el cromosoma (Oliva, 2006; Torregrosa *et al*., 2006; Jodar y Oliva, 2014) o cualquiera otra secuencia no registrada en el genoma de la alpaca; otra razón pudieraser la que al tener temperaturas de fusión del ADN (melting) muy parecidas, estos pudieron unirse entre sí y amplificar o formar horquillas. Cabe resaltar que solo se evaluó la expresión del gen PRM3 debido a que fue el único hallado*in vivo*. Se obtuvo un valor de 79 con un Ct value máximo de 32.75, lo que indica que obtuvimos valores de expresión altos, siendo este resultado el primer reporte que mide expresión de este gen en alpacas.

Respecto a las correlaciones obtenidas, el porcentaje de integridad acrosomal, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial con los niveles de expresión del gel PRM3, tuvieron valores no significativos, por lo tanto, para este trabajo no existe correlación entre estos parámetros. Esto es comprensible ya que las protaminas están más asociadas al ADN (Silva y Gadella, 2006); sin embargo, Yathish *et al.*, (2018) determinaron que existe cierta asociación entre la motilidad con la expresión del gen Protamina 2 en muestras de toro, lo que no se observó en este trabajo con el gen PRM3. La única correlación significativa que se obtuvo fue de -0.85 entre la expresión del gen PRM3 con el porcentaje de ausencia de protaminas. Este valor nos indica que existe una correlación inversa alta, lo que permite entender que a mayor expresión del gen protamina, menor porcentaje de espermatozoides sin protaminas; a pesar de que no se tiene aún mucha información sobre el porcentaje de participación del gen PRM3 en la formación y cantidad de protaminas en el ADN, esto nos permite determinar que existe participación al ser el primer reporte que lo evalúa y correlaciona.

Respecto a la evaluación de la integridad acrosomal, se determinó un 93.75 ± 3.75% empleando FITC-PSA. Estos valores son similares a los obtenidos por Santiani *et al*., (2016), donde encontraron valores de 95.03 ± 6.39% y Ugarelli *et al*., (2017) con 95.19 ± 2.33 %, ambos empleando FICT-PSA y citometría de flujo con analizador de imágenes. La cercanía de los resultados podría deberse a que los 3 trabajos emplearon espermatozoides epididimarios de alpaca para la evaluación y citometría de flujo con imágenes para la evaluación. Cheuquemán *et al*., (2013), obtuvieron valores de 46.8 ± 90%. empleando también FITC-PSA, pero evaluado en eyaculado y citometría convencional. Este valor es menor al obtenido en nuestro trabajo, esto pudo deberse a que la muestra que hemos usado no tiene influencia ni por el tipo de colecta ni por la manipulación previa a la evaluación para eliminar el plasma seminal.

Respecto a la viabilidad, en este trabajo encontramos un promedio de 66.8 ± 14.4%. Este valor es parecido al de Ugarelli *et al*., (2017) con 66.38 ± 4.61 % y cercano al de Santiani *et al*., (2016), donde encontraron 60.58 ± 12.12%. Ambos trabajos emplearon la misma metodología aplicada en nuestro estudio; por lo que, la diferencia entre los resultados podría radicar en el tamaño muestral empleado: 76 muestras vs 47 de nuestro trabajo. Mientras que Cheuquemán *et al*., (2013) encontraron 57 ± 8%, valor muy por debajo de lo obtenido en nuestro trabajo, siendo la posible razón de esta la diferencia el origen de la muestra, epidídimo vs vagina artificial.

No existen muchos trabajos que hayan empleado Mitotracker Deep Red para evaluar potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides de alpaca. Los valores obtenidos en este trabajo fueron de 63.4 ± 14.4%. Empleando el mismo fluorocromo tenemos el trabajode Santiani *et al*., (2016) donde encontraron 59.52 ± 19.19% y Allauca *et al*., (2019), donde encontraron 48.92 ± 12.41%. Estas diferencias podrían deberse al número de muestras trabajadas (47 de nuestro trabajo vs 76 y 41 respectivamente); ya que, el origen de los espermatozoides y la metodología de la evaluación es la misma. Existen otros estudios que evaluaron el potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides empleando otros tipos de fluorocromos. Santiani *et al*., (2016) también encontraron valores de 65.03 ± 15.92%, pero empleando MitoTracker CMXRos. La cercanía de este valor con el obtenido por nosotros tal vez de debió a que se empleó la misma metodología que la de nuestro trabajo. Cheuquemán *et al*., (2013) determinaron un 66.32 ± 9.51% pero empleando JC-1 y muestra de eyaculado

de alpaca. La cercanía podría deberse a que ambos fluorocromos tienen un funcionamiento parecido.

En el caso de la presencia de protaminas, este es el primer reporte que describe los porcentajes de presencia en espermatozoides epididimarios de alpaca empleando el fluorocromo Chromomycin A3 (CMA3) y leído en citometría de flujo con analizador de imágenes. Para este trabajo encontramos 6.25 ± 8.76% de CMA3 alto. En bovinos, Moore, (2014) determino un 2.55 ± 0.77%, Andraszek *et al*., (2014) determinaron un 1.35% y Kumaresan *et al*., (2017), donde asociaron la presencia de protaminas con el porcentaje de tioles y disulfidos libres y la fragmentación de ADN, encontrando valores de 2.88 ± 0.28% en machos con fertilidad comprobada superior al promedio, 4.65 ± 0.43% en machos de fertilidad promedio y 6.23 ± 1.43 en machos con fertilidad menor al promedio. Los valores hallados en los dos primeros trabajos son menores a los encontrados en nuestro trabajo mientras que, nuestro valor es parecidos al encontrado en toros con fertilidad menor al promedio. Otra especie relacionada a la alpaca son los porcinos, Czubaszek *et al*., (2019) dividieron las muestras por edades: entre 7 a 8 meses presentaron 9.78 ± 14.96 %, entre 20 a 26 meses presentaron 1.55 ± 3.07% y en mayores a 36 meses presentaron 6.4 ± 1.12%. En este caso, los valores que se hallaron en este trabajo son cercanos a los valores hallados en verracos mayores de 36 meses, los cuales no son empleados como reproductores principales. Comparando nuestros resultados con los mostrados de bovinos y verracos, nos podemos dar cuenta que la alpaca encaja con machos de fertilidad baja; sin embargo, las muestras con las que hemos trabajado en este estudio han sido recuperadas de machos que fueron enviados a camal, bien porque fueron criados para engorde o por ser machos con problemas reproductivos.

VI CONCLUSIONES

- Se logro confirmar que el gen PRM3 está presente en el genoma de la alpaca.
- Los cebadores empleados en este estudio no fueron los ideales para determinar la presencia del gen PRM1 en el genoma de la alpaca.
- La expresión del gen PRM3 fue alta, lo que indica alta producción de protamina 3 en el espermatozoide de alpaca.
- Este trabajó determinó que a mayor expresión del gen PRM3, mayor presencia de protaminas.
- El gen PRM3 podría emplearse como marcador molecular.

VII RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con el estudio del gen PRM1 ya que, la literatura menciona que es la variante más abundante en mamíferos.
- Se recomienda secuenciar al gen PRM3 para continuar con su estudio.
- Se recomienda realizar estudios que permitan emplearlo como marcador molecular.

VIII Literatura Citada

Abraham, M. C., De Verdier, K., Båge, R., & Morrell, J. M. (2017). Semen collection methods in alpacas. *Veterinary Record*, *180*(25), 613. https://doi.org/10.1136/vr.104074

Abraham, M.C, Puhakka, J., Ruete, A., Al-Essawe, E. M., Verdier, K., Morrell, J. M., & Båge, R. (2016). Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *58*(1). https://doi.org/10.1186/s13028-016-0191-x

Aitken, R. J., Jégou, B., Skakkebæk, N. E., Eliasson, R., & Jørgensen, N. (2006). Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology*, *29*(1), 69–75. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00630.x

Alarcón B., V., García V., W., Bravo, P. W., & Bravo, P. W. (2012). Inseminación Artificial De Alpacas Con Semen Colectado Por Aspiración Vaginal Y Vagina Artificial. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *23*(1), 58–64. https://doi.org/10.15381/rivep.v23i1.882

Allauca, P., Ugarelli, A., & Santiani, A. (2019). Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. *Rev Inv Vet Perú*, *30*(1), 288–298.

Andraszek, K., Banaszewska, D., Czubaszek, M., Wójcik, E., & Szostek, M. (2014). Comparison of different chromatin staining protamine family of sperm nuclear techniques for bull sperm. *Archiv Tierzucht*, *57*(13), 1–15. https://doi.org/10.7482/0003-9438-57-013

Aoki, V. W., & Carrell, D. T. (2003). Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression, and relationship with male infertility. *Asian Journal of Andrology*, *5*(4), 315–324. http://doi.org/10.1093/molehr/gah258

Ataya, F. S., Fouad, D., Al-Olayan, E., & Malik, A. (2012). Molecular cloning, characterization, and predicted structure of a putative copper-zinc SOD from the camel, Camelus dromedaries. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(1), 879–900. https://doi.org/10.3390/ijms13010879

Avila, F., Baily, M., Perelman, P. L., Das, P., Pontius, J., Chowdhary, R., Owens, E., Johnson, W., Merriwether, D., & Raudsepp, T. (2014). A Comprehensive Whole-Genome Integrated Cytogenetic Map for the Alpaca (Lama pacos). *Cytogenetic and Genome Research*, *144*(February), 193–204. https://doi.org/10.1159/000370329

Ax, R.L., Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D., Hafez, B and Bellini, M. (2000). Reproduction in farm animals. In *Reproduction in Farm Animals* (7th ed.).

Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, *8*(9). https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227

Banda, J, Evangelista-Vargas S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, S. A. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservaciónde espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, *21*(2), 145–153. https://doi.org/doi:10.15381/rivep.v24i2.2469

Barazani, Y., Agarwal, A., & Sabanegh, E. S. (2014). Functional sperm testing and the role of proteomics in the evaluation of male infertility. *Urology*, *84*(2), 255–261. https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.04.043

Bravo, P. W., Skidmore, J. A., & Zhao, X. X. (2000). Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. *Animal Reproduction Science*, *62*(1–3), 173–193. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00158-5

Bravo Z, & Valdivia M. (2018). Effect of Foetal Bovine Serum on sperm motility, acrosome reaction and spermatic interaction to zona pellucida in alpacas (Vicugna pacos). *Reproduction in Domestic Animals*, *53*, 695–699. https://doi.org/10.1111/rda.13159

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

Cañón, J. (2006). Using molecular information in animal improvement programs. In *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (Vol. 7, Issue 1). http://www.ucm.es/info/genetvet

Casas, E. (2006). Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*, *14*(April), 24–31.

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

Cho C. (2012). Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization. *Nature Reviews Urology* 9: 550-560. https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.167

Cho, C. L., & Agarwal, A. (2018). Role of sperm DNA fragmentation in male factor infertility: A systematic review. *Arab Journal of Urology*, *16*(1), 21–34. https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.002

Choez, K., Evangelista, S., & Santiani, A. (2015). Comparación de las características seminales de las alpacas huacaya y suri. *Spermova*, *5*(1), 139–143. https://doi.org/10.18548/aspe/0002.31

Cruz, A., Cervantes, I., Burgos, A., Morante, R., & Gutiérrez, J. P. (2015). Estimation of genetic parameters for reproductive traits in alpacas. *Animal Reproduction Science*, *163*, 48–55. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.09.017

Czubaszek, M., Andraszek, K., & Banaszewska, D. (2019). Influence of the age of the individual on the stability of boar sperm genetic material. *Theriogenology*. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.018

Dorus, S., Wasbrough, E. R., Busby, J., Wilkin, E. C., & Karr, T. L. (2010). Sperm Proteomics Reveals Intensified Selection on Mouse Sperm Membrane and Acrosome Genes. *Mol. Biol. Evol.*, *27*(6), 1235–1246. https://doi.org/10.1093/molbev/msq007

Dunn, I. C., Miao, Y. W., Morris, A., Romanov, M. N., Wilson, P. W., & Waddington, D. (2004). A study of association between genetic markers in candidate genes and reproductive traits in one generation of a commercial broiler breeder hen population. *Heredity*, *92*, 128–134. https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800396

Evangelista-Vargas, S. (2011). *EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA Proteína rica en Cisteína asociada a Mitocondrias Espermáticas (SMCP) EN ALPACA (Lama pacos).* NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.

Evangelista-Vargas, S., & Santiani, A. (2017). Detection of intracellular reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide) and lipid peroxidation during cryopreservation of alpaca spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, *52*, 819–824. https://doi.org/10.1111/rda.12984

Evangelista, S. (2011). *Evaluación de la expresión del gen de la Proteína rica en Cisteína asociada a Mitocondrias Espermáticas (SMCP) en alpaca (Lama pacos).* Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Fernández, A., Gutiérrez, G., & Ponce De León, F. (2019). Identificación bioinformática de Polimorfismos de Nucleótido Simple (PNSs) en genes candidatos para las características de la fibra en alpacas (Vicugna pacos) phisms (SNPs) in candidate genes for fiber characteristics in Introducción Material y méto. *Revista Peruana de Biología*, *26*(1), 87–94.

Florentini, E A; Vasquez J H; Valdivia, M. (2011). Detección de la expresión de los genes Calmegin y Beta Fertilina en testículos de alpacas macho (Lama pacos). *Spermova*, *1*(1), 100–101.

Francis, S., Yelumalai, S., Jones, C., & Coward, K. (2014). Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Human Fertility*, *January*, 1–10. https://doi.org/10.3109/14647273.2014.915347

García, W., Ccana E., & Apaza, E. (2009). *Manual de empadre controlado de alpacas*. Perú: Soluciones Prácticas-ITDG. 40p.

Ganoza, L., Moscol, S., Ugarelli, A., & Evangelista-Vargas., S. (2022). Diseño y validación de cebadores para el gen Calmegin en alpacas. *Revista Veterinaria*, 33(1),69-70.

http://dx.doi.org/10.30972/vet.3315885

Góngora-rodríguez, A., & Fontanilla-ramírez, D. (2010). The influence of sperm DNA fragmentation on assisted reproduction techniques and embryo quality. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecologí*, *61*(2), 160–164.

Grzmil P, Boinska D, Kleene K, Adham I, Schluter G, Kamper M, Buyandelger B, Meinhardt A, Wolf S y Engel W. 2008. Prm3, the Fourth Gene in the Mouse Protamine Gene Cluster, Endoces a Conserved Acidic Protein that Affect Sperm Motility. Biology pf Reproduction 78:958-967.

Hamilton, T., & Assumpção, M. (2019). Sperm DNA fragmentation: causes and identification. *Zygote*, 1–8. https://doi.org/10.1017/S0967199419000595

Harayama, H., Minami, K., Kishida, | Kazumi, & Noda, | Taichi. (2017). Protein biomarkers for male artificial insemination subfertility in bovine spermatozoa. *Reproductive Medicine and Biology*, *16*, 89–98. https://doi.org/10.1002/rmb2.12021

Hashemi, M. S., Mozdarani, H., Ghaedi, K., & Nasr-Esfahani, M. H. (2018). Among seven testis-specific molecular markers, SPEM1 appears to have a significant clinical value for prediction of sperm retrieval in azoospermic men. *Andrology*, *6*(6), 1–6. https://doi.org/10.1111/andr.12528

Huanca, W., & Aams, G. P. (2007). Semen Collection and Artificial Insemination in Llamas and Alpacas. In W. R. T. R. S. Youngquist (Ed.), *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (2nd ed., pp. 869–873). W.B. Saunders. https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50120-3

IV Censo Nacional Agropecuario-2012. (2013).

Jodar, M., & Oliva, R. (2014). Protamine Alterations in Human Spermatozoa. In E.Baldi and M. Muratori (Ed.), *Genetics Damage in HUman Spermatozoa, Advance in Experimental Medicine and Biology* (pp. 83–102). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7783-9

Jodar, M., Soler-Ventura, A., & Oliva, R. (2017). Semen proteomics and male infertility. *Journal of Proteomics*, *162*, 125–134. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.08.018

Kizilay, F., Altay, B. B., Kızılay, F., & Altay, B. B. (2017). Sperm function tests in clinical

practice. *Turkish Journal of Urology*, *43*(434), 393–400. https://doi.org/10.5152/tud.2017.96646

Kumaresan, A., Johannisson, A., Al-essawe, E. M., & Morrell, J. M. (2017). Sperm viability , reactive oxygen species, and DNA fragmentation index combined can discriminate between above- and below-average fertility bulls. *Journal of Dairy Science*, *100*(7), 5824–5836. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12484

Lang, K. D. M., Wang, Y., & Plante, Y. (1996). Fifteen polymorphic dinucleotide microsatellites in llamas and alpacas. *Molecular Genetic Markers*, *27*, 285–294.

Lolis, D., Georgiou, I., Syrrou, M., Zikopoulos, K., Konstantelli, M., & Messinis, I. (1996). Chromomycin A3-staining as an indicator of protamine deficiency and fertilization. *International Journal of Andrology*, *19*(1), 23–27. https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00429.x

Love, C. C. (2018). Sperm quality assays: How good are they? The horse perspective. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 194). https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.077

Luo, H., Zhou, Y., Li, Y., & Li, Q. (2013). Splice variants and promoter methylation status of the Bovine Vasa Homology (Bvh) gene may be involved in bull spermatogenesis. *BMC Genetics*, *14*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-58

McGregor B. (2005) Production, attributes and relative value of alpaca fleeces in southern Australia and implications for industry development. *Small Ruminant Research*, 61(2-3), 93-111. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.001

McGregor B, Ramos H, Quispe E. (2011) Variation of fiber characteristics among sampling sites for Huacaya alpaca fleeces from the High Andes. *Small Ruminant Research*, 102 (2-3), 191-196. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.07.016

Melo. M. (2012). Asistencia técnica dirigida en mejoramiento genético de alpacas. In *Guía Técnica Agrobanco* (pp. 4–36).

Moore, S. S. (2014). Sperm protamine deficiency correlates with sperm DNA damage in Bos indicus bulls. *Andrology*, *2*, 370–378. https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00196.x

Morton, K. M., Thomson, P. C., Bailey, K., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2010). Quality parameters for alpaca (Vicugna pacos) semen are affected by semen collection procedure. *Reproduction in Domestic Animals*, *45*(4), 637–643. https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01321.x

Muchotrigo D, Trelles X, Choez K, Evangelista S, S. A. (2013). Probabilidad de obtención de semen de alpaca utilizando vagina artificial en lotes de machos sin entrenamientos. *Spermova*, *3*(1), 95–96.

Murga G, Manchego A, Castro G, Pezo D, Sandoval N. (2018) Expresión y cuantificación de RORyT e IL-17 en mucosa intestinal de crías de alpacas (vicugna pacos) Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 29(3), 1009-1017. http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i3.14831.

Niżański, W., Partyka, A., & Prochowska, S. (2016a). Evaluation of spermatozoal function—useful tools or just science. *Reproduction in Domestic Animals*, *51*(suppl. 1), 37–45. https://doi.org/10.1111/rda.12786

Niżański, W., Partyka, A., & Prochowska, S. (2016b). Evaluation of spermatozoal function-useful tools or just science. *Reproduction in Domestic Animals*, *51 Suppl 1*(1), 37–45. https://doi.org/10.1111/rda.12786

Oehninger, S., Franken, D. R., & Ombelet, W. (2014). Sperm functional tests. *Fertility and Sterility*, *102*(6), 1528–1533. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.044

Oehninger, S., Franken, D. R., Sayed, E., Barroso, G., & Kolm, P. (2000). Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: A meta-analysis. *Human Reproduction Update*, *6*(2), 160–168. https://doi.org/10.1093/humupd/6.2.160

Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, *12*(4), 417–435. https://doi.org/10.1093/humupd/dml009

Olivera, M., Agr, S., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). *El espermatozoide , desde la eyaculación hasta la fertilización* (Vol. 19).

Organization, W. H. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of*

human semen: Vol. 5th editio.

Orozco-Ugarriza, Mauricio; Franco-Anaya, Piedad; Olivo-Martinez, Y. (2016). Validación In silico de oligonucleótidos-cebadores para la detección especifica de Salmonella spp . mediante reacción en cadema de la polimerasa. *Revista de Investigación Agropecuaria y Desarrollo Sostenible*, *1*, 42–50.

Panner Selvam, M. K., & Agarwal, A. (2018). Update on the proteomics of male infertility: A systematic review. *Arab Journal of Urology*, *16*(1), 103–112. https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.016

Quispe, E., Gutiérrez, J. P., & Gutiérrez, A. (2007). Plan de Mejoramiento Genético para Alpacas de color blanco en la Región de Huancavelica. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*, *15*(January 2012).

Ribas-Maynou, J., & Benet, J. (2019). Single and double strand sperm DNA damage: Different reproductive effects on male fertility. *Genes*, *10*(2). https://doi.org/10.3390/genes10020105

RL, B. (2006). Aplicaciones de los marcadores genéticos en la identificación individual de animales domésticos. *Ciencia Veterinaria*, *8*, 74–75.

Rodriguez, J., Huanca, W., Ramos, M., Vasquez, M., & Espinoza, J. (2013). Biophysical and biochemical characteristics os alpaca semen after collection by electroejaculation. *Reproduction, Fertility and Development*, *25*(1), 272. https://doi.org/10.1071/RDv25n1Ab249

Santiani, A., Evangelista, S., Cheuquemán, C., Von Baer, A., Risopatrón, J., & Sánchez, R. (2012). Evaluación de la integridad de adn mediante citometría de flujo en espermatozoides de alpaca criopreservados con análogos de superóxido dismutasa. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *23*(2), 182–191.

Santiani, Alexei, Ugarelli, A., & Evangelista-Vargas, S. (2016). Characterization of functional variables in epididymal alpaca (Vicugna pacos) sperm using imaging flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, *173*, 49–55. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.010

Sha, J., Zhou, Z., Li, J., Yin, L., Yang, H., Hu, G., Luo, M., Chan, H. C., & Zhou, K. (2002).

Identification of testis development and spermatogenesis-related genes in human and mouse testes using cDNA arrays. *Molecular Human Reproduction*, *8*(6), 511–517. https://doi.org/10.1093/molehr/8.6.511

Silva, P. F. N., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, *65*(5 SPEC. ISS.), 958–978. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010

Steger, K., & Balhorn, R. (2018). Sperm nuclear protamines: A checkpoint to control sperm chromatin quality. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, *47*(4), 273–279. https://doi.org/10.1111/ahe.12361

Sukhikh, G. T., Bourmenskaya, O. V., Smolnikova, V. Y., Krasnoschoka, O. E., Trofimov, D. Y., Donnikov, A. E., & Kalinina, E. A. (2012). Protamine and fertilin mRNA: Potential biomarkers of assisted reproductive technology outcomes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *153*(4), 513–515. https://doi.org/10.1007/s10517-012-1754-0

Tataje, L. alberto. (2013). *Expresión testicular de ciclina A1 (CCNA1) en alpacas (Lama pacos)* (Vol. 1). Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Taylor, J. F., Schnabel, R. D., & Sutovsky, P. (2018). Review: Genomics of bull fertility. *Animal*, *12*(S1), 172–183. https://doi.org/10.1017/S1751731118000599

Thornton, B., & Basu, C. (2011). Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *39*(2), 145–154. https://doi.org/10.1002/bmb.20461

Tibary, A., & Vaughan, J. (2006). Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research*, *61*(2-3 SPEC. ISS.), 283–298. https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.018

Torregrosa, N., Domínguez-Fandos, D., Camejo, M. I., Shirley, C. R., Meistrich, M. L., Ballescà, J. L., & Oliva, R. (2006). Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients. *Human Reproduction*, *21*(8), 2084–2089. https://doi.org/10.1093/humrep/del114

Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S., & Santiani, A. (2017). Evaluation of acrosome integrity

in epidydimal alpaca sperm by flow cytometry. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *28*(1). https://doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12947

Ugarelli, Alejandra, Evangelista-Vargas, S., Santiani, A., & Santiani, A. (2017). Evaluación de la Integridad Acrosomal en Espermatozoides Epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *28*(1), 130–140. https://doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12947

Van Arendonk, J. a M. (2014). Textbook Animal Breeding and Genetics. *Textbook Animal Breeding and Genetics*, 2015. https://wiki.groenkennisnet.nl/display/TAB/Textbook+Animal+Breeding+and+Genetics

Wang, C., & Swerdloff, R. S. (2014). Limitations of Semen Analysis as a Test of Male Fertility and Anticipated Needs from Newer Tests. *Fertil*, *102*(6), 1502–1507. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.10.021

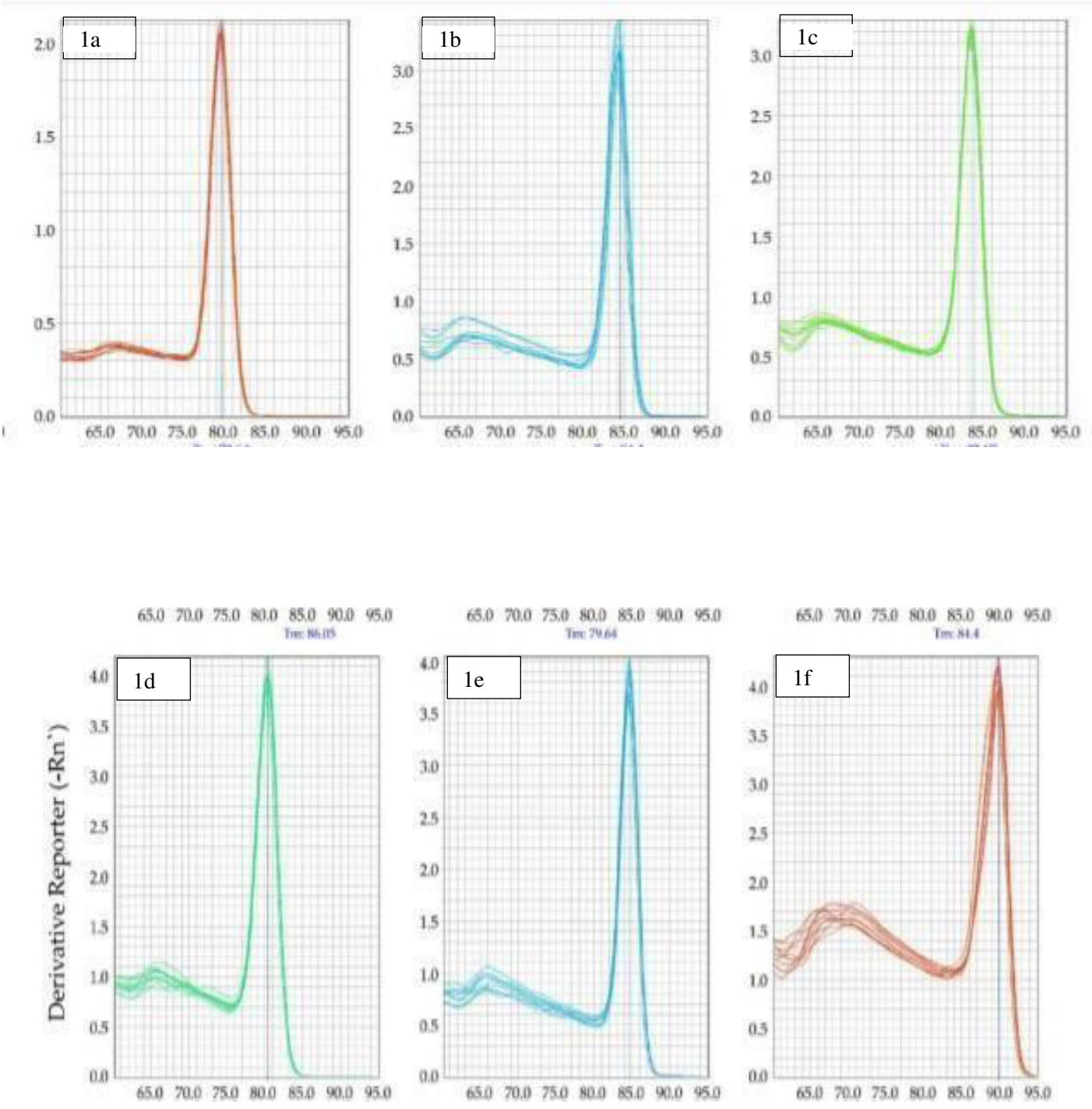
Yathish, H. M., Kumar, S., Chaudhary, R., Mishra, C., Sivakumar, A., Kumar, A., Chauhan, A., Ghosh, S. K., & Mitra, A. (2018). Nucleotide variability of protamine genes influencing bull sperm motility variables. *Animal Reproduction Science*, *193*(April), 126–139. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.060

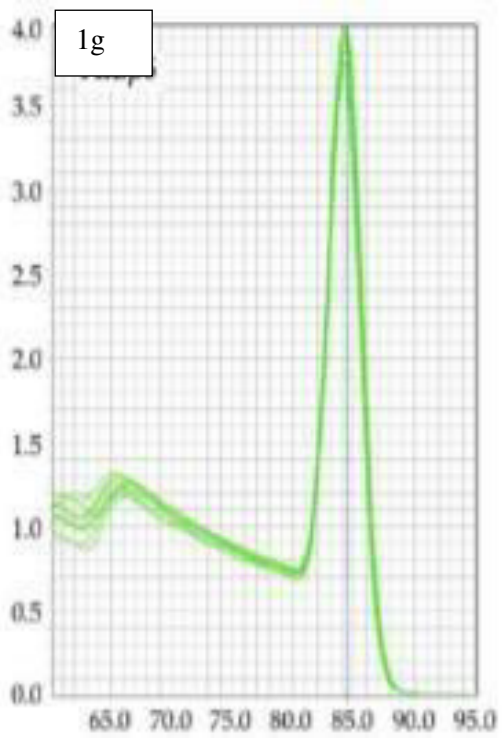
X ANEXOS

Anexo 1. Cuadro 10. Niveles de expresión obtenido por cada uno de los individuos de la muestra.

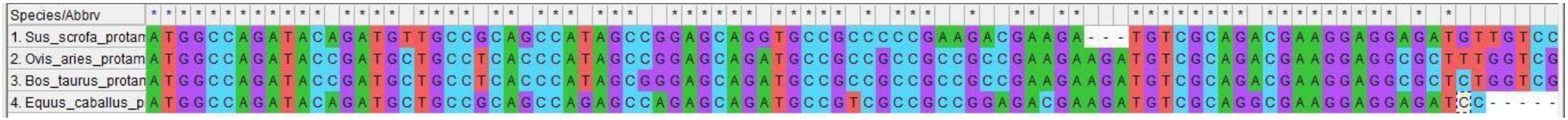
Muestra	Valores de expresión génica	Muestra	Valores de expresión génica
1a-01/18	93,548	31a-01/22	80,282
1b-01/18	95,798	32b-01/22	91,335
2a-04/18	67,422	33a-01/22	78,607
3b-05/18	60,609	34a-01/22	97,13
4a-05/18	78,752	42a-01/22	58,894
5a-08/18	65,457	43b-01/22	90,997
6a-10/18	71,821	44a-01/22	96,878
7b-11/18	85,103	44b-01/22	93,548
8a-04/19	79,02	45a-01/22	75,798
8b-04/19	80,282	48a-01/22	77,422
9a-05/19	21,335	49a-01/22	60,609
10a-05/19	68,607	50b-01/22	73,102
11a-06/19	73,11		
11b-06/19	78,894		
12a-06/19	97,209		
13b-06/19	26,878		
14a-06/19	83,718		
15a-06/19	66,01		
16a-06/19	74,066		
17b-01/22	90,012		
18a-01/22	94,112		
18b-01/22	96,041		
19a-01/22	95,40		
20a-01/22	59,45		
21a-01/22	87,447		
22a-01/22	77,755		
23b-01/22	96,657		
24a-01/22	85,48		
24b-01/22	84,10		
25a-01/22	80,842		
28a-01/22	95,648		
29a-01/22	93,102		
30b-01/22	90,279		

Anexo 2. Amplificaciones obtenidas durante la estandarización del protocolo de RT-qPCR, para el genPRM3.



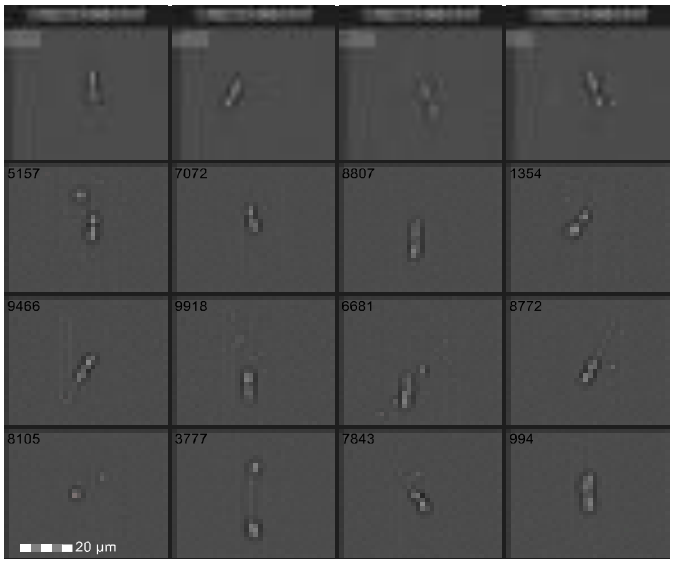

1g
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
65.0
70.0
75.0
80.0
85.0
90.0
95.0

Anexo 3. Alineamiento de las 4 secuencias de especies filogenéticamente relacionas a la alpaca empleando la herramienta clustal w. Los asteriscos en la parte superior indican la posición dentro de la secuencia donde hay igualdad de bases nitrogenadas

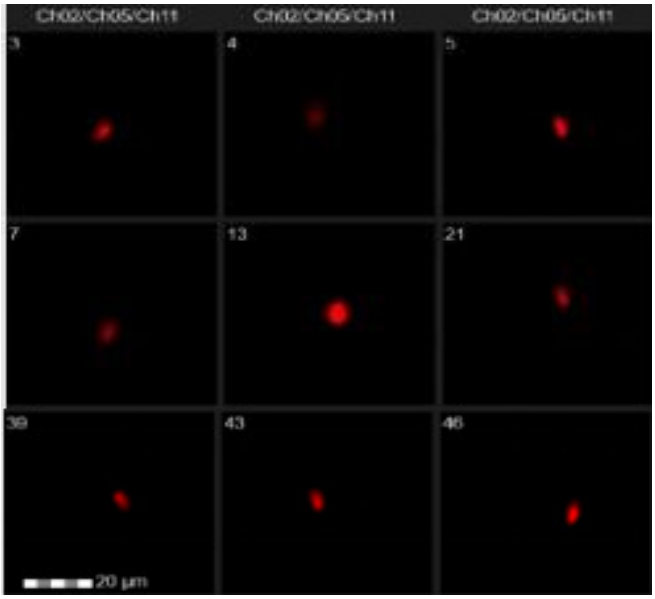


Anexo 4. Se observan diversas imágenes de espermatozoides de alpaca incubados con FITC-PSA (Ch02), Yoduro de propidio (PI) (Ch05) y Mitotracker DeepRed FM (Ch11). A) Espermatozoides vivos con acrosoma intacto. B) Espermatozoides muertos con acrosoma intacto. C) Espermatozoides vivos con acrosoma dañado. D) Espermatozoides muertos con acrosoma dañado. E) Espermatozoides vivos con acrosoma dañado y potencial de membrana mitocondrial alta.

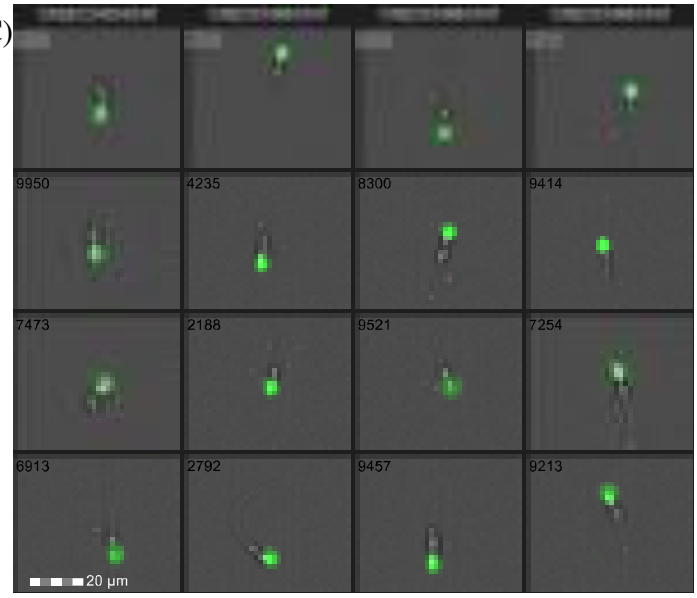
A)



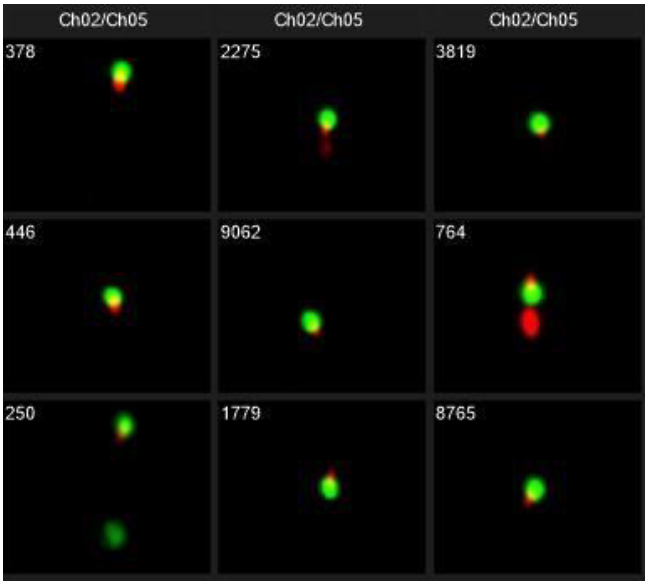
B)

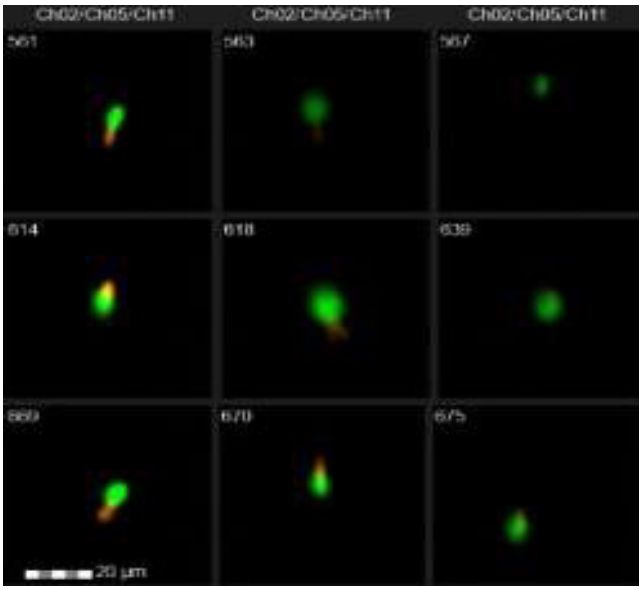


C)



D)



E) 
Ch02/Ch05/Ch11
Ch02/Ch05/Ch11
Ch02/Ch05/Ch11
561
563
567
614
618
639
669
670
675
20 µm

Anexo 5. Histograma representativo de la evaluación del potencial de membrana mitocondrial. Se observan 2 picos claramente diferenciado, siendo el mayor pico asociado a potencial de membrana mitocondrial alto.

