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

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Unidad de Posgrado

Caracterización de células germinales testiculares de Vicugna pacos (alpaca) y expresión de biomarcadores específicos en tejido gonadal

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

AUTOR

Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA

ASESOR

Dr. Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2018



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

Mujica, F. (2018). *Caracterización de células germinales testiculares de Vicugna pacos (alpaca) y expresión de biomarcadores específicos en tejido gonadal*. [Tesis de doctorado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. Nº 039-UPG-FCB-2018

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADEMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Siendo las 10:10 horas del día 14.12.2018 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por la:

Dra.	Libertad Alzamora Gonzales	e integrado por
Dra.	Mónica Yolanda Paredes Anaya	(Miembro)
Dr.	Armando Yarleque Chocas	(Miembro)
Dr.	Pedro Luis Castellanos Sánchez	(Miembro)
Dr.	Pablo Sergio Ramírez Roca	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas, que solicitara el Señor Magíster Don **FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA.**

Después de darse lectura al Expediente Nº 039-UPG-FCB-18, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

"Caracterización de células germinales testiculares de *Vicugna pacos* (alpaca) y expresión de biomarcadores específicos en tejido gonadal" y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: ..... Excelente con la nota de 19 .....

A continuación la Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas al Magíster..... Fidel Rodolfo Mujica Lengua .....

Siendo las..... 11:46 ..... se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día viernes 14 del mes de diciembre del año 2018.

.....
Dra. Libertad Alzamora Gonzales
Profesora Principal a D.E.
PRESIDENTE

.....
Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca
Profesor Principal a D.E.
ASESOR

.....
Dra. Mónica Yolanda Paredes Anaya
Profesora Principal a T. C.
MIEMBRO

.....
Dr. Armando Yarleque Chocas
Profesor Principal a T.C.
MIEMBRO

.....
Dr. Pedro Luis Castellanos Sánchez
Profesor Principal a T.C.
MIEMBRO

AGRADECIMIENTOS

A la Mg. Martha Esther Valdivia Cuya, del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal, UNMSM, por proponerme el tema, por su Inmenso apoyo y por esa maravillosa experiencia en el 303.

Al Dr. Pablo Ramírez Roca, del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, UNMSM, Asesor de la presente Tesis, por sus consejos y orientaciones en los aspectos moleculares.

Al Dr. Jaime Ruíz Béjar, del Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, gracias por confiarme las llaves del Laboratorio y por todo el apoyo.

Al Dr. Luis De Stefano y la Blga. Mónica Correa, de la UPCH, Laboratorio de Genómica, por los ensayos de extracción de RNA. De igual forma, al Dr. Iván Best, de FARVET-Chincha, por el análisis de citometría de flujo.

A todos mis profesores del Doctorado en Ciencias Biológicas, UNMSM, en Especial a la Dra. Rina Ramírez, Dr. Jean-Crhistophe Pintaud†, Dra. Betty Millán, Dra. Libertad Alzamora, Dra. Danae Liviac, Dr. Juan Luis Martínez y Dr. Pedro Castellanos. ¡Seré leal a sus enseñanzas y ejemplos!.

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi *Alma Mater*, por la subvención económica a través del Proyecto FOCAM: Aislamiento y purificación de células madre espermatogoniales durante el desarrollo testicular postnatal en *Vicugna pacos* (“alpaca”), aprobado mediante Resolución de Consejo Universitario Nº 859-2012-UNSCH-CU, que permitió solventar parte del presupuesto.

DEDICATORIA

A mi querida esposa Graciela y a nuestros hijos

César Miguel, Jessenia Valeria,

Fidel Ángel y Gabriela Lisha.

ÍNDICE GENERAL

		Pág.
Lista de tablas ……..		v
Lista de figuras …….		vi
Lista de abreviaturas ……		ix
Resumen ……		x
Abstract ……..		xi
I.-	INTRODUCCIÓN ……..	01
II.-	ANTECEDENTES ……	03
III.-	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS ……	28
IV.-	MATERIALES Y MÉTODOS ……..	30
V.-	RESULTADOS ……..	48
VI.-	DISCUSIÓN ……	72
VII.-	CONCLUSIONES ……..	81
VIII.-	RECOMENDACIONES ……..	82
IX.-	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……	83
X.-	ANEXOS ……..	94

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Relación del tamaño y peso testicular con la edad y el peso corporal en alpacas…… 11

Tabla 2. Correlación entre el peso corporal y el peso testicular en diferentes mamíferos …… 12

Tabla 3. Categorías de dentición en alpacas y estimación de la edad ……. 16

Tabla 4. Biomarcadores seleccionados para SSC de alpaca … 24

Tabla 5. Preparación de la mezcla de reacción para el Tratamiento con DNasa I ……. 42

Tabla 6. Preparación de las mezclas de reacción para la muestra y controles negativos en la síntesis de cDNA ……... 43

Tabla 7. Preparación de las mezclas de reacción para el control positivo en la síntesis de cDNA ……. 44

Tabla 8. Mezcla de reacción para las muestras para PCR convencional ……. 45

Tabla 9. Mezclas de reacción para los controles en la PCR convencional …… 45

Tabla 10. Secuencias de los *primers* para los genes experimentales y genes de referencia (*housekeeping*) detectados en tejido gonadal de alpaca …… 62

Tabla 11. Detección de biomarcadores para SSC por PCR convencional en tejido testicular de alpaca a diferentes edades .. 64

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Fases de la espermatogénesis en ratón …….. 07

Figura 2. Espermatogénesis en no primates y primates …… 09

Figura 3. Identidad de las espermatogonias…… 10

Figura 4. Estimación de la edad de las alpacas por la evolución de la erupción dentaria …… 18

Figura 5. Autorrenovación y diferenciación de las espermatogonias…… 20

Figura 6. El modelo A_s …….. 20

Figura 7. Ubicación de las espermatogonias no diferenciadas en los testículos. …… 21

Figura 8. Rol de *Plzf* o *Zbtb16* en la espermatogénesis y en la regulación de la autorrenovación y mantenimiento de la población de células madre en testículos de ratón …….. 25

Figura 9. Resumen de la expresión de biomarcadores en linajes espermatogénicos de macaco y ratón adultos ……. 26

Figura 10. Heterogeneidad de la población $A_s/A_{pr}/A_{al}$ revelada por el perfil de expresión génica en ratón ……. 27

Figura 11. Flujograma experimental ……... 31

Figura 12. Colecta de testículos de alpacas pre púberes y púberes en la estancia alpaquera de Pampawasi, distrito de Chuschi, provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho … 32

Figura 13. Colecta de testículos de alpacas jóvenes y adultas en el Matadero Municipal de Huancavelica ……. 33

Figura 14. Colecta de testículos de alpacas púberes en las estancias alpaqueras de Santa Fe y Licapa, distrito de Paras, provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho …….. 34

Figura 15. Colecta de testículos de alpacas adultas vivas ……. 34

Figura 16. Medición de las dimensiones testiculares ……. 35

Figura 17. Espermatogonias de alpaca aisladas por digestión enzimática…… 48

Figura 18. Viabilidad de espermatogonias de alpaca aisladas por digestión enzimática respecto a la edad…….. 49

Figura 19. Variación de la viabilidad durante el aislamiento de espermatogonias de alpaca en relación a la edad……. 50

Figura 20. Rendimiento del aislamiento de espermatogonias de alpaca por digestión enzimática respecto a la edad ……. 51

Figura 21. Variación del rendimiento obtenido durante el aislamiento de espermatogonias en relación a la edad de la alpaca …….. 52

Figura 22. Análisis por citometría de flujo de las células germinales testiculares de alpaca aisladas de por digestión enzimática …….. 53

Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. RNA de tejido testicular de ratón extraído con trizol, a partir de testículos frescos, bajo diferentes condiciones de manipulación ……. 55

Figura 24. Electroforesis de RNA extraído con trizol, bajo condiciones desnaturalizantes con formamida…….. 56

Figura 25. Electroforesis de RNA de tejido testicular de *Vicugna pacos* extraído con trizol ……... 57

Figura 26. Electroforesis en RNA de tejido testicular de *Vicugna pacos* tratado con DNasa I……. 58

Figura 27. Electroforesis en RNA de tejido testicular de *Vicugna pacos* extraído con fenol/cloroformo luego del primer tratamiento con DNasa I ……. 59

.

Figura 28. Electroforesis en RNA de tejido testicular de *Vicugna pacos* extraído con fenol/cloroformo luego del segundo tratamiento con DNasa I…… 60

Figura 29. Control de calidad del RNA de tejido testicular de alpaca conservado a -80ºC luego de 6 meses ……..... 61

Figura 30. Detección cualitativa de los biomarcadores positivos *Nanos2* (113 bp) y *Lin28* (149 bp) y de los genes de referencia *Rplp0*(135 bp) y *β-actina* (128 bp) en tejido gonadal de alpaca macho pre púber de 12 meses de edad ……..... 65

Figura 31. Detección cualitativa del biomarcador negativo *Ckit* (112 bp) y el gen de referencia *Rplp0* (135 bp) en tejido gonadal de alpaca macho pre púber de 12 meses de edad ……. 66

Figura 32. Aspecto general de los testículos descapsulados de alpaca según la edad ……. 67

Figura 33. Peso y longitud testicular en alpacas según la edad …. 69

Figura 34. Ancho y circunferencia testicular en alpacas según la edad …… 70

Figura 35. Volumen testicular en alpacas según la edad ……. 71

LISTA DE ABREVIATURAS

A_{dark}	:	Espermatogonias de tipo A oscuras
A_{pale}	:	Espermatogonias de tipo A claras
A_s	:	Espermatogonias de tipo A simples
A_{pr}	:	Espermatogonias de tipo A apareadas
A_{al}	:	Espermatogonias de tipo A alineadas
BLL	:	Boca llena (seis dientes incisivos)
cDNA	:	DNA complementario
DEPC	:	Dietilpirocarbonato
DL	:	Dientes de leche
2D	:	Dos dientes incisivos
4D	:	Cuatro dientes incisivos
DBA	:	Aglutinina de *Dolichos biflorus*
DMEM	:	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	:	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	:	Acido Etilendiaminotetraacético
EGF	:	Factor de Crecimiento Epidérmico
EGFR	:	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
EtBr	:	Bromuro de Etidio
FITC	:	Isotiocianato de Fluoresceína
GADPH	:	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
gDNA	:	DNA genómico
NCBI	:	National Center of Biotechnology Information
PBS	:	Buffer Salino Fosfato
PCR	:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pg	:	Pico gramo
RNA	:	Ácido ribonucleico
RT-PCR	:	Retrotranscripción y PCR
SSC	:	Células Madre Espermatogoniales
TAE	:	Tris Acido Etilendiaminotetraacético

RESUMEN

El objetivo fue aislar células germinales testiculares de *Vicugna pacos*, caracterizarlas morfológicamente y detectar a nivel transcripcional la expresión de biomarcadores específicos para Células Madre Espermatogoniales en tejido gonadal durante el desarrollo testicular posnatal. Los testículos fueron colectados en estancias alpaqueras de Ayacucho y Huancavelica (Aprox. 4,200 m.s.n.m.) y en el Matadero Municipal de Huancavelica (Aprox. 3,600 m.s.n.m.). La biometría testicular, el aislamiento de espermatogonias y la determinación de viabilidad y rendimiento, así como la citometría de flujo, se hicieron a partir de muestras frescas. Para la extracción de RNA por el método del fenol/cloroformo, los testículos fueron previamente obtenidos por castración del animal vivo, transportados en nitrógeno líquido a -196°C y almacenados en ultracongelación a -80°C.Se diseñaron *primers* con el Programa Oligo6, a partir de exones rescatados y RNA ensamblados para alpaca, tomando como base los exones codificantes de cada uno de los biomarcadores encontrados en el genoma de *Bos taurus*, los mismos que fueron sintetizados por Macrogen (Corea del Sur) y utilizados para amplificar el cDNA de alpaca. La viabilidad y el rendimiento fueron superiores enalpacas de 10-12 meses de edad, con valores de 92.15% y 55 x 10^6 espermatogonias/ml, respectivamente. Las espermatogonias de alpaca tuvieron un diámetro promedio de 16 μ, las células germinales de alpaca mostraron reactividad frente al conjugado del fluorocromo isotiocianato de fluoresceína con la aglutinina de *Dolichos biflorus*. A partir de siete biomarcadores positivos para SSC seleccionados (*Zbtb16, GFR□-1, Stra8, Nanos2, Ngn3, Lin28* y *Ecad*), tres negativos (*Ckit, Sohlh1* y *Sohlh2*) y tres genes de referencia (*Rplp0*, *Gadph* y *Actb*), se lograron detectar *Nanos2, Lin28, Ckit, RPLP0* y *Actb* en tejido testicular de alpaca. Se concluye que la edad más apropiada para aislar espermatogonias, caracterizarlas morfológicamente y detectar biomarcadores específicos de SSC en alpaca, es de 10-12 meses.

Palabras Clave. *Alpaca, biometría testicular, biomarcadores testiculares, células madre espermatogoniales.*

ABSTRACT

The objective was to isolate testicular germ cells from *Vicugna pacos*, characterize them morphologically and detect at the transcriptional level the expression of specific biomarkers for Spermatogonial Stem Cells in gonadal tissue during postnatal testicular development. The testicles were collected in estancias alpaqueras of Ayacucho and Huancavelica (approximately 4,200 m.a.s.l.) and in the Matadero Municipal de Huancavelica (approximately 3,600 m.a.s.l.). Testicular biometry, the isolation of spermatogonia and the determination of viability and yield, as well as flow cytometry, were made from fresh samples. For the extraction of RNA by the phenol/chloroform method, the testicles were previously obtained by castration of the live animal, transported in liquid nitrogen at -196°C and stored in deep-freeze at -80°C. Primers were designed with the Oligo6 Program, from rescued exons and RNA assemblies for alpaca, based on the coding exons of each of the biomarkers found in the *Bos taurus* genome, which were synthesized by Macrogen (South Korea) and used to amplify the alpaca cDNA. Feasibility and yield were higher in alpacas of 10-12 months of age, with values of 92.15% and 55 x 10^6 spermatogonia/ml, respectively. Alpaca spermatogonia had an average diameter of 16 μ, the alpaca germ cells showed reactivity to fluorescein fluorochrome isothiocyanate conjugate with *Dolichos biflorus* agglutinin. From seven positive biomarkers for selected SSC (*Zbtb16, GFRα-1, Stra8, Nanos2, Ngn3, Lin28* and *Ecad*), three negative (*Ckit, Sohlh1* and *Sohlh2*) and three reference genes (*Rplp0, Gadph* and *Actb*); *Nanos2, Lin28, Ckit, RPLP0* and *Actb* were detected in testicular tissue of alpacas. It is concluded that the most appropriate age to isolate spermatogonia, characterize them morphologically and detect specific biomarkers of SSC in alpaca, is 10-12 months.

Keywords. *Alpaca, testicular biometry, testicular biomarkers, spermatogonial stem cells.*

I.- INTRODUCCIÓN

La crianza de *Vicugna pacos* “alpaca”, desde la época prehispánica, ha sido de vital importancia para los pobladores alto andinos y particularmente para miles de comunidades alpaqueras de los departamentos de Puno, Huancavelica, Junín, Arequipa, Ayacucho y Cusco, entre otros, que las aprovechan para obtener fibra, carne y transportar productos agrícolas, en zonas de gran altura, donde la agricultura y la ganadería basada en especies introducidas son poco viables.

Sin embargo, las alpacas, desde el punto de vista reproductivo, presentan dos grandes problemas: por un lado, la altísima tasa de hibridación por la cual la pureza genética de esta especie está muy deteriorada; y por otro lado, el alto índice de consanguinidad, que probablemente se traduce en una considerable frecuencia de defectos de conformación a nivel de aparato reproductor, facial, extremidades, columna vertebral y ubre, bajísima proporción del peso corporal respecto al peso testicular y diversas anormalidades genitales, que afectan significativamente el éxito de su reproducción al tener muy baja capacidad reproductiva y muy baja reserva de espermatozoides extra gonadales. Ambos problemas mencionados están en contra de la supervivencia de esta especie exponiéndola a un grave peligro de extinción, lo que repercutiría directamente en la sociedad y la economía de las comunidades andinas alpaqueras del Perú.

La biotecnología moderna representa una alternativa para abordar esta problemática: desde el campo, organizando los registros genealógicos del plantel de reproductores, en cada estancia alpaquera, conforme a la reglamentación nacional existente; y desde el laboratorio, profundizando los estudios relacionados con la pureza y estabilidad genética de los dos fenotipos de *Vicugna pacos*, Huacaya y Zuri, que no son razas (Presciuttini *et al.,* 2010); alternativa viable que puede permitir que progresivamente se pueda recuperar la pureza genética de la alpaca. Esto implica la instalación de un Banco de Recursos Genéticos que pueda abastecer del germoplasma necesario para realizar estudios orientados al cultivo de espermatogonias de alpaca, de tal manera que una vez optimizadas las condiciones, se pueda producir suficiente cantidad de biomasa como para poder extraer DNA total o RNA total y así puedan identificarse, mediante técnicas moleculares, biomarcadores específicos de células madre espermatogoniales de los dos fenotipos de alpaca y posteriormente realizar el transplante de células madre espermatogoniales a partir de machos élite a los machos mejor adaptados en las diferentes comunidades alpaqueras altoandinas, de tal manera que produzcan espermatozoides con las nuevas características genéticas deseables. Todo esto, paralelamente a las otras biotecnologías reproductivas que se vienen aplicando en nuestro país, como la Inseminación Artificial y la Transferencia de Embriones (Garnieri, 2015; Giuliano y Miragaya, 2011; Huanca *et al.*, 2007; Miragaya *et al.*, 2006).

En consecuencia, la caracterización de células germinales de alpaca y la expresión de biomarcadores específicos en tejido gonadal, constituyen un primer paso fundamental en esta perspectiva.

II.- ANTECEDENTES

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

La alpaca representa un potencial de desarrollo para la puna, donde viven las comunidades humanas más aisladas y pobres del Perú. Estas comunidades son las que mayoritariamente poseen este recurso y son las dueñas de al menos el 95% de las pasturas de la puna. El manejo de la alpaca, junto al de la vicuña, es una de las pocas posibilidades de mejorar las condiciones de pobreza, junto con la minería, el turismo y la acuicultura (Brack, 2001).

Entre las bases para establecer un programa de mejoramiento genético de la alpaca, se ha propuesto el empleo de técnicas de reproducción asistida, tales como inseminación artificial, transferencia de embriones y fertilización *in vitro* (Miragaya *et al*., 2006; Huanca *et al*., 2007), las cuales al menos en nuestro país no siempre han sido aplicadas en forma programada y sostenida, sino que se han venido utilizando como esfuerzos individuales y aislados, al punto que incluso algunos investigadores consideran que no es posible desarrollar y aplicar estas tecnologías por los resultados poco alentadores. Sin embargo, el desarrollo de estas biotecnologías ha requerido la mejora del conocimiento sobre la fisiología reproductiva de esta especie, contando con la ayuda de técnicas como la ultrasonografía (Huanca *et al*., 2007) y más recientemente la citometría de flujo.

En este contexto, el conocimiento sobre la biología de las Células Madre Espermatogoniales (SSC) de alpaca y las posibles aplicaciones biotecnológicas como el transplante de SSC, debe formar parte del conjunto

de alternativas biotecnológicas que pueden servir como herramientas para la mejora genética de los camélidos domésticos (alpacas y llamas), con potencial aplicación en camélidos no domésticos (vicuña y guanaco) y fauna silvestre en amenaza o peligro de extinción.

Es más, Wheeler (2006), ha llegado a establecer que la alpaca es una especie en riesgo de extinción por la vía del cruzamiento indiscriminado, ya que la población de alpacas presenta altos niveles de hibridación con llamas; así, un 92% de la población de alpacas es híbrida o ha sido cruzada con llamas; lo que significa que menos del 9% de la población de alpacas es pura. Adicionalmente, Morton *et al.* (2008), señalan que en mamíferos domésticos existe una correlación entre el tamaño corporal y el tamaño testicular, pero que en alpacas hay una amplia variación en el tamaño testicular en cualquier edad o tamaño del cuerpo, lo que sugiere que otros factores, probablemente genéticos, son también importantes; y que además los testículos de los Camélidos Sudamericanos son relativamente pequeños y la producción de espermatozoides es baja.

2.2. Antecedentes de investigación

La identificación y el aislamiento de SSC ha sido muy dificultoso, debido a que existen pocas SSC dentro de lapoblación de espermatogonias que puedan ser definidas solamente por su función. Hasta la fecha, la vía más efectiva para enriquecer las poblaciones de células germinales con SSC ha sido purificar todas las formas de espermatogonias de tipo A. Así, en testículos de mamíferos adultos, donde están presentes múltiples generaciones de células germinales, la purificación de espermatogonias es más difícil que en individuos pre púberes (Izadiar *et al*., 2002a).

Los primeros aislamientos de espermatogonias de tipo A y B utilizando colagenasa y tripsina se hicieron en ratones (Bellvé *et al*., 1977). Luego se aislaron gonocitos por digestión de tejido testicular con colagenasa y tripsina en ratas (van Dissel *et al*., 1989). Posteriormente se aislaron espermatogonias de tipo A por digestión enzimática utilizando un gradiente discontinuo de

Percoll en ratas deficientes en vitamina A (van Pelt *et al*., 1996). De modo similar, se obtuvieron espermatogonias altamente purificadas a partir de testículos de ratas inmaduras (Morena *et al*., 1996) y de cerdos inmaduros (Dirami *et al*.,1999). Posteriormente esta metodología fue adoptada por diferentes grupos de investigación para estudiar la población de espermatogonias de tipo A en bovinos (Izadiar *et al*., 2002a; Izadiar *et al*., 2002b; Izadyar *et al*., 2003) y otros mamíferos.

A la fecha, no se han encontrado publicaciones sobre estudios de la biología de las SSC de alpaca. Lo único que se conoce son los avances presentados en el Instituto de Investigación Antonio Raimondi de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por el grupo de investigación del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal, que lidera la Mg. Martha Valdivia, sobre aislamiento, caracterización molecular y criopreservación de células espermatogoniales de alpaca (resultados en proceso de publicación).

Solamente se han encontrado algunas publicaciones en temas relacionados a la fisiología y patología reproductiva de la alpaca macho (Sumar, 1983; Bravo, 1995; Sumar, 2000; Bravo, 1995); revisiones sobre la aplicación de biotecnologías reproductivas en Camélidos Sudamericanos, incidiendo en inseminación artificial, transferencia de embriones y bipartición de embriones (Miragaya *et al*., 2006; Huanca *et al*., 2007; Morton *et al*., 2008; Giuliano y Miragaya, 2011; Ruíz, 2011; Cortez, 2011). Otros estudios con enfoque molecular, están referidos al color y grosor de la fibra (Zhu *et al*., 2010; Bathrachalam *et al*., 2011; Fan *et al*., 2011; Tian *et al*., 2012) o expresión de péptidos antimicrobianos en mucosa intestinal de crías de alpaca (More *et al*., 2011).

Las únicas publicaciones que metodológicamente tienen alguna semejanza con el presente trabajo de investigación, están referidas a la localización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR) durante el desarrollo testicular postnatal en alpaca (He *et al*., 2009) o el estudio de la expresión de algunos marcadores específicos de SSC en *Antilope cervicapra* "antílope" (Goel *et al*., 2011) y *Macaca mulatta* "macaco" (Helman *et al*., 2009).

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo e intenso por el cual se producen continuamente numerosos gametos masculinos a través de la vida después de la pubertad (Ebata *et al.*, 2008). De acuerdo a Russell *et al.* (1990) y Al-Asmar *et al.* (2009), la espermatogénesis puede ser dividida en tres fases (Figura 1). La primera es la fase diploide que ocurre en el epitelio seminífero de la membrana basal y se caracteriza por la proliferación de células germinales diploides, las espermatogonias. Las espermatogonias proliferan y expanden la población de células germinales diploides, pero simultáneamente ocurre la diferenciación hasta espermatozoides. En la segunda fase, fase meiótica, las espermatogonias diferenciadas abandonan la membrana basal y se convierten en espermatocitos y continúan la meiosis. La recombinación genética tiene lugar en esta fase. Las células haploides resultantes se denominan espermátides. En la tercera fase, espermiogénesis, las espermátides sufren una compleja diferenciación morfológica para formar espermatozoides. Estos procesos están regulados y soportados por una interacción íntima con células somáticas (células de Sertoli) en el epitelio seminífero y por comunicación endocrina (Hall, 2011).

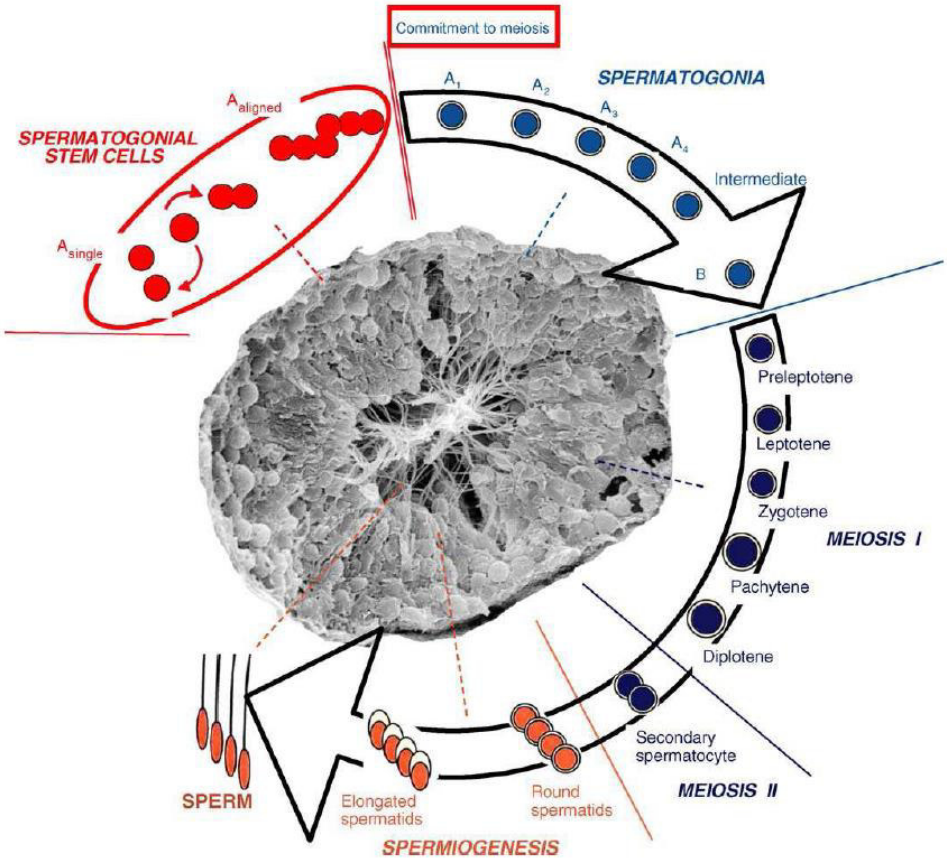


Figura 1. Fases de la espermatogénesis en ratón. Primera fase en rojo: proliferación de espermatogonias; segunda fase en azul: meiosis; y tercera fase en rojo: espermiogénesis (Al-Asmar*et al*., 2009).

La continuación del proceso espermatogénico a través de la vida depende de la regulación de la autorrenovación y diferenciación de las células madre espermatogoniales. Estas son células simples ubicadas en la membrana basal del epitelio seminífero. Solamente el 0.03% de todas las células germinales son células madre espermatogoniales (Aponte *et al*., 2005).

Se ha observado que la espermatogénesis en primates y no primates tiene algunas particularidades (Figura 2). Según Hermann *et al.* (2007), en primates, los estudios histológicos clásicos de la morfología nuclear indican la presencia de dos clases de espermatogonias de tipo A no diferenciadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos testiculares, designadas como

espermatogonias de tipo $A_{oscuras}$, del inglés A_{dark}; y espermatogonias de tipo A_{claras}, del inglés A_{pale} (Clermont y Leblond,1959; Clermont, 1972). Ambos tipos de células están presentes en la membrana basal de los túbulos seminíferos de los primates, pero difieren en base a la arquitectura nuclear y a la intensidad de coloración con hematoxilina. Hay una información limitada acerca de la disposición clonal de espermatogonias de tipo $A_{oscuras}$ y de tipo A_{claras} o cuál de estos fenotipos histológicos se correlacionan con las características moleculares de las espermatogonias de los roedores (Hermann *et al.*, 2009). El modelo que prevalece sobre la proliferación y diferenciación de espermatogonias es que las espermatogonias de tipo $A_{oscuras}$ son células madre de reserva y las espermatogonias de tipo A_{claras} son células madre activas. De acuerdo a este modelo, las espermatogonias de tipo $A_{oscuras}$ raramente se dividen y son activadas por amenazas citotóxicas; mientras que las espermatogonias de tipo A_{claras} se dividen regularmente para autorrenovarse y así mantener el grupo de células germinales no diferenciadas, que soportan la espermatogénesis bajo circunstancias normales (Clermont y Antar, 1973; Simorangkir, 2005). Sin embargo, estas designaciones de células madre en primates están sujetas a debate y son claramente diferentes a las de los roedores, donde el linaje espermatogénico se deriva de una espermatogonia de tipo $A_{individual}$, del inglés $A_{singles}$ (Huckins, 1971; Oakberg, 1971). Sin embargo, no existen estudios específicos para el caso de las alpacas, por lo que se asumen las características consideradas para no primates.

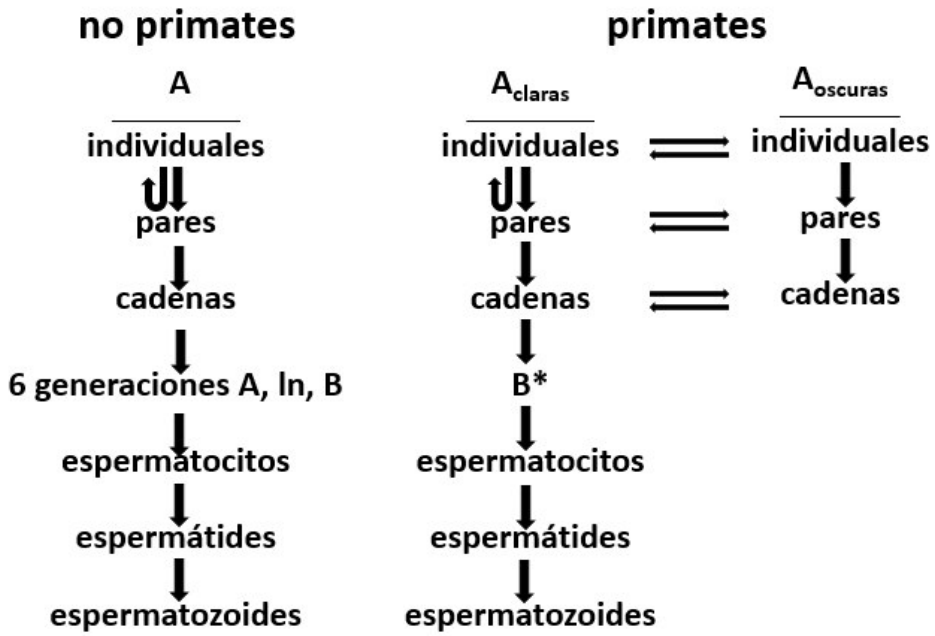


Figura 2. Espermatogénesis en no primates y primates. En animales no primates (como roedores y alpacas), el linaje espermatogénico se deriva de espermatogonias de tipo $A_{individuales}$, del inglés *$A_{singles}$*; mientras que en los primates, las espermatogonias de tipo $A_{oscuras}$, del inglés *A_{dark}*, son células madre de reserva y las espermatogonias de tipo A_{claras}, del inglés *A_{pale}*, son células madre activas que soportan la espermatogénesis (Aponte *et al*., 2005).

De acuerdo a Yoshida *et al.* (2004), en el ratón, las células espermatogénicas más primitivas son las espermatogonias de tipo $A_{simples}$, del inglés *$A_{singles}$* o simplemente espermatogonias de tipo A_s. Las progenies de A_s permanecen conectadas por puentes intercelulares después de varias divisiones mitóticas y meióticas, formando cadenas de dos, cuatro, ocho y más células.Las espermatogonias de tipo A_s y los clones conectados de 2 (*A_{pr}* o $A_{apareadas}$), 4, 8, 16 y raramente 32 células (*A_{al}* o $A_{alineadas}$) muestran distintos caracteres incluyendo a las espermatogonias en diferenciación (A_1 a A_4, intermedias y espermatogonias B). Ellas tienen períodos de ciclo celular más largos y, básicamente, proliferación independientemente del ciclo seminífero. Desde el punto de vista de la expresión génica, estas células pueden ser identificadas como espermatogonias negativas para *Ckit*. Con base en sus propiedades

comunes, A_s, A_{pr} y A_{al} son denominadas colectivamente como "espermatogonias no diferenciadas" aunque este término es un tanto confuso porque comprende tanto células madre (las verdaderas espermatogonias "no diferenciadas") y otras células comprometidas con la diferenciación (Figura 3).

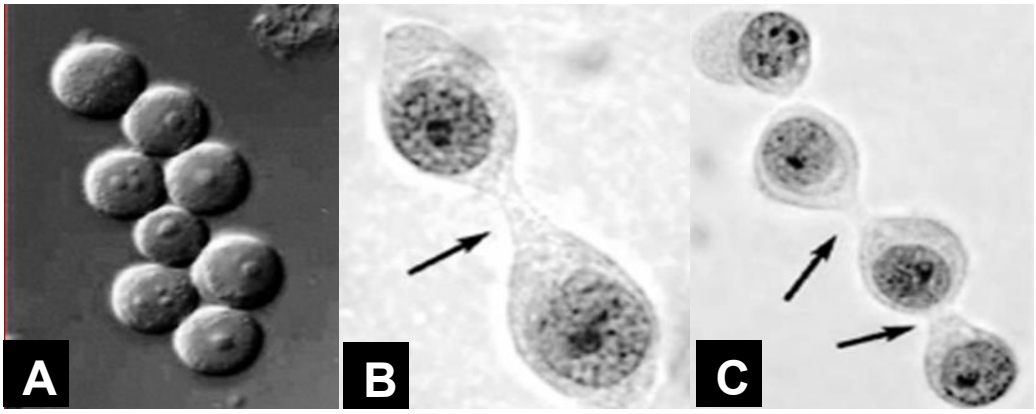


Figura 3. Identidad de las espermatogonias. (A) Espermatogonias de tipo $A_{simples}$; (B) Espermatogonias apareadas mostrando el puente intercelular; y (C) Espermatogonias alineadas (Izadyar *et al*., 2003).

2.3.2. Células madre espermatogoniales (SSC)

En mamíferos no primates, las SSC son células simples localizadas en la membrana basal de los túbulos seminíferos y se llaman espermatogonias de tipo A simples (A_s).Cada una de estas células se divide en dos nuevas células simples o en un par de espermatogonias que no completan la citocinesis y permanecen conectadas por un puente intercelular. Comenzando con las espermatogonias de tipo A_{pr}, la citocinesis en todas las divisiones posteriores es también incompleta, conduciendo a la formación de un sincitio cada vez más grande de células germinales. Como las espermatogonias de tipo A_{pr} son morfológicamente similares a las espermatogonias de tipo A_s, el puente intercelular puede tomarse como la primera señal visible del ingreso de las células en el camino de la diferenciación (Aponte *et al*., 2005).

Las espermatogonias A_{pr}se dividen luego para formar cadenas de 4, 8, ocasionalmente hasta 32 espermatogonias de tipo A_{al}. Las espermatogonias

de tipo A_{al} pueden ir a través de un paso de diferenciación y convertirse en espermatogonias de tipo A_1. Este paso de diferenciación involucra cambios morfológicos leves y trae cambios en las características del ciclo celular de las espermatogonias. En la mayoría de no primates se producen seis divisiones siguientes a la formación de espermatogonias de tipo A_1, formando sucesivamente espermatogonias de tipo A_2, A_3, A_4, In (intermedia) y B. Las espermatogonias de tipo B se dividen en espermatocitos. En total, se producen cerca de 10 divisiones espermatogoniales entre las SSC y la formación de espermatocitos (de Rooij y Russell, 2000).

2.3.3. Desarrollo testicular postnatal en la alpaca

En toda crianza animal, el macho cumple un rol preponderante tanto en el proceso reproductivo como en el mejoramiento genético, de su correcta selección y los cuidados que se le prodiguen depende el éxito de la explotación (Fernández, 1991). La selección de los machos en alpaca, ha estado dirigida sólo a aspectos de conformación y fibra de color blanco, dejando de lado las características reproductivas. Una consecuencia de esto es la alta incidencia de anormalidades de los genitales de los machos reproductores, la mayoría de naturaleza hereditaria (Gonzales, 2008). La biometría testicular referencial se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Relación del tamaño y peso testicular con la edad y el peso corporal en alpacas.

Edad (años)	Dimensiones testiculares (cm)	Peso testicular (g)	Peso corporal (Kg)
1	1.5 x 1.5	2.9	36.6
3	3.4 x 2.3	13.9	43.9
5	3.7 x 2.4	13.8	52.0

Datos tomados de Bravo (1995).

Los camélidos masculinos generalmente nacen con los testículos descendidos que son pequeños, blandos y difíciles de palpar. Aun no se ha descrito el mecanismo de descenso de los testículos. Se conocen los niveles basales de testosterona en el plasma seminal (60-90 pg/ml) y la existencia de adherencias entre el pene y el prepucio. Cuando los machos maduran, los testículos se agrandan y los niveles de testosterona en plasma aumentan a más de 1000 pg/ml (en aproximadamente 20 meses de edad en la mayoría de las alpacas). El aumento de las concentraciones de testosterona permite que el animal crezca y desarrolle las características sexuales secundarias y aparentemente desglose las adherencias peno-prepuciales (Morton *et al*., 2008).

En alpacas, no existe una correlación entre el tamaño corporal y el tamaño testicular, particularmente en machos adultos de diferentes edades. La amplia variación en el tamaño testicular en cualquier edad o tamaño del cuerpo sugiere que otros factores, probablemente genéticos, son también importantes. Se considera que las alpacas machos han alcanzado el desarrollo sexual a los 5 años de edad, con 63 kg de peso corporal (Sumar 1983). Una comparación de la correlación entre el peso corporal promedio y el peso testicular promedio, se muestra a continuación (Tabla2).

Tabla 2. Correlación entre el peso corporal y el peso testicular en diferentes mamíferos.

Especie	Correlación (%)	Referencia
Vicugna pacos "alpaca"	0.02-0.03	Sumar (1983)
Ovis orientalis "carnero"	1.40	Bravo (1995)
Bos taurus "toro"	0.18	Morton (2008)

La producción de esperma puede estar correlacionada con el tamaño testicular en los camélidos. En toros, a medida que los testículos aumentan de peso y tamaño aumenta la producción de espermatozoides y la fecundidad;

presumiblemente esto ocurre también en alpacas. El tamaño testicular es altamente heredable en toros y también está relacionado con la fertilidad de sus parientes femeninas. Los testículos de los Camélidos Sudamericanos son relativamente pequeños y la producción de esperma es baja; así, la producción diaria estimada de esperma en primavera es 8.1 x 10^6 espermas/ml y en verano 4.2 x 10^6 espermas/ml, comparado con *Ovis arientalis* "carnero", de 3.14 x 10^9 espermas/ml (Guillén, 2001) y con *Bos taurus* "toro", de 4.5 x 10^8 espermas/ml (Ruíz *et al*., 2010).

2.3.4. Problemas y limitaciones en la fisiología reproductiva de la alpaca macho

Las alpacas actualmente presentan dos problemas de gran envergadura, la altísima tasa de hibridación por la cual la pureza genética de esta especie está muy deteriorada; lo que trae como consecuencia graves problemas reproductivos que impiden que se reproduzcan con éxito, entre ellos, la muy baja capacidad reproductiva y muy baja reserva de espermatozoides extragonadales en el macho, entre otros. Estos problemas están en contra de la supervivencia de esta especie exponiéndola a un grave peligro de extinción, lo que repercutiría directamente en la sociedad y la economía de las comunidades andinas alpaqueras del Perú (Brack, 2004; Sumar, 2000).

2.3.4.1. Pubertad y edad al primer empadre. Los machos pueden producir semen fértil cuando tienen alrededor de un año. Algunos machos a la edad de un año y con peso promedio de 34 Kg ya muestran interés sexual por las hembras. Solo el 8% de los machos jóvenes se hallan libres de adherencias pene-prepuciales; a la edad de dos años el 70% de machos ya no tienen estas adherencias y a la edad de 3 años, el 100% están completamente libres de estas siendo sexualmente activos hasta los 11-12 años de edad aunque con una baja tasa de fecundidad (Sumar, 1983). De ahí que la práctica generalizada sea destinar los machos a la reproducción a partir de los tres años. Si se hace antes debe prestarse especial atención a que estén libres de adherencias (FAO, 1996).

2.3.4.2. Baja capacidad reproductiva. Estudios sobre el proceso espermatogénico realizado en cortes histológicos en machos prepuberales,

muestran que los primeros espermatozoides morfológicamente maduros se observan a los 18 meses de edad (Fernández, 1991). En alpacas macho con un peso corporal promedio de 63 Kg, el peso promedio de un testículo totalmente desarrollado es de 17 g, aproximadamente y la producción diaria de espermatozoides es muy baja (Sumar, 1983).

2.3.4.3. Fracasos reproductivos. Los casos más comunes relacionados con los fracasos reproductivos en la alpaca macho son básicamente tres: defectos congénitos y adquiridos, retraso en el descenso de los testículos y priapismo.

2.3.4.3.1. Defectos congénitos y adquiridos. En un estudio con 3,015 machos en apareamiento provenientes de granjas ubicadas en la parte alta de los Andes de Perú se descubrió que 18.1% padecían distintas anomalías del aparato genital (Sumar, 1983). La *hipoplasia testicular* fue la anormalidad más común (9.9%); la *hipoplasia bilateral* fue más frecuente (5.6%) que la *hipoplasia unilateral* izquierda (2.7%) o derecha (1.6%). Se observó *criptorquidia*, incluso casos de *testículos ectópicos*, en 8.2% de los animales examinados. El lado izquierdo fue más afectado que el derecho. En otra investigación de los órganos genitales de 792 alpacas macho sacrificadas por diversas razones, 30% de los órganos mostraron anormalidades. En este material, 10.8% mostró hipoplasia testicular, 4.9% tuvo criptorquidia o testículos ectópicos, y se observó que en el 14.5% se habían formado quistes en los túbulos mesonéfricos. Es probable que la mayor parte de las anormalidades observadas sean hereditarias. Las anormalidades de origen infeccioso, como epididimitis y orquitis, que son frecuentes en carneros y toros, están ausentes, sobre todo entre los machos (Sumar, 2000).

2.3.4.3.2. Retraso en el descenso de los testículos. En la alpaca, al momento del nacimiento o algunos días después, los testículos se encuentran en el escroto, muy pequeños y flácidos. Al año de edad, que suele ser cuando se seleccionan los futuros progenitores, ambos testículos deben localizarse en el escroto y medir 1.1 a 1.4 cm de largo (Sumar, 1983). No obstante, es muy frecuente que el descenso de ambos testículos se demore, y mucho más común que sólo uno haya entrado en el escroto, seguido poco después por el otro testículo (Sumar, 2000).

2.3.4.3.3. Priapismo. Una enfermedad que se observa a menudo en los hatos de sementales de alpaca es una clase de “priapismo”. Esta enfermedad se caracteriza porque el macho es incapaz de retraer el pene dentro del prepucio. El glande y cerca de un tercio del pene están expuestos al ambiente, que trae como consecuencia lesiones y contaminación con material extraño, úlceras, heridas e infecciones graves (Sumar, 2000).

2.3.5. Terminología de campo referida a la edad de las alpacas

En las estancias alpaqueras, los técnicos encargados del monitoreo de hatos, utilizan un conjunto de términos referidos a las distintas edades de las alpacas (Huanca, 1996; Arias, 2006):

Crías.- Lactantes hasta los 8 meses de edad o quizá más propiamente hasta cuando las crías estén junto con la madre.

Extremas.- Crías recién destetadas; y es por eso que a esta operación ganadera del destete se le denomina “extremaje”. Una vez destetados, continúan llevando la denominación de extremas hasta el año de edad.

Tuis hembras.- Crías hembras, desde el destete hasta la recepción del primer servicio.

Tuis machos.- Crías machos, desde el destete hasta el primer servicio en que se encontró el empadre, generalmente a los dos años.

Hembras primerizas.- Tuis hembras vírgenes que entran al empadre.

Madres (reproductores hembras).- Hembras de dos años a más que han parido.

Hembras vacías.- Hembras que han sido servidas y no quedaron preñadas o han perdido a sus crías por diferentes causas.

Hembras matacrías.- Hembras que han perdido sus crías por diferentes motivos.

Hembras preñadas.- Animales que se encuentran gestando en cualquiera de sus etapas.

Padres (reproductores machos).- Machos seleccionados para la reproducción y que a partir de los dos a tres años entran al servicio.

Capones.- Machos tuis o adultos castrados, que no son aptos para la reproducción y mejoramiento genético, pero se conservan como productores de fibra y carne.

2.3.6. Estimación de la edad de la alpaca por erupción dentaria

No es fácil determinar la edad de las alpacas en condiciones de campo, a menos que se tenga al día el registro individual desde el nacimiento, lo cual no es habitual entre los campesinos alpaqueros; sin embargo, esta se puede estimar en base a la evolución de la erupción dentaria hasta que alcanzan los 5 años de edad, siendo mucho más difícil establecerla a partir de los 15 años. Las alpacas tienen 32 dientes permanentes. Los primeros molares aparecen entre los 6 y 9 meses y otro lo hace a los 2 años. El primer incisivo permanente sale a los dos años, el siguiente a los 3 y el último par entre los 3 y los 6 años (FAO, 1995). Así, se tiene establecido en las normas para el juzgamiento de alpacas que, según su dentición, estos animales pueden ser clasificados en cuatro categorías que se indican en la Tabla 3:

Tabla3. Categorías de dentición en alpacas y estimación de la edad.

Categoría de dentición	Edad estimada
A. Dientes de leche (DL)	< 1 año
B. Dos dientes (2D)	1-2 años
C. Cuatro dientes (4D)	2-3- años
D. Boca llena (BLL)	>3 años

Datos tomados de Franco *et al.* (2009).

Estas categorías son iguales para llamas y alpacas en todas sus variedades (separadas por colores y sexo). Si bien la categorización por cambio dentario

no es exacta, aún no existe un medio concreto de fácil acceso para calcular la edad de los animales (aunque existen alternativas como los microchips, que no son muy extendidos). En el proceso de cambio de dentadura, existe una regular variación dentro de los rebaños de diferentes lugares y dentro de los animales de un mismo rebaño. En observaciones realizadas en centros experimentales se pudo comprobar que los Camélidos Sudamericanos comienzan a cambiar los incisivos centrales alrededor de los dos años de edad y el cambio de los extremos se completa generalmente a los cuatro años y medio (Franco *et al*., 2009). Sin embargo, existen muchos animales que a los tres años han cambiado ya dos, cuatro o seis dientes. De igual manera hay una desigual aparición de incisivos y caninos. En la práctica, esto significa que en las categorías B y C pueden estar compitiendo animales de diferentes edades, creando desventajas en la competición. Según Franco *et al.* (2009), una correcta implantación dentaría es muy importante porque los Camélidos Sudamericanos dependen de su alimentación de pastos fibrosos y duros de la puna, que están secos durante gran parte del año. Una mala dentición (prognatismo, dientes mal implantados) tiene directa repercusión sobre la salud y producción del animal (Figura 4).

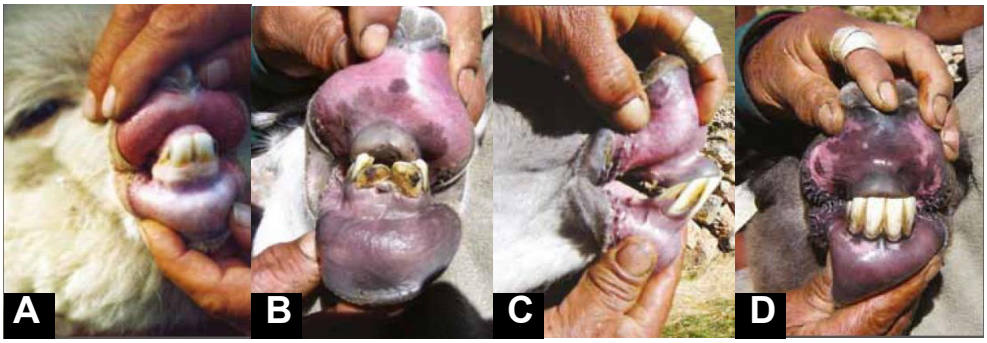


Figura 4. Estimación de la edad de las alpacas por la evolución de la erupción dentaria. (A) Dientes de leche (DL); (B) Dos dientes (2D); (C) Cuatro dientes (4D); y (D) Boca llena (BLL). Datos tomados de Franco *et al.* (2009).

2.3.7. Biomarcadores para SSC de mamíferos

La técnica de transplante de SSC o ensayo funcional, representa un verdadero avance en este campo, ya que con esta técnica una población de

células germinales puede ser verificada para detectar la presencia de SSC, permitiendo, por ejemplo, el desarrollo de protocolos de purificación. En este procedimiento, las células germinales del ratón donante son trasplantadas en los testículos de un ratón receptor, en el que la espermatogénesis endógena ha sido agotada, ya sea por mutación, por tratamiento con el agente alquilante busulfán o por irradiación X fraccionada. Después del transplante, las SSC donantes repueblan y colonizan el epitelio seminífero de los ratones receptores. Desde el establecimiento de esta técnica, han sido identificados varios biomarcadores y características nuevas de las SSC que se pueden usar para aislar a partir de testículos una población enriquecida con SSC (Aponte *et al*., 2005).

Los biomarcadores para SSC pueden ser categorizados en tres tipos diferentes: marcadores morfológicos, de superficie celular e intracelulares (Ebata *et al*., 2008).

2.3.7.1. Biomarcadores morfológicos

Se refieren a la propia identidad microscópica de las SSC. Después de una división, una SSC puede producir ya sean dos SSC, o una SSC y una espermatogonia única y aislada. En este último caso, una espermatogonia aislada genera una cadena de dos células en la siguiente división, por lo tanto, pierde su actividad de auto-renovación, lo que significa que esta célula está determinada retrospectivamente para ser progenitora comprometida, pero no una célula madre, a pesar de su identidad como espermatogonia aislada. La formación de una cadena de dos células se cree que es el primer paso hacia la diferenciación terminal de la espermatogénesis, las espermatogonias solas o aisladas son a menudo llamadas células troncales, debido a su potencial de autorrenovación, que produce dos células individuales o potencial diferencial, que produce una cadena de dos células (Figura 5).

Se han reportado criterios citológicos que se utilizan para la identificación de espermatogonias de tipo A, en ratas, por Microscopía Nomarski de Interferencia (van Pelt *et al*., 1996; van Dissel *et al*., 1989), como los

siguientes: (a) Células grandes, redondas, con un núcleo esférico; (b) Membrana nuclear fuerte; (c) Varios nucléolos relativamente grandes (1-3); (d) Proporción alta núcleo:citoplasma; y (e) Muchas inclusiones citoplasmáticas concentradas principalmente en un lado de la célula.

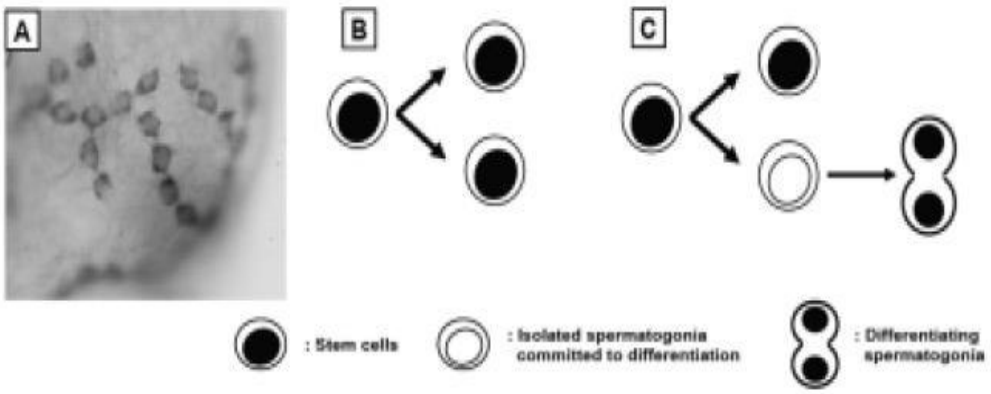


Figura 5. Autorrenovación y diferenciación de las espermatogonias. (A) Cadenas de espermatogonias de tipo A; (B) División mitótica simétrica de una SSC;(C) División mitótica asimétrica de una SSC (Ebata *et al.*, 2008).

Yoshida (2010), es uno de los defensores del llamado "Modelo A_s", que sostiene que solamente cada espermatogonia individual A_s actúa como una célula madre, mientras que las espermatogonias A_{pr} y estadios subsecuentes no actúan como células madre, ya que están comprometidos con la diferenciación (Figura 6). Siguiendo este patrón, es probable que lo mismo ocurra en alpacas.

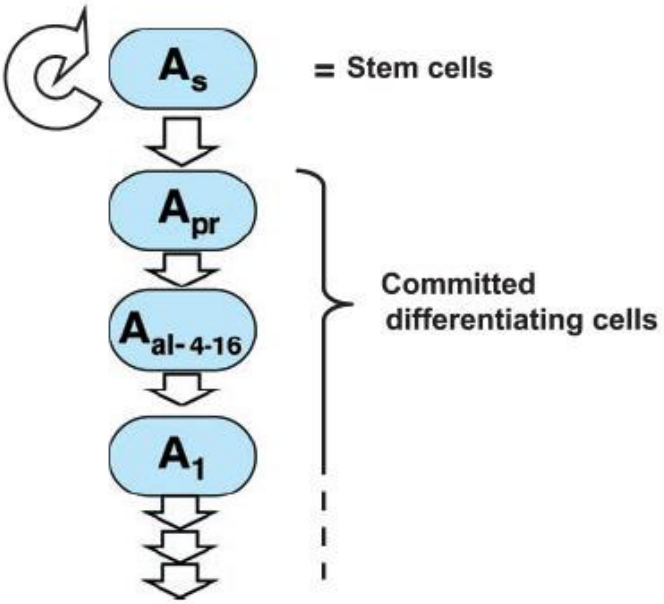


Figura 6. El modelo A_s. Solamente las espermatogonias de tipo A_s actúan como células madre (Yoshida, 2010).

Respecto a la localización de las SSC, se sugiere la existencia de un nicho presuntivo para la población $A_s/A_{pr}/A_{al}$, la misma que se ubica en la membrana basal de los tubos seminíferos, preferentemente en la región de la membrana basal enfrentada al intersticio (Figura 7), donde hay vasos sanguíneos circundantes y células intersticiales que se sugiere ejercen una regulación especial sobre la actividad de la población $A_s/A_{pr}/A_{al}$ (Al-Asmar *et al.*, 2009; Yoshida, 2010).

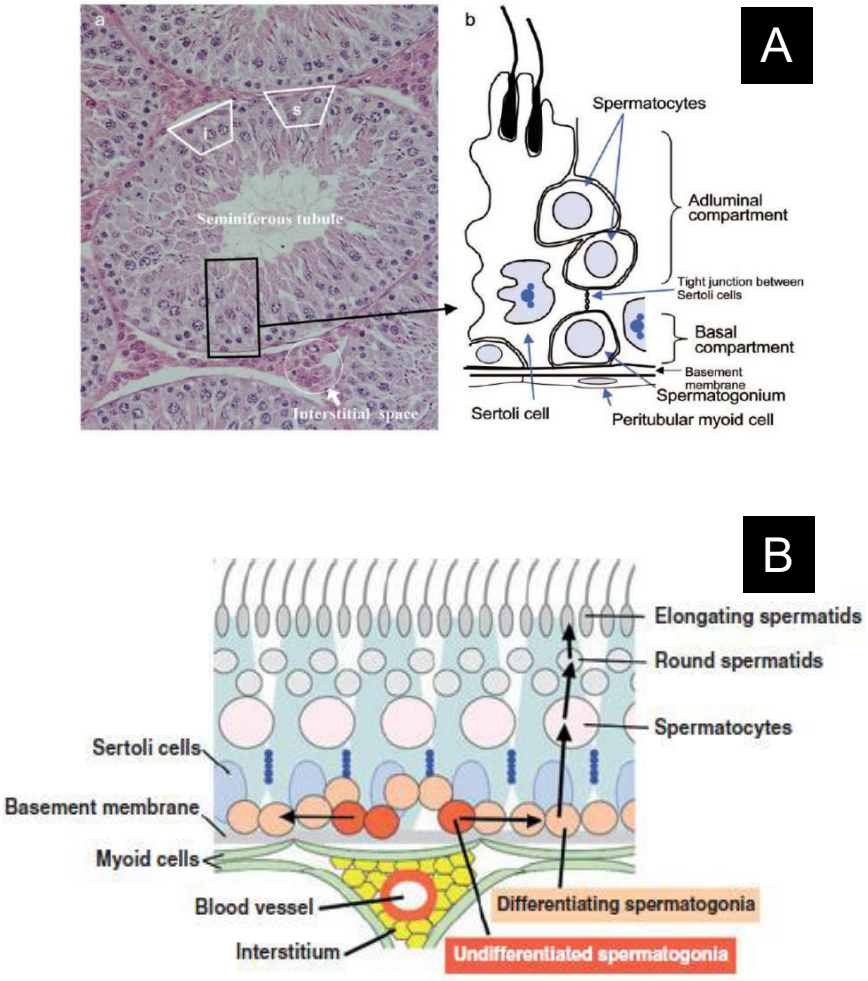


Figura 7. Ubicación de las espermatogonias no diferenciadas en los testículos. (A) Corte transversal de los túbulos seminíferos de rata mostrando los compartimentos basal y adluminal del epitelio seminífero. (B) Modelo presuntivo del nicho microambiental de la población "no diferenciada" A_s⁄A_{pr}⁄A_{al} (Al-Asmar *et al.*, 2009; Yoshida, 2010).

2.3.7.2. Biomarcadores de superficie celular

A diferencia de los biomarcadores morfológicos, se han determinado moléculas de superficie celular como biomarcadores de SSC por estar su expresión directamente asociada con la actividad de las SSC. Utilizando métodos inmunológicos, tales como inmunocitoquímica e inmunohistoquímica, las integrinas α–6 y β-1 fueron los primeros biomarcadores identificados en la superficie celular, que juntos forman un receptor de laminina, un componente principal de la matriz extracelular en la membrana basal del epitelio seminífero. Mediante enfoques inmunológicos

similares en combinación con el trasplante de espermatogonias, se identificaron CD90 (*Thy1*), CD9 y CD24 como moléculas expresadas en las SSC y más recientemente se han reportado muchos estudios de la expresión de genes entre ellos *Gfrα-1*, *Ckit* y *Ecad* (Schrans y van de Kant, 1999; Oatley *et al*., 2004a; Oatley *et al.,* 2004b; Oatley *et al*., 2006; Buageaw *et al*., 2005; Kanatzu *et al*., 2008).

2.3.7.2. Biomarcadores intracelulares

Estudios recientes en ratones indican que las SSC también expresan moléculas intracelulares, entre ellas factores de transcripción, tales como *Oct4, Zbtb16, Ngn3*y la proteína citoplasmática *Stra8*. Al igual que los otros marcadores descritos anteriormente, estas moléculas no son exclusivamente expresadas en las SSC, pues se expresan también en las espermatogonias primitivas diferenciadas. Para su detección y/o cuantificación no se utilizan los métodos inmunológicos, sino, métodos moleculares, tales como PCR convencional, niveles de expresión transcripcional por PCR en tiempo real y otros. Sin embargo, estas moléculas marcadoras bien pueden estar implicadas en el mecanismo de regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia de las SSC. Por lo tanto, la identificación de estas moléculas ofrece la oportunidad de explorar más la caracterización funcional de las SSC. Otros biomarcadores intracelulares, son *Nanos 2, Lin28, Sohlh1* y *Sohlh2* (Buaas *et al*., 2004; Costoya *et al*., 2004; Yoshida *et al*., 2004; Barrios *et al*., 2009; Sada *et al*., 2009; Yoshida, 2010; Shen y Xie, 2011; Suzuki *et al*., 2012; Suzuki y Saga, 2013; Shyh y Daley, 2013).

2.3.8. Biomarcadores seleccionados para SSC de alpaca

Para el estudio de la expresión de biomarcadores de SSC en tejido gonadal de alpaca, previo a la síntesis de cebadores, se hizo una búsqueda de los diferentes biomarcadores específicos detectados principalmente por técnicas moleculares y/o inmunológicas, reportados para mamíferos, principalmente ratón (Suzuki *et al*., 2012; Shen y Xie, 2011; Yoshida *et al*., 2010; Barrios *et al*., 2009; Sada *et al*., 2009; Tulkunova *et al.,* 2009; Zheng *et al*., 2009; Kanatzu *et al*., 2008; Tokuda *et al*., 2007; Ballow *et al*., 2006; Buageaw *et al*., 2005; Wang *et al*., 2005; Buaas *et al*., 2004; Costoya *et al*., 2004; Yoshida *et al*.,

2004; Giuili *et al*., 2002; Schrans *et al*., 1999; Oulad *et al*., 1996), toro (Oatley *et al*., 2004a; Oatley *et al*., 2004b; Izadyar *et al*., 2002a), rata (Zhang *et al*., 2011), macaco (Hermann *et al*., 2009; Hermann *et al*., 2007) y antílope (Goel *et al*., 2011). Solamente se encontró un reporte sobre el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), detectado por coloración inmunohistoquímica en alpaca (He *et al*., 2009), pero no se encontró información referente a biomarcadores específicos de SSC en alpaca.

Teniendo en cuenta que los mamíferos comparten un patrón en su maquinaria molecular, considerando las similitudes genómicas y sobre la base de la información encontrada en la literatura respecto a la expresión de biomarcadores de SSC para *Bos taurus* ("toro"), *Mus musculus* ("ratón") y *Macacus rhesus* ("macaco"), se decidió trabajar con siete biomarcadores positivos, relacionados con la autorrenovación de SSC (*GFRα-1, Nanos2, Ngn3, Zbtb16, Stra8, E-Cadherin y Lin28*)**,** tres biomarcadores negativos, relacionados con la diferenciación de SSC (*C-kit, Sohlh1 y Sohlh2*) y tres genes de referencia conocidos: *Rplp0*(Proteína Ribosomal Grande P0), *Gadph* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y *Actb* (Actina Beta), conforme se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Biomarcadores seleccionados para SSC de alpaca.

Biomarcador	Especie de mamífero	Referencia
GFRα-1	*Bos taurus*	Buageaw *et al*. (2005); Naughton *et al*. (2006); Jijiwa *et al*. (2008); Oatley *et al*. (2004)
Nanos2	*Mus musculus*	Aoki *et al*. (2009); Barrios *et al*. (2009); Sada *et al*. (2009); Shen y Xie (2009)
Ngn3	*Mus musculus*	(Yoshida *et al*., 2004)
Zbtb16	*Macaca mulatta*	Giuili *et al*. (2002); Oulad *et al*. (1996)
Stra8	*Mus musculus*	Buaas *et al*. (2004); Kanatzu *et al*. (2008)
E-Cadherin	*Mus musculus*	Costoya *et al*. (2004); Toyoda *et al*. (2009)
Lin28	*Mus musculus*	Zheng *et al*. (2009)
C-kit	*Mus musculus*	de Rooij (1998); Schrans *et al*. (1999); Pellegrini *et al*. (2003)
Sohlh1	*Mus musculus*	Ballow *et al*. (2006a); Suzuki *et al*. (2012)
Sohlh2	*Mus musculus*	Ballow *et al*. (2006b); Suzuki *et al*. (2012)

2.3.9. Heterogeneidad de la expresión relativa de biomarcadores para SSC en mamíferos

Uno de los primeros trabajos sobre expresión de biomarcadores de SSC es el de Costoya *et al*. (2004), quienes señalan que hay poco conocimiento de los mecanismos moleculares por los cuales las espermatogonias, células germinales mitóticas de los testículos, se autorrenuevan y diferencian en espermatozoides. Ellos han demostrado que el gen *Zfp145*, que codifica para el represor transcripcional *Plzf* o *Zbtb16*, tiene un rol crucial en la espermatogénesis. En la Figura 8, se representa la línea del tiempo del

desarrollo y producción de espermatozoides maduros en testículos de ratón. La barra roja en el panel más bajo muestra los niveles de expresión de *Zfp145* durante este proceso de desarrollo, que dura 35 días en el ratón. La barra vertical naranja representa el estadio de las espermatogonias colectadas para el microarray y el punto en que el testículo *Zfp145*$^{-/-}$ muestra alteraciones en la proliferación y apoptosis antes de la degeneración de los túbulos seminíferos.

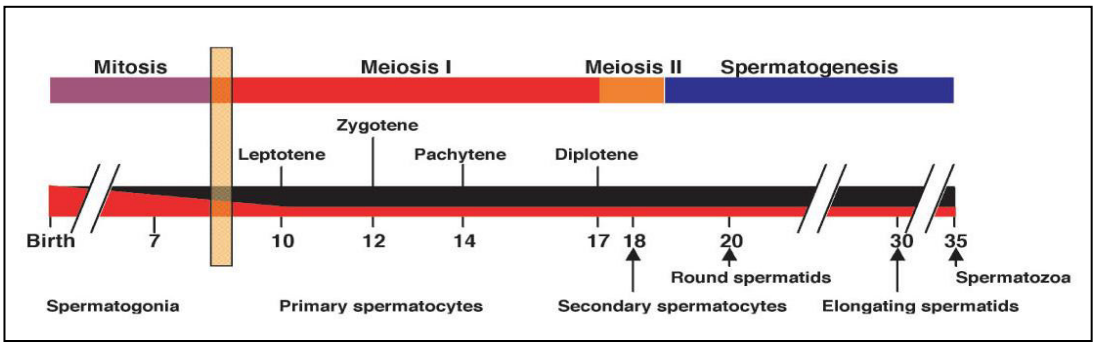


Figura 8. Rol de *Plzf* o *Zbtb16* en la espermatogénesis y en la regulación de la autorrenovación y mantenimiento de la población de células madre en testículos de *Mus musculus* (Costoya *et al*., 2004).

Hermann *et al*. (2009), compararon los patrones de expresión génica en *Mus musculus* y *Macaca mulatta*, llegando a la conclusión que a partir de un análisis global de todo lo reportado sobre la heterogeneidad de los perfiles de expresión génica, en roedores es posible asignar fenotipos moleculares a tres grupos de poblaciones de espermatogonias: (a) Espermatogonias troncales A_s y algunas A_{pr} (*GFRa1*$^{+}$, *Zbtb16*$^{+}$, *Ngn3*$^{+/-}$ *y C-kit*); (b) Espermatogonias progenitoras, es decir, aquellas comprometidas con la diferenciación, como A_{pr} y A_{al} (*GFRa1*$^{+}$, *Zbtb16*$^{+}$, *Ngn3*$^{+}$, *C-kit*$^{+/-}$); y (c) Espermatogonias en diferenciación, tales como A_1-A_4, intermedias y B (*GFRa1*$^{-}$, *Zbtb16*$^{-}$, *Nngn3*$^{+}$*y C-kit*$^{+}$). En la Figura 9, las barras coloreadas (*GFRa1*, azul; *Plzf o Zbtb16*, verde; *Ngn3*, negro; *C-kit*, rojo) indican la extensión de la expresión del biomarcador en los linajes espermatogénicos adultos y las letras corresponden a las referencias. Los descriptores funcionales *Stem*, *Progenitor* y *Differentiating*, basados en la información sobre roedores, están indicados

en la barra gris media y pueden identificar espermatogonias de macaco con sus correspondientes fenotipos y funciones. Las transiciones de *Stem* a *Progenitor* o *Progenitor* a *Differentiating* están señaladas con un gradiente de sombreado entre estas categorías funcionales.

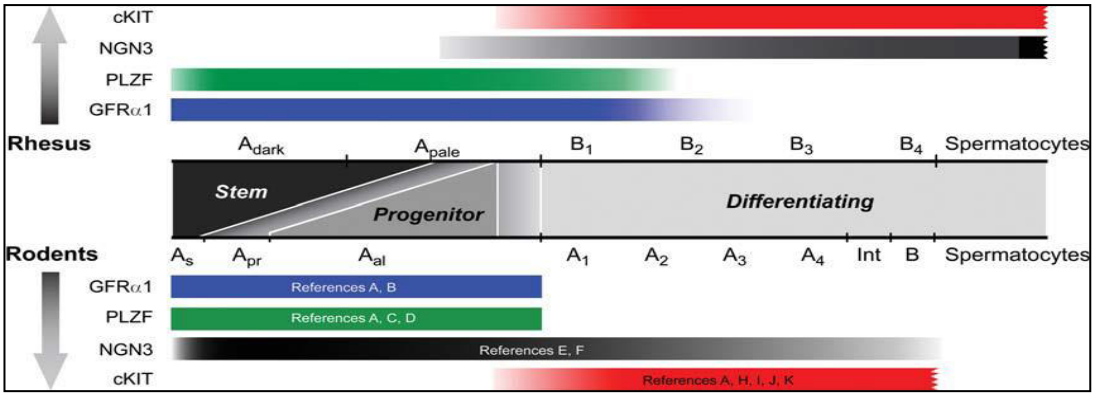


Figura 9. Resumen de la expresión de biomarcadores en linajes espermatogénicos de *Macaca mulatta* y *Mus musculus* adultos (Hermann *et al*., 2009).

Recientemente, Yoshida (2010), ha identificado un número de genes que se expresan en la población $A_s/A_{pr}/A_{al}$ de espermatogonias de testículos de ratón. Esto ha llevado a la conclusión de que, a diferencia del corolario de aceptación general sobre el Modelo A_s, los estadios de la misma longitud son heterogéneos con respecto a su expresión génica. Es importante destacar el hecho de que como las espermatogonias son heterogéneas esto puede sugerir que es necesario volver a examinar el modelo A_s. Será un desafío intrigante identificar el actual subconjunto de células madre y revelar su comportamiento. Existe una heterogeneidad de la población $A_s/A_{pr}/A_{al}$ revelada por el perfil de expresión génica. En una visión clásica, se ha creído que la duración del estadio (es decir, de las entidades morfológicas $A_s/A_{pr}/A_{al\text{-}4\ al\ 16}$) era la única diferencia entre estas células.

Recientes análisis de expresión génica, sin embargo, revelan que los estadios con el mismo número de células son heterogéneos con respecto a su expresión génica. Así, en la población $A_s/A_{pr}/A_{al}$ de "espermatogonias no diferenciadas" combinaciones posibles de la expresión génica que típicamente pueden representar la heterogeneidad celular son recogidos de

varios estudios y se muestran en fucsia y verde (Figura 10). Los genes que se muestran de negro se expresan, mientras que los de color gris son reprimidos. Se debe tener en cuenta que las relaciones entre estos genes no se han determinado con precisión y podría haber una combinación variable de genes expresados; este es el porqué de que los límites entre ambas poblaciones se muestren por gradientes (Yoshida, 2010).

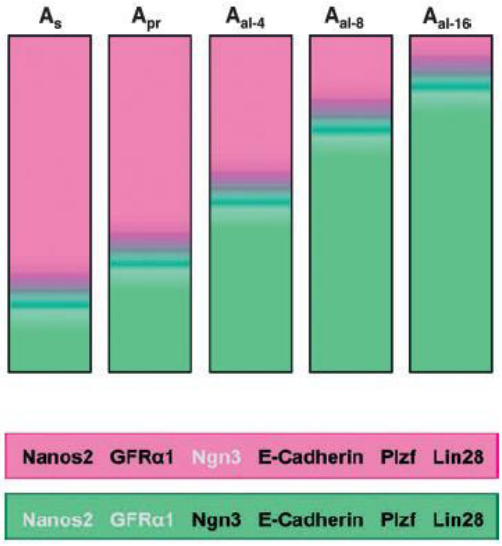


Figura 10. Heterogeneidad de la población $A_s/A_{pr}/A_{al}$ revelada por el perfil de expresión génica en ratón (Yoshida, 2010).

Tokas *et al*. (2011), señalan que la regulación del número de células germinales es complicada en las poblaciones de espermatogonias para asegurar la adecuada proporción de células germinales y células de Sertoli. Las SSC pueden ser reconocidas y estudiadas a nivel celular con respecto a proliferación, diferenciación y regulación de estas actividades. Sin embargo, la complejidad del epitelio seminífero hace difícil el estudio de los aspectos moleculares de la regulación del comportamiento de las SSC. La presencia de una variedad de tipos de células complica la purificación de SSC. De otro lado, en muchas especies hay una variación en el modo en que las vías que regulan la pluripotencia requieren el factor de crecimiento, que es indispensable para el cultivo de SSC murinas y bovinas.

III.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

a) Las características morfológicas de las células germinales de alpaca, aisladas por digestión enzimática, pueden identificarse por microscopía óptica y citometría de flujo.

b) La expresión de biomarcadores específicos para células madre espermatogoniales, se puede detectar a nivel transcripcional, en tejido gonadal de alpaca.

c) La biometría testicular, la expresión de biomarcadores, la viabilidad así como el rendimiento de espermatogonias aisladas, están influenciados por el estadio de desarrollo testicular posnatal.

3.2. Objetivos

Objetivo general

Caracterización morfológica y molecular de la población de células germinales testiculares de *Vicugna pacos* (alpaca).

Objetivos específicos

a) Aislar células germinales testiculares de alpaca para la caracterización morfológica.
b) Caracterizar espermatogonias identificando biomarcadores específicos de tejido gonadal.
c) Determinar la expresión de mRNA a nivel transcripcional de biomarcadores relacionados con la autorrenovación y diferenciación de espermatogonias durante el desarrollo postnatal.
d) Correlacionar la edad con la biometría testicular, viabilidad y rendimiento de las espermatogonias aisladas.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Flujograma experimental

Para acceder a las muestras de testículos de *Vicugna pacos* en los grupos etarios de 6-8 meses de edad, de 10-12 meses de edad y de 2-3 años, se realizaron salidas de campo a las diferentes estancias alpaqueras del norte de Ayacucho y de Huancavelica. Las muestras de testículos de machos con edad mayor a los tres años, se recolectaron en el Camal Municipal de Huancavelica. Se hizo la biometría de todas las muestras de testículos de alpaca, separándose luego en dos grupos. Las muestras destinadas para el aislamiento de espermatogonias, viabilidad, concentración y citometría de flujo, fueron transportadas en condiciones de refrigeración (4-5ºC), para ser procesadas inmediatamente en el laboratorio. En cambio, las muestras de testículos de alpaca destinadas a la detección de la expresión a nivel transcripcional de biomarcadores específicos para SSC en tejido gonadal, fueron transportadas en un tanque de nitrógeno líquido a -196ºC y almacenadas en un ultracongelador a -80ºC (Figura 11).

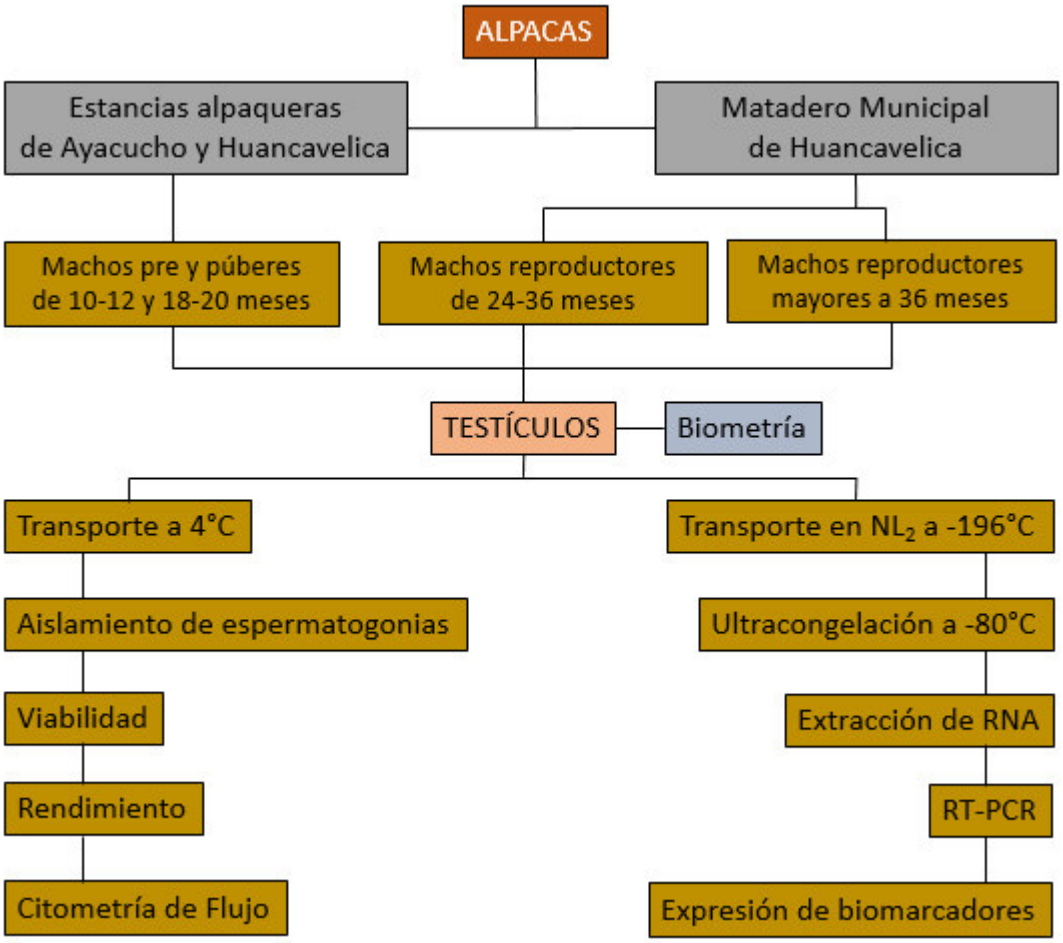


Figura 11. Flujograma experimental. Los testículos de alpacas pre púberes y púberes se obtuvieron por castración de animales vivos en las estancias alpaqueras. Los testículos de alpacas jóvenes y adultas se obtuvieron en el Matadero Municipal de Huancavelica.

4.2. Animales

Las alpacas macho pre púberes y púberes incluidas en el presente estudio procedieron de estancias alpaqueras de los departamentos de Ayacucho, distritos de Chuschi, Paras y Vinchos; y de Huancavelica, distrito de Pilpichaca (Anexo 1). Los machos jóvenes y adultos procedieron del Matadero Municipal de Huancavelica, ubicado en la localidad de Chuñuranra, a 3,680 msnm, a unos 15 minutos de la ciudad de Huancavelica (Anexo 2), considerándose únicamente alpacas del fenotipo Huacaya.Todas las alpacas estuvieron alimentadas bajo condiciones de campo o pastoreo natural durante la duración del período experimental (mayo a diciembre del 2015) y expuestas a

la luz natural durante el día, a una temperatura ambiental promedio de 6 a 8ºC, precipitación pluvial anual promedio entre 400 a 700 mm y a una altitud entre 4,000 a 4,600 msnm.

4.3. Colecta de testículos de alpaca

La colecta de testículos de alpaca tuvo algunas particularidades en función del destino del material biológico. Las muestras de testículos de alpaca con fines de aislamiento de espermatogonias por digestión enzimática fueron transportadas en condiciones de refrigeración a 4ºC; pero las muestras de testículos de alpacadestinadas para la caracterización molecular, fueron transportadas en nitrógeno líquido (NL_2) a -196ºC y conservadas en un ultracongelador a -80ºC.

4.3.1. Biometría testicular y aislamiento de espermatogonias de alpacas pre púberes y púberes

Se realizó en las estancias alpaqueras de los departamentos de Ayacucho y Huancavelica, accediendo a los animales antes del pastoreo y obteniéndose el material por castración. Los testículos fueron lavados con PBS y transportados en el medio DMEM a 4-5ºC dentro de un *cooler* o caja isotérmica. Las espermatogonias aisladas en estas condiciones se utilizaron para la determinación viabilidad, rendimiento y caracterización por citometría de flujo (Figura 12).



Figura 12. Colecta de testículos de alpacas pre púberes y púberes en la estancia alpaquera de Pampawasi, distrito de Chuschi, provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho.

4.3.2. Biometría testicular y aislamiento de espermatogonias de alpacas jóvenes y adultas

Se realizó en el Matadero Municipal de Huancavelica, accediendo directamente a los testículos de los animales sacrificados, tanto de 2-3 años de edad (4 dientes) y mayores a 3 años de edad (6 dientes). Los testículos fueron lavados en PBS y transportados en el medio DMEM a 4-5ºC dentro de un *cooler* o caja isotérmica. Las espermatogonias aisladas en estas condiciones se utilizaron para la determinación viabilidad, rendimiento y caracterización por citometría de flujo (Figura 13).



Figura 13. Colecta de testículos de alpacas jóvenes y adultas en el Matadero Municipal de Huancavelica.

4.3.3. Extracción de RNA de tejido gonadal de alpacas pre púberes y púberes

Se realizó en estancias alpaqueras de los departamentos de Ayacucho y Huancavelica, accediendo directamente a los animales antes del pastoreo, obteniéndose los testículos por castración, los cuales fueron inmediatamente lavados con PBS, descapsulados, troceados y colocados en tubos estériles de 50 ml, en el tiempo mínimo posible, para luego colocarlos en las canastillas del tanque de nitrógeno líquido de 3.5 litros, para su transporte y conservación a -196ºC. Luego este material fue mantenido en el ultra congelador a -80ºC para la extracción posterior de RNA (Figura 14).



Figura 14. Colecta de testículos de alpacas púberes en las estancias alpaqueras de Santa Fe y Licapa, distrito de Paras, provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho.

4.3.4. Extracción de RNA de tejido testicular de alpacas jóvenes y adultas

Se realizó en el Matadero Municipal de Huancavelica, por castración a partir de los animales vivos, inmediatamente después del puntillazo que el matador aplica en la médula espinal, a la altura de la nuca, quedando el animal inmovilizado. Los testículos fueron inmediatamente lavados con PBS, descapsulados, troceados y colocados en tubos estériles de 50 ml, en el tiempo mínimo posible, para luego colocarlos en las canastillas del tanque de nitrógeno líquido de 3.5 litros, para su transporte a -196ºC. Luego este material fue mantenido en el ultra congelador a -80ºC para la extracción posterior de RNA (Figura 15).



Figura 15. Colecta de testículos de alpacas jóvenes y adultas vivas. Matadero Municipal de Huancavelica.

4.4. Biométrica testicular

Se registró el peso testicular, la longitud testicular, el ancho testicular y la circunferencia testicular en los testículos previamente descapsulados, es decir, previa eliminación de la túnica vaginal común (Alves, 2007). El peso testicular se midió con la ayuda de una balanza portátil a pilas, con una precisión de dos decimales. Las dimensiones testiculares se tomaron con la ayuda de una regla de Vernier y la circunferencia testicular se midió con la ayuda de un hilo y una regla común (Figura 16).

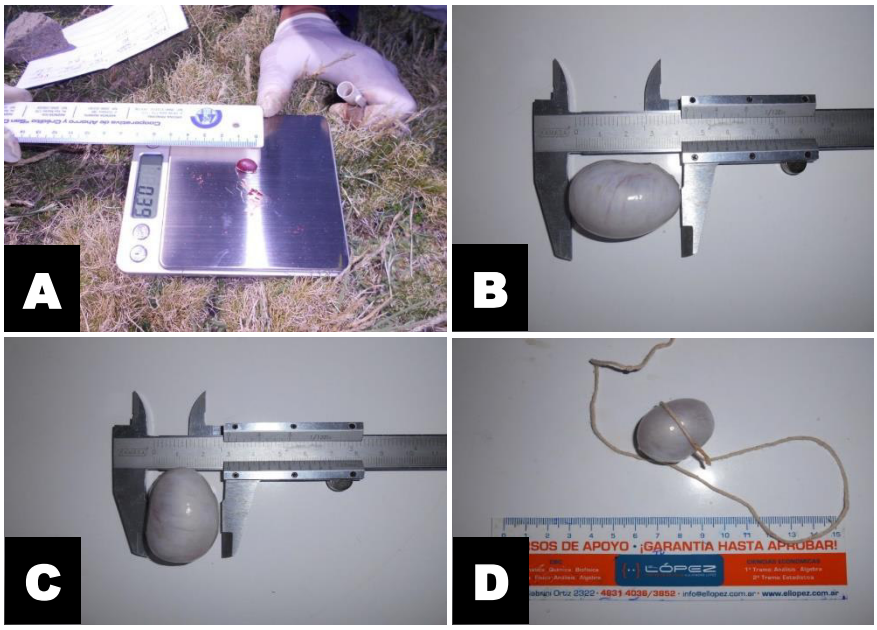


Figura 16. Medición de las dimensiones testiculares. (A) Peso, (B) Longitud, (C) Ancho y (D) Circunferencia testicular.

4.5. Aislamiento de espermatogonias

Se pesaron 20 g de tejido gonadal para iniciar cada aislamiento (equivalente a 1-2 testículos grandes o3-4 medianos o 7-8 pequeños). Los testículos fueron previamente descapsulados, cortados en pequeños pedazos y pasados por un colador fino de acero inoxidable, presionando con un pilón de porcelana. Se añadió permanentemente pequeños volúmenes del medio DMEM mantenido a 32°C y el filtrado denso fue recibido en un frasco colector estéril. El filtrado fue distribuido en tubos de centrífuga estériles de 10 mL con tapa de rosca, añadiéndose medio DMEM, mantenido a 32°C, a una proporción de

1:2 (filtrado/medio). Se centrifugó a 300 x *g* (1,500-2,000 rpm), por 5 min, tres veces. Para la primera digestión, se añadió al *pellet* medio DMEM, mantenido a 32ºC, conteniendo las cuatro enzimas (tripsina, hialuronidasa, colagenasa y DNasa I), a una proporción de 1:2 (*pellet*/medio).Se incubó a 32ºC por espacio de 60 min, en agitación moderada. Luego se centrifugó a 300 x *g*, por 3 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadió medio DMEM, mantenido a 32°C, a una proporción de 1:2 (pellet/medio), luego se lavó tres veces por centrifugación a 300 x *g* por 3 min y se eliminó el sobrenadante. Para la segunda digestión, se añadió al *pellet* medio DMEM, mantenido a 32ºC, conteniendo solo tres enzimas, menos tripsina (hialuronidasa, colagenasa y DNasa I), a una proporción de 1:2 (*pellet*/medio).Se incubó a 32ºC por espacio de 45 min, en agitación moderada. Luego se centrifugó a 300 x *g*, por 3 min y se eliminó el sobrenadante. Se añadió medio DMEM, mantenido a 32°C, a una proporción de 1:2 (*pellet*/medio), luego se lavó tres veces por centrifugación a 300 x *g* por 3 min y se eliminó el sobrenadante. Las espermatogonias obtenidas fueron resuspendidas en medio DMEM y tratadas inmediatamente, según el caso (Izadyar*et al*., 2002).

El diámetro promedio de las espermatogonias aisladas se calculó por calibración de un microscopio binocular, marca Opympus, modelo CX31, utilizando la Lámina Patrón y el Ocular Micrométrico, determinándose el factor de calibración para el objetivo de 40X.

4.6. Determinación de viabilidad y rendimiento

Las espermatogonias aisladas y suspendidas en medio DMEM fueron lavadas con PBS 0.2 M de pH 7.4 atemperado a 32°C, dos veces, por centrifugación a 300 x *g*, durante 3 min. A continuación, todas las células fueron concentradas en un solo tubo y re suspendidas en 1000 μL de PBS mantenido a 32°C. A partir de esta suspensión celular, se hizo una dilución 1:100, mezclando primero 100 μL con 900 μl de PBS a 32°C y luego 100 μL de la primera dilución con 900 μL de PBS a 32°C. Luego se mezclaron 30 μL de la suspensión celular diluida con 30 μL de la solución de azul de Tripán al 0.05% (diluido previamente con PBS, a partir del producto comercial al 0.4%).El

conteo de células espermatogoniales vivas y muertas se hizo colocando una gota de esta suspensión coloreada en la Cámara de Neubauer. La lectura se realizó en los 25 cuadrados centrales y el resultado del rendimiento se expresó en millones/mL, multiplicando el número total de células espermatogoniales contadas por 10^6 (Gonzales, 1992).

4.7. Análisis por citometría de flujo

Se realizó en el Laboratorio de Inmunología Celular y Molecular de la Empresa FARVET, S.A.C, Chincha Alta. La suspensión de espermatogonias en medio DMEM, fue centrifugada a 300 x *g* por 3 min. Luego fue lavada dos veces con PBS para CF (se prepara con agua destilada estéril y se filtra por 0.2 μm), por centrifugación a 300 x *g* por 3 min y llevada a una concentración inicial de 2 x 10^6 células/mL. A continuación, se fijaron añadiendo al *pellet* 500 μl de metanol al 80% helado a -20°C, que se dejó actuar a -20ºC, por espacio de 15 min, luego fue eliminado por lavados con PBS por centrifugación a 300 x *g* por 3 min, dos veces, para guardarse en refrigeración durante 1-2 semanas hasta su análisis FACS. Para teñir las células fijadas, el *pellet* fue resuspendido en 100 μL de la solución diluida 1/10 del producto comercial (que viene a 1000 μg/mL), utilizándose la aglutinina de *Dolichos biflorus* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (DBA/FITC), a una concentración de 100 μg/ml en PBS, la cual se incubó por espacio de 15 min a 37ºC.Luego las células teñidas con el conjugado se lavaron nuevamente con PBS, por centrifugación a 300 x *g* por 3 min, tres veces. Finalmente, el *pellet* se llevó a 500 μL con PBS y una concentración de 1 x 10^6 células/mL para las lecturas en el citómetro; pero antes, se observaron en el microscopio de fluorescencia para comprobar el marcado. La emisión de fluorescencia de las células teñidas se midió en un citómetro de flujo marca Beckman Coulter, modelo Gallios. Las fuentes de excitación consistieron en un láser de iones de argón operando a 488 nm. La fluorescencia del FITC se controló usando 530 nm de paso de banda del filtro y al menos se evaluaron 10,000 eventos para cada muestra.

4.8. Diseño de *primers*

Los *primers* para amplificar el cDNA de alpaca fueron diseñados con el Programa Oligo6, a partir de biomarcadores reportados para *Bos taurus*, considerando *Zbtb16, GFRα-1, Stra8, Nanos2, Ngn3, Lin28* y *Ecad* como biomarcadores positivos para SSC; *Ckit, Sohlh1* y *Sohlh2* como biomarcadores negativos para SSC y *Rplp0*, *Gadph* y *Actb* como genes de referencia o *housekeeping*.

Se siguió la siguiente estrategia: primero, se obtuvieron los RNA ensamblados únicamente con los exones codificantes de cada uno de los biomarcadores seleccionados, encontrados en el genoma de *Bos taurus*; segundo, con el Programa Oligo6, se diseñaron los cebadores de cada uno de los biomarcadores para *Bos taurus*; tercero, se realizó una comparación en la base de datos del NCBI (Blast) de cada uno de los exones aislados de los diferentes biomarcadores de *Bos taurus*, contra el genoma incompleto de *Vicugna pacos*, para ver si en algunos de los *contigs* de alpaca habían regiones homólogas para cada uno de los exones aislados de *Bos taurus*; cuarto, se creó un nuevo archivo con los exones "rescatados" de *Vicugna pacos*, para cada uno de los biomarcadores; quinto, se obtuvieron los RNA ensamblados de *Vicugna pacos*; y sexto, con el Programa Oligo6 (https://www.oligo.net/downloads.html), se diseñaron los cebadores para flanquear y amplificar los biomarcadores seleccionados para *Vicugna pacos.*

4.9. Extracción de RNA de tejido testicular

Los ensayos iniciales, así como los testigos posteriores, se hicieron a partir de muestras de tejido testicular de ratones albinos, de 3 meses de edad, inmediatamente después de su sacrificio por disloque cervical, adquiridos del Bioterio de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

4.9.1. Método del trizol

Se aisló RNA total con el reactivo trizol (Ambion, USA) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los demás reactivos utilizados fueron de la marca Sigma (USA). Los trozos de tejido testicular conservados en ultra congelación a -80°C, fueron pulverizados en un mortero conteniendo nitrógeno líquido, evitando siempre la descongelación. Se recogió el equivalente a 100-150 □L del polvo congelado directamente con el microtubo de centrífuga de 1.5 mL y se adicionaron inmediatamente 900 □L de trizol, se homogenizó suavemente, se dejó reaccionar por 5 min y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4ºC. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo de centrífuga de 1.5 mL y se agregaron 200 □L de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 seg y se dejó reaccionar por 3 min, se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa superior a un nuevo microtubo de centrífuga de 1.5 mL. Se adicionaron 500 μL de isopropanol helado a -20ºC y se dejó actuar por 20 min a -20°C. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C, observándose la formación del *pellet* de RNA, de color blanquecino, en la base del tubo. Se descartó el isopropanol por inversión y se lavó el *pellet* adicionando primero 1000 □L de etanol al 80% helado a -20ºC, mezclando suavemente, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C, se eliminó el etanol por inversión y luego se adicionó 1000 μL de etanol al 70% helado a -20ºC, mezclando suavemente, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C y se eliminó completamente el etanol primero por inversión y luego con una micropipeta. Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 50 μL de agua libre de RNasas y se guardó a -80°C.

4.9.2. Método del fenol/cloroformo

Se aisló RNA total con los reactivos fenol saturado y ácido fenol/cloroformo (Ambion, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los otros reactivos utilizados fueron de la marca Sigma (USA). Los trozos de tejido testicular conservados en ultra congelación a -80°C, fueron pulverizados en un mortero conteniendo nitrógeno líquido, evitando siempre la descongelación. Se recogió el equivalente a 100-150 μL del polvo congelado directamente con el microtubo de centrífuga de 1.5 mL y se adicionaron

inmediatamente 500 μL de fenol saturado y 500 μL de tris-HCl 0.1M, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un microtubo de centrífuga nuevo de 1.5 mL, se añadieron 750 μL de ácido fenol/cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min a 4°C.Nuevamente se transfirió el sobrenadante a otro microtubo de centrífuga de 1.5 ml, se añadieron 750 μL de ácido fenol/cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min a 4°C. Luego se transfirió el sobrenadante a otro microtubo de centrífuga de 1.5 mL y se añadieron 700 μL de isopropanol helado a -20ºC y 70 μL de acetato de sodio 3M y se dejó actuar a -20ºC por 20 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4ºC y se observó la formación del *pellet* de RNA, de color blanquecino, en la base del tubo. Se descartó el isopropanol por inversión y se lavó el *pellet* adicionando primero 1000 μL de etanol al 80% helado a -20ºC, mezclando suavemente, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C, se eliminó el etanol por inversión y luego se adicionó 1000 μL de etanol al 70% helado a -20ºC, mezclando suavemente, se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a 4°C y se eliminó completamente el etanol primero por inversión y luego con una micropipeta. Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 50 μL de agua libre de RNasas y se guardó a -80°C.

4.10. Cuantificación de RNA

Las lecturas de concentración (en ng/μL) y pureza (relación 260/280 y 260/230) del RNA extraído de tejido testicular de alpaca, se realizaron en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA), con2 μL de muestra (RNA disuelto en agua libre de RNasas), acoplado al programa NanoDrop 1000 Versión 3.7.1.El equipo realiza lecturas de absorbancia en el rango de 200 a 350 nm, que es relevante en la determinación de concentración y pureza de ácidos nucleicos. La proporción 260/280 sirve para evaluar la contaminación con DNA genómico y la proporción 260/230 indica la contaminación con proteínas y/o fenol. En general, valores de 260/280 mayores a 2.0, indican alta pureza del RNA; el valor de 1.8, indica pureza aceptable; y valores menores de 1.8, indican contaminación con DNA, por tanto es inaceptable. Para la relación 260/230, valores mayores a 2.0, indican

alta pureza del RNA; el valor de 2.0, indica niveles mínimos aceptables de contaminación; y valores menores a 1.7, indican contaminación con proteínas y/o fenol, por tanto, es inaceptable.

4.11. Electroforesis de RNA

La integridad del RNA aislado, se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (EtBr), siguiendo las pautas de Masek *et al.* (2004). Se pesaron 1.5 g de agarosa, se mezclaron con 100 ml de amortiguador de corrida TAE 1X y se calentó en el horno microondas durante 90 seg hasta que la agarosa se disolvió completamente, se dejó enfriar un poco y se añadió5 μL de la solución acuosa de bromuro de etidio al 1%. Se vertió la solución en el molde para el gel, se colocó el peine adecuado y se esperó de 30 a 40 min para la gelificación completa. Luego se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis y se adicionó el amortiguador de corrida TAE 1X hasta cubrir 5 mm por encima del gel. A continuación, se prepararon las muestras con 10μL de RNA, más 2μL de loading dye 6X, total 12μL de mezcla, de los cuales se cargaron 7 μL. El marcador de tamaño molecular se preparó con 1μl de *loading dye 6X*, más 1μL de marcador y 4μL de agua tratada con DEPC, total 6μL de mezcla. Se cargaron las muestras en los pocillos del gel, se conectó la fuente de poder y se corrió a 90 V por 50-60 min, hasta que el frente del primer colorante quedó a unos 2 cm del borde del gel hacia el polo positivo. Los geles se visualizaron en el transiluminador UV (302 nm) y fueron foto documentados.

4.12. Tratamiento con DNasa I

El RNA total aislado, fue tratado con DNasa I (Thermo Scientific, USA, Cat. #EN0521), para eliminar el DNA genómico que pudiera estar presente, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se descongelaron previamente los componentes del kit, menos la enzima, se mezcló en el *spineer* y se mantuvo en hielo. En un tubo estéril de PCR (200 μL), libre de nucleasas y mantenido en hielo, se preparó la mezcla de reacción según la Tabla 5.

Tabla 5. Preparación de la mezcla de reacción para el tratamiento con DNasa I.

Componente	Cantidad
Agua libre de nucleasas	35 μL
Buffer de reacción 10X	5 μL
RNA	5 μL
Enzima DNasa I	5 μL
TOTAL	50 μL

Thermo Scientific, USA, Cat. #EN0521.

Se homogenizó primero con la micropipeta, luego en el *spineer* y se colocó en el termociclador a 37°C por 30 min, se detuvo la reacción con 10 μL de EDTA 50 mM y se completó incubando en el termociclador a 65°C por 10 min. Se guardó a -20°C y la calidad e integridad del RNA total se verificó por electroforesis en agarosa al 1.5%.

4.13. Tratamiento por RT-PCR

A partir del RNA aislado, libre de DNA contaminante, se procedió a la síntesis de cDNA y amplificación de los biomarcadores con los cebadores previamente diseñados y sintetizados (Macrogen, Corea del Sur).

4.13.1. Síntesis de cDNA

Para la retrotranscripción de RNA se utilizó el kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific, USA, Cat. #K1631, #K1632), según las recomendaciones del fabricante. Primero se prepararon las mezclas de reacción para las muestras y controles negativos y luego la mezcla de reacción para el control positivo (GADPH), según la Tabla 6.

Se descongelaron previamente los componentes del kit, menos la enzima, se mezcló en el *spineer* y se mantuvo en hielo.Las muestras se prepararon en tubos de PCR (200 μL), estériles, libres de nucleasas y mantenidos en hielo. El control negativo de transcriptasa reversa (RT-), incluyó todos los reactivos

del kit, excepto la enzima retrotranscriptasa, en su lugar se adicionó 1μL de agua libre de nucleasas. El control negativo de RNA templado (NTC), incluyó todos los reactivos del kit, excepto el RNA templado, en su lugar se adicionaron 5 μL de agua libre de nucleasas.

Tabla 6. Preparación de las mezclas de reacción para la muestra y controles negativos en la síntesis de cDNA.

Componente	**Muestra**	**RT-**	**NTC**
RNA tratado con DNasa I	5 μL	5 μL	----
Oligo $(dT)_{18}$ primer	1 μL	1 μL	1 μL
Agua libre de nucleasas	6 μL	6 μL	11 μL
TOTAL	12 μL		
Incubación a 65ºC x 5 min			
Buffer de reacción 5X	4 μL	4 μL	4 μL
Inhibidor de RNasas RiboLock	1 μL	1 μL	1 μL
Mezcla de dNTPs 10 mM	2 μL	2 μL	2 μL
Transcriptasa reversa	1 μl	----	1 μL
Agua libre de nucleasas	----	1 μL	----
TOTAL	20 μL		

Thermo Scientific, USA, Cat. #K1631, #K1632.

El control positivo (GADPH), se preparó en un tubo de PCR (200 μL), estéril, libre de nucleasas y mantenido en hielo, según la Tabla 7.

Tabla 7. Preparación de las mezclas de reacción para el control positivo en la síntesis de cDNA.

Componente	Cantidad
RNA control de GAPDH	2 μL (0.1 ng – 5 μg)
Oligo $(dT)_{18}$ primer	1 μL
Buffer de reacción 5X	4 μL
Inhibidor de RNasas RiboLock	1 μL
Mezcla de dNTPs 10 mM	2 μL
Transcriptasa reversa	1 μL
Agua libre de nucleasas	9 μL
TOTAL	20 μL

Thermo Scientific, USA, Cat. #K1631, #K1632.

Los tubos se colocaron en el termociclador, donde se incubaron a 42ºC por 60 min y la reacción fue detenida por calentamiento a 70ºC por 5 min. Se guardó a -20ºC por menos de una semana o a -80ºC por más tiempo.

4.13.2. Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR convencional se realizaron utilizando el Kit *PCR Master Mix 2X* (Thermo Scientific, USA, Cat. #K0172), según las recomendaciones del fabricante. Primero se diluyeron los cDNAs de las muestras 1/10, 1/100 y 1/1000; luego se diluyó el cDNA del control positivo 1/1000 y finalmente se prepararon las mezclas de reacción para la muestra y para los controles, según las Tablas 8 y 9.

Se descongelaron previamente los componentes del kit (el PCR Master Mix ya contiene la taq polimerasa), se mezcló en el *spineer* y se mantuvo en hielo. Las muestras se prepararon en tubos de PCR (200 μL), estériles, libres de nucleasas y mantenidos en hielo, según la Tabla 8.

Tabla 8. Mezcla de reacción para las muestras para PCR convencional.

Componente	Cantidad
PCR Master Mix	5 μL
Forwardprimer 10 μM	1 μL
Reverse primer 10 μM	1 μL
cDNA*	2 μL
Agua libre de nucleasas	1 μL
TOTAL	10 μL

(*) Se probó con el cDNA sintetizado tal cual y con las diluciones 1/10, 1/100y 1/1000. Thermo Scientific, USA, Cat. #K0172

Los controles se prepararon en tubos de PCR (200 μL), estériles, libres de nucleasas y mantenidos en hielo, segúnla Tabla 9.

Tabla 9. Mezclas de reacción para los controles en la PCR convencional.

Componente	RT-	NTC	RT+	cDNA-	Primer-
PCR Master Mix (2x)	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
Agua libre de nucleasas	3 μL	1 μL	1 μL	3 μL	3 μL
Forwardprimer 10 μM	----	1 μL	----	1 μL	----
Reverse primer 10 μM	----	1 μL	----	1 μL	----
GADPH Forward	----	----	1 μL	----	----
GADPH Reverse	----	----	1 μl	----	----
cDNA 1/10	----	----	----	----	2 μL
cDNA RT-	2 μL	----	----	----	----
cDNA NTC	----	2 μL	----	----	----
cDNA RT+ 1/1000	----	----	2 μL	----	----
TOTAL	10 μL				

Thermo Scientific, USA, Cat. #K0172

Se homogenizó primero con la micropipeta, luego en el *spineer* y se colocó en el termociclador, asegurando bien las tapas de los tubos. Inicialmente, se probaron las siguientes condiciones: desnaturalización inicial, 95ºC x 2 min; desnaturalización, 95ºC x 30 seg x 38 ciclos; alineamiento, 55ºC x 30 seg x 38 ciclos; extensión, 72ºC x 60 seg x 38 ciclos; y extensión final, 72ºC x 10 min.

Para cada pareja de cebadores, correspondiente a cada uno de los 10 biomarcadores seleccionados, se corrió la PCR con el cDNA sintetizado tal cual y con las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000, considerando al mismo tiempo el gradiente de temperaturas para cada pareja de cebadores. En el caso de los genes de referencia, se procedió del mismo modo. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.8% y fotodocumentados.

4.14. Electroforesis de productos de PCR

La presencia de productos de amplificación, se visualizó por electroforesis en geles de agarosa al 1.8 % teñidos con bromuro de etidio (EtBr). Se pesaron 0.72 g de agarosa y se mezclaron en 40 ml de buffer TAE 1X, recientemente preparado. Se calentó la solución en el horno microondas durante 75 seg hasta que la agarosa se disolvió completamente, se dejó enfriar un poco y se añadieron 2.5 μL de la solución acuosa de EtBr al 1% (proporción 5 μl/100 ml). Se vertió la solución en el soporte del gel colocando el peine adecuado y se esperó de 30 a 40 min para la gelificación completa. El gel se colocó en la cámara de electroforesis, se vertió el buffer de corrida TAE 1X, hasta cubrir 5 mm por encima del gel. Para cargar las muestras, a los 10 μL de la reacción de PCR se añadieron 2μL de *loading dye* 6X, haciendo 12μL, de los cuales se cargaron 7 μL. Para el marcador de tamaño molecular, si se utilizaba el marcador *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega), se cargaron directamente 6 μL; pero si se utilizaba el marcador *genruler 1 Kb* (Fermentas), se mezclaron 1μL de *loading dye 6X*, 1μL de marcador 1 Kb y 4μL de agua tratada con DEPC, cargándose los 6μL.Se prendió la fuente de poder y se corrió a 85V por 45-50 min, controlando que el frente del primer colorante esté como

máximo a unos 2 cm del borde del gel hacia el polo positivo. Las bandas se visualizaron en el transiluminador de luz UV (302 nm) y se fotodocumentaron.

V.- RESULTADOS

5.1. Aislamiento y caracterización de células germinales testiculares de *Vicugna pacos* "alpaca"

El aislamiento de espermatogonias de alpaca se hizo varias veces, tanto en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal (UNMSM), como en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas (UNH-Huancavelica) y en el Laboratorio de Biotecnología (UNSCH-Ayacucho), no habiéndose encontrado diferencias morfológicas marcadas entre los grupos etarios estudiados. Una fotografía representativa, se muestra en la Figura 17. El factor de calibración para el objetivo de 40X fue de 2.6846 □ para cada línea de la escala del ocular micrométrico, siendo que las espermatogonias de alpaca aisladas tenían un promedio de 6 líneas de la escala, lo que equivale a un diámetro promedio de 16 μ.

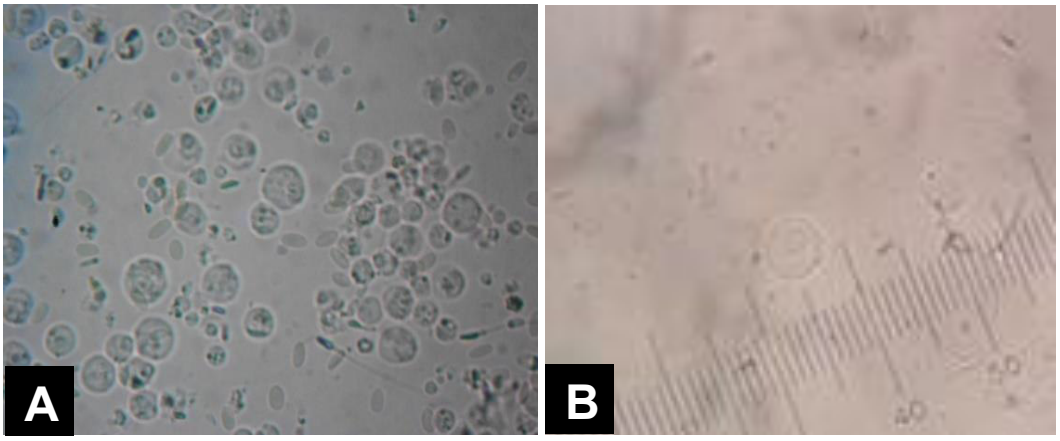


Figura 17. Espermatogonias de alpaca aisladas por digestión enzimática. Observación a 400X, microscopio binocular, marca LW Scientific, Modelo I4 Infinity. (A) Espermatogonias viables; (B) Escala del ocular micrométrico.

La viabilidad de las células espermatogoniales de alpaca aisladas fue elevada, oscilando entre 80 y 92% (Figura 18). El ANOVA por el método de Kruskal-Wallis, que es un análisis no paramétrico, pero equivalente al ANOVA que sí es paramétrico, rechaza la Hipótesis Nula, por tanto, al menos una mediana de los tratamientos fue diferente (Anexo 5). Así, la Prueba de Bonferroni, permitió establecer dos grupos: uno, correspondiente a los grupos etarios de 6-8 meses y de 10-12 meses, que no difieren significativamente; y otro, correspondiente a los grupos etarios de 24-36 meses y 36 a más, que tampoco difieren significativamente, pero tienen menos viabilidad.

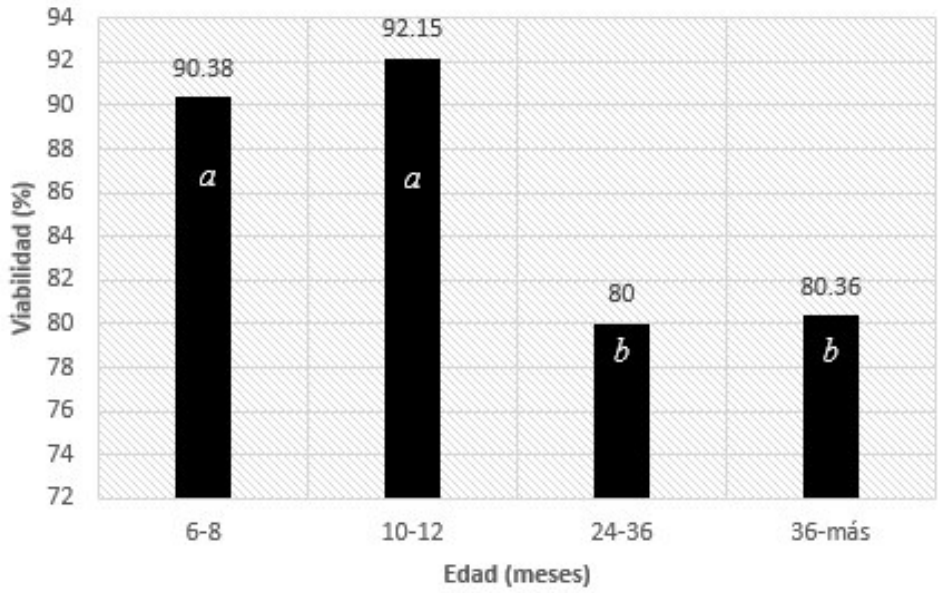


Figura 18. Viabilidad de espermatogonias de alpaca aisladas por digestión enzimática respecto a la edad. Análisis de Kruskal-Wallis, H=13.70, GL=3, P=0.003; comparación de medianas, Prueba de Bonferroni. Las letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos etarios.

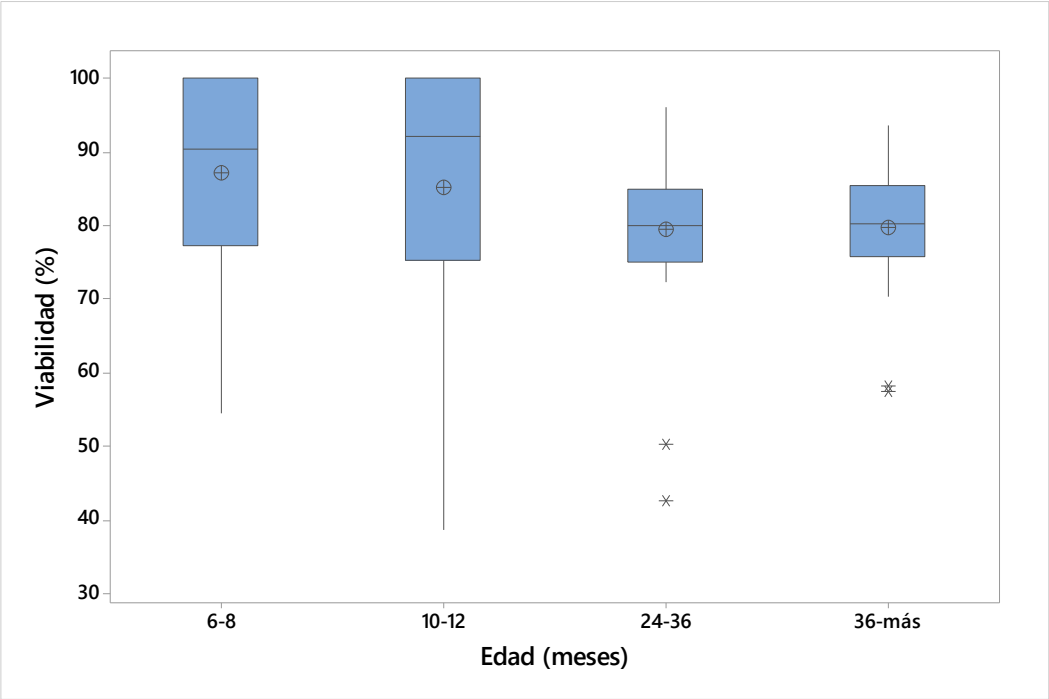


Figura 19. Variación de la viabilidad durante el aislamiento de espermatogonias de alpaca en relación a la edad.

El rendimiento de espermatogonias aisladas por digestión enzimática tuvo un rango de 30.5 x 10^6 a 52 x 10^6 espermatogonias/ml (Figura 20), observándose el valor máximo en el grupo etario de 10-12 meses. La Prueba de Bonferroni (Anexo 6), permitió encontrar una diferencia significativa a un nivel de confianza del 90% ($\alpha = 0.1$) entre los grupos etarios de 10-12 meses y de 24-36 meses, mas no entre los demás grupos etarios. Adicionalmente, aparentemente esta diferencia significativa debería observarse entre los grupos etarios de 6-8 meses y 10-12 meses (Figura 21).

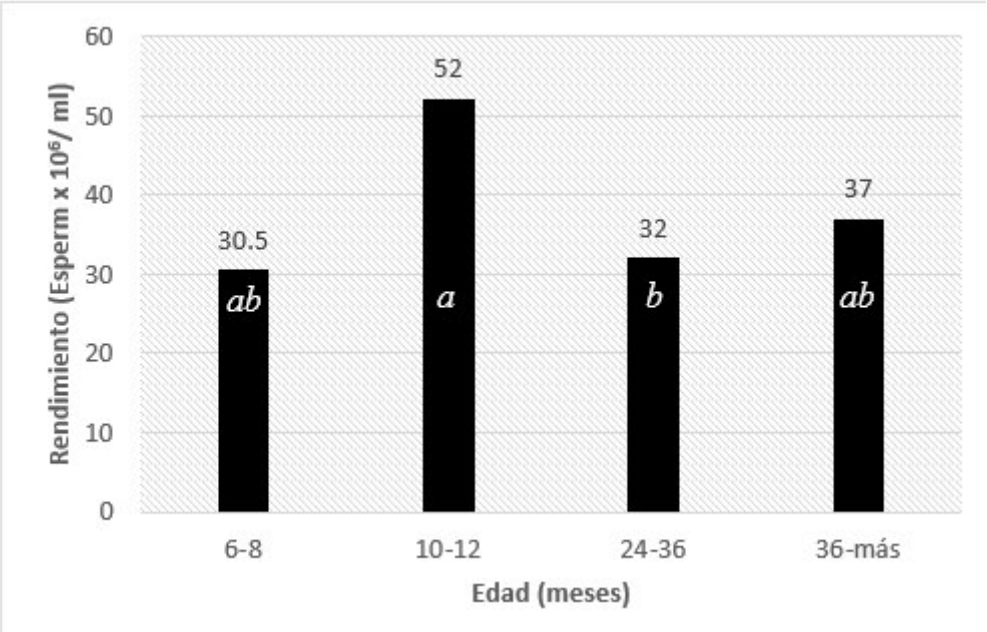


Figura 20. Rendimiento del aislamiento de espermatogonias de alpaca por digestión enzimática respecto a la edad. Análisis de Kruskal-Wallis, H=8.09, GL=3, P=0.044; comparación de medianas, Prueba de Bonferroni, α=0.10.

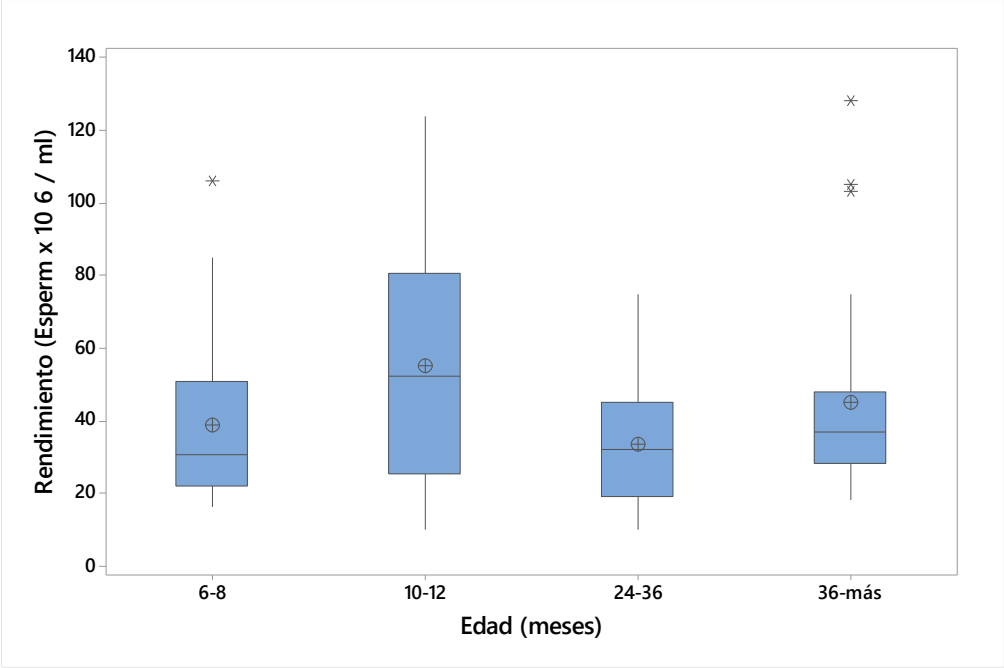


Figura 21. Variación del rendimiento obtenido durante el aislamiento de espermatogonias en relación a la edad de la alpaca.

El análisis por citometría de flujo de las células germinales testiculares de alpaca, aisladas por digestión enzimática, permitió identificar los tipos de poblaciones existentes en los diferentes grupos etarios (Figura 22). Lo primero que merece resaltar es que las células germinales de alpaca mostraron reactividad frente al producto comercial consistente en el conjugado de isotiocianato de fluoresceína con la aglutinina de *Dolichos biflorus* (FICT-DBA), que es el mismo que Izadyar *et al.* (2002a) utilizaron para realizar la citometría de flujo en espermatogonias de terneros de 5-7 meses de edad.

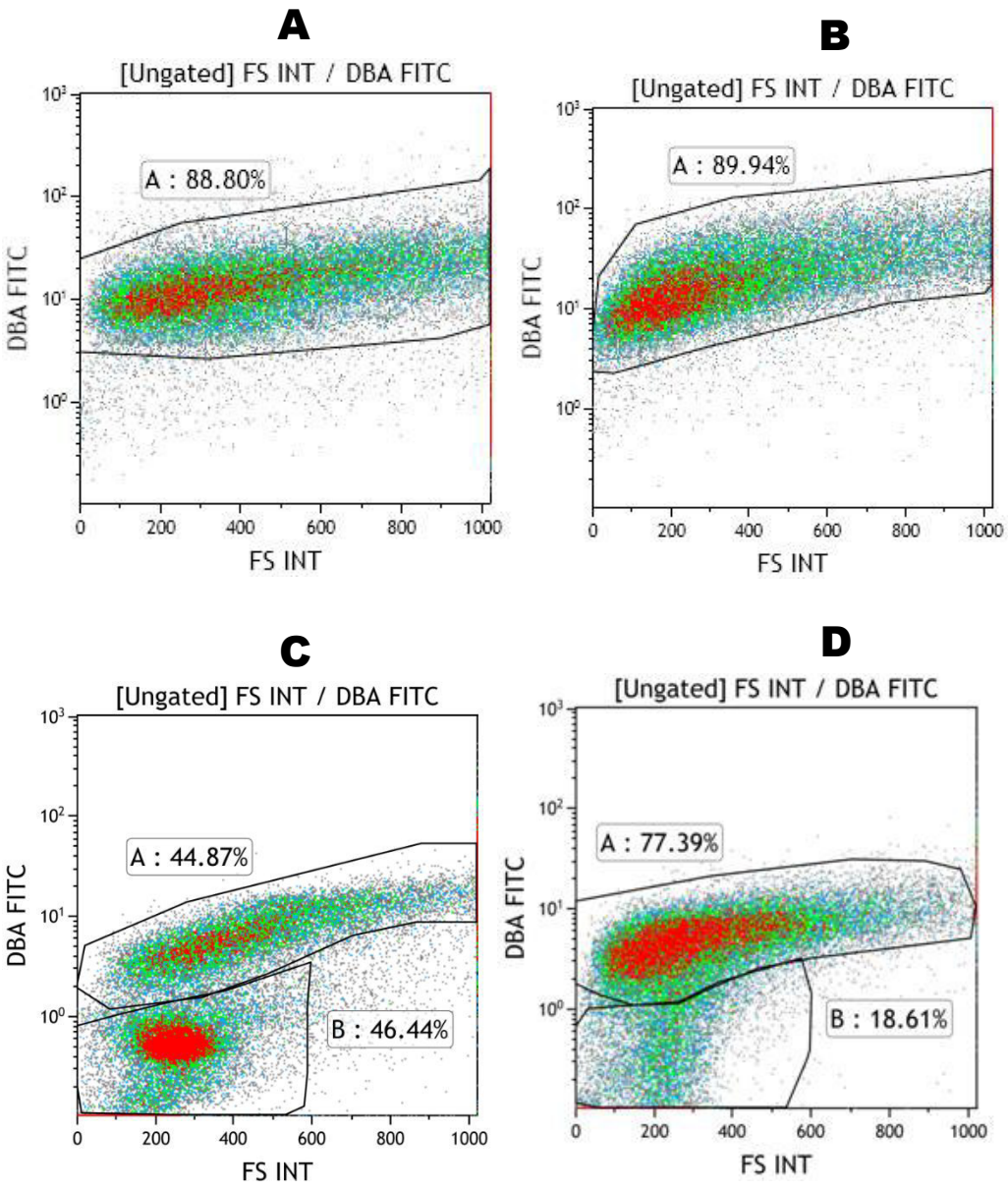


Figura 22. Análisis por citometría de flujo de las células germinales testiculares de alpaca, aisladas de por digestión enzimática.(A) 10-12 meses de edad (DL, dientes de leche); (B) 18-20 meses de edad (2D, dos dientes); (C) 24-36 meses de edad (4D, cuatro dientes); y (D) > 36 meses de edad (6D, seis dientes o boca llena). Citómetro Gallios, Beckman Coulter, USA. FARVET.

5.2. Detección a nivel transcripcional de biomarcadores específicos relacionados con la autorrenovación y diferenciación de espermatogonias de *Vicugna pacos* "alpaca" durante el desarrollo testicular postnatal

La extracción de RNA de tejido testicular se hizo inicialmente por el método del trizol (Invitrogen, USA). Con este método se logró extraer RNA de buena calidad a partir de tejido testicular de ratón sin mayor dificultad; sin embargo, a partir de tejido testicular de alpaca, no se logró extraer RNA, aun cuando se probaron diferentes condiciones de extracción, transporte y almacenamiento de tejido testicular, a temperatura de refrigeración (4ºC), a temperatura de ultracongelación (-80ºC) y bajo condiciones de criopreservación en nitrógeno líquido (-196ºC) en presencia y ausencia del reactivo RNAlater (Biomatrica, USA). Sobre la base de estos resultados, se optó por el método del fenol/cloroformo (Ambion, USA), que sí permitió obtener RNA de buena calidad. En efecto, el RNA de tejido testicular de alpaca presentó una gran inestabilidad durante su extracción con el método del trizol; sin embargo, su extracción fue estable con el método del fenol/cloroformo, obteniéndose cantidades entre 2,000 a 4,500 ng/uL, utilizando siempre como control tejido testicular de ratón, donde la extracción de RNA fue estable con ambos métodos, dando un perfil electroforético típicamente conocido que muestra la predominancia de las bandas 28S y 18S del rRNA Figuras 23, 24, 25 y 26).

El método del fenol/cloroformo (Ambion, USA), fue utilizado en las extracciones de RNA a partir de tejido testicular de alpaca, en todos los grupos etarios considerados durante el desarrollo testicular posnatal (Figuras 27, 28 y 29).

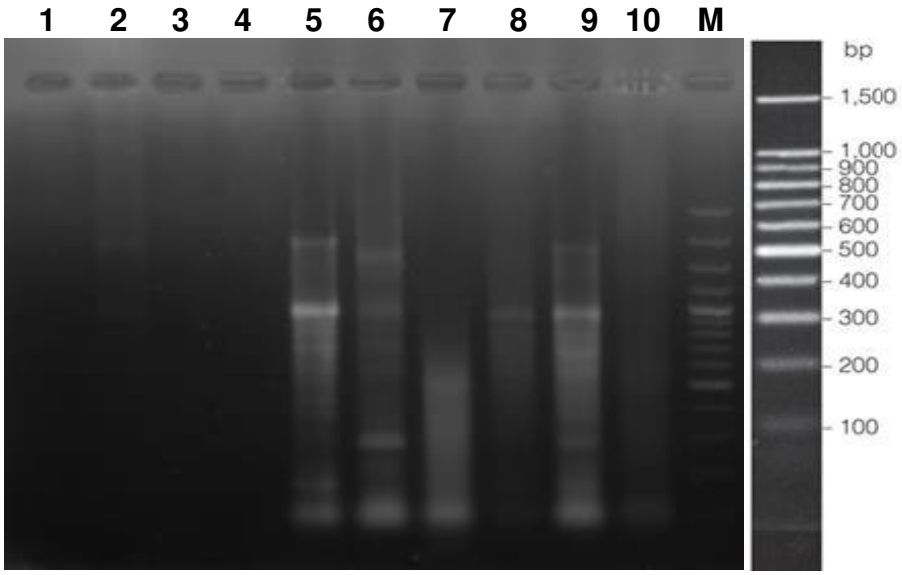


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. RNA de tejido testicular de ratón extraído con trizol, a partir de testículos frescos, bajo diferentes condiciones de manipulación. Volumen de gel 120 ml, bufferTAE 1X, 90 V por 50 min. Carriles: (1 y 2), muestras + RNA later, conservadas a temperatura ambiental por 21 h; (3 y 4), muestras + RNA later, conservadas a 4ºC por 21 h; (5), muestra + trizol, conservada en NL_2 a -196ºC por 21 h; (6), muestra + trizol, conservada a temperatura ambiental por 21 h; (7, 8, 9 y 10), muestras + trizol; (M), marcador de tamaño molecular *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega).

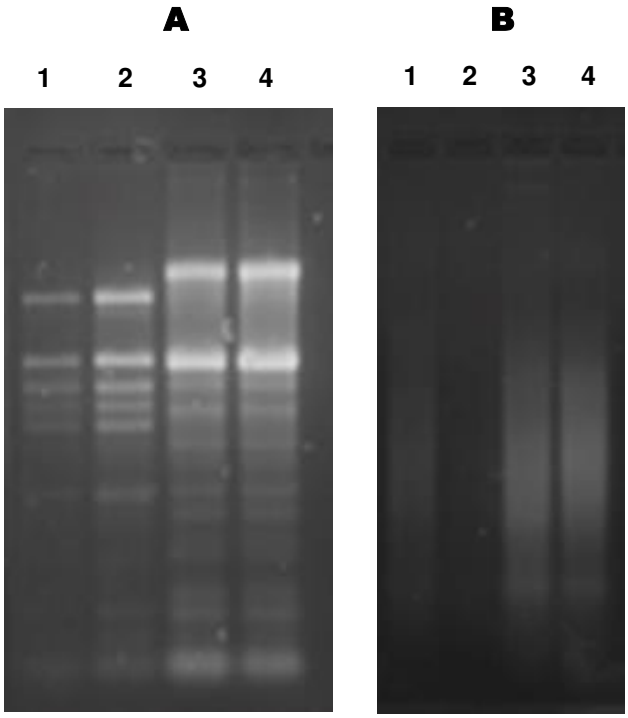


Figura 24. Electroforesis de RNA extraído con trizol, bajo condiciones desnaturalizantes con formamida. (A) *Mus musculus*, volumen de gel 40 ml, buffer TAE 1X, 90 V por 70 min. Carriles: (1 y 2), RNA de *Solanum tuberosum*; (3 y 4), RNA de *Mus musculus*. (B) *Vicugna pacos*, gel de agarosa al 2%, 40 ml, buffer TAE 1X, 90 V por 60 min. Carriles: (1-4), RNA de *Vicugna pacos*.

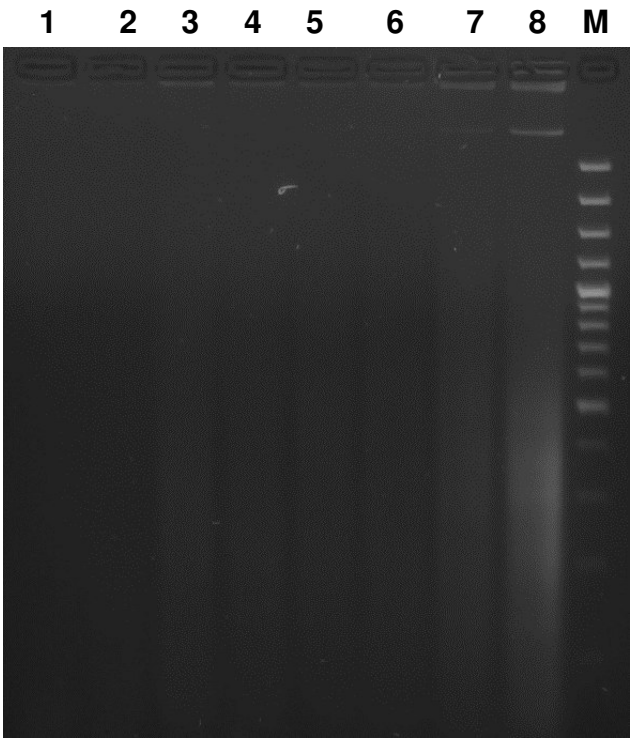


Figura 25. Electroforesis de RNA de tejido testicular de *Vicugna pacos* extraído con trizol. No se observa RNA. Gel de agarosa al 2%, 40 ml, buffer TAE 1X, 90 V por 60 min. Carriles: (1-4),muestras de RNA de alpaca en condiciones desnaturalizantes con formamida: 3 μL RNA + 2 μL *loading dye 6X* + 7 μL formamida; (5-8), muestras de RNA de alpaca normales: 3 μLRNA + 2 μL *loading dye 6X* + 7 μL agua tratada con DEPC; solamente en el carril 8 de cargaron: 10 μL RNA + 2 μL *loading dye 6X*; (M), marcador de tamaño molecular *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega): 1 μL ladder 100 bp + 1 μ*L loading dye 6X* + 4 μL agua tratada con DEPC.

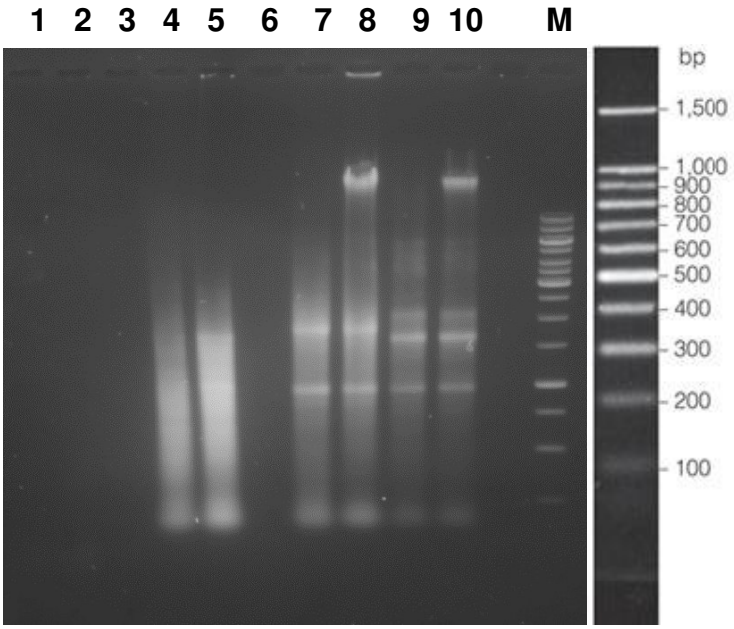


Figura 26. Electroforesis en RNA de tejido testicular de *Vicugna pacos* tratado con DNasa I. Gel de agarosa al 1%. Volumen de gel 100 ml, condiciones naturales, buffer TAE 1X, 90 V por 110 min. Carriles: (1-4), RNA de *Vicugna pacos* extraído con trizol; (5 y 6), RNA de ratón extraído con trizol; (7 y 8), RNA de alpaca extraído con fenol/cloroformo; (9 y 10), RNA de *Mus musculus* extraído con fenol/cloroformo; (M), marcador de tamaño molecular *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega).Las muestras de los carriles 8 y10 no recibieron tratamiento con DNasa I. Muestras de los carriles 1-10: 3 μL *loading dye 6X* + 15 μL RNA tratado con DNasa I. Marcador: 1 μL *ladder 100 bp* + 4 μL agua tratada con DEPC + 1 μL *loading dye 6X.*

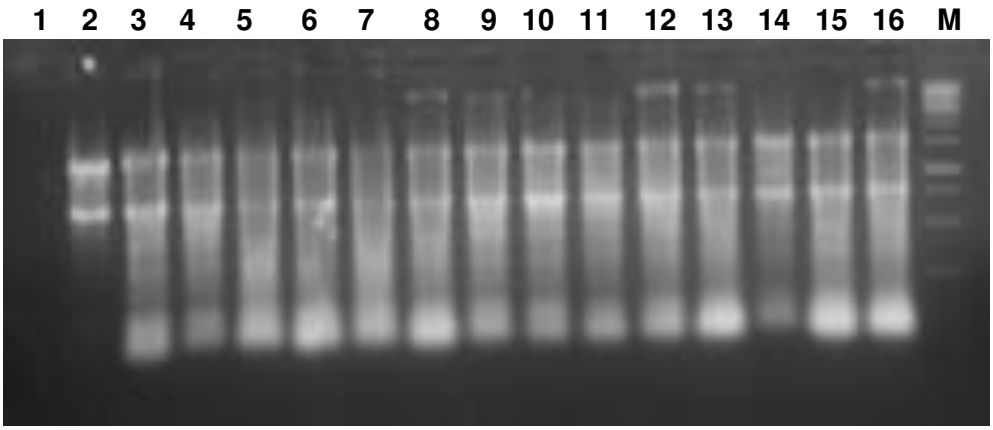


Figura 27. Electroforesis en RNA de tejido testicular de *Vicugna pacos* extraído con fenol/cloroformo luego del primer tratamiento con DNasa I. Gel de agarosa al 1.5%. Volumen de gel 80 mL, 2.5 μL de bromuro de etidio al 1%, bufferTAE 1X, 90 V por 60 min. Carriles: (1 y 2), RNA de tejido testicular de *Mus musculus*; (3-7), RNA de alpaca de 2-3 años, conservado en NL_2; (8-12), RNA de *Vicugna pacos* > 3 años conservado en NL_2; (13-16), RNA de *Vicugna pacos* de 2-3 años, conservado en ultracongelación a -80ºC; (M), marcador de tamaño molecular *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega). Las muestras de los carriles 1 y 3 no recibieron tratamiento con DNasa I. Muestras de loscarriles 1 y 3: 2 μL *loading dye 6X* + 5 μL agua tratada con DEPC +5 μL RNA. Muestras de los carriles 2 y 4-16: 2 μL *loading dye 6X* + 10 μL RNA tratado con DNasa I. Marcador: 1 μL *ladder* 100 bp +4 μL agua tratada con DEPC + 1 μL *loading dye 6X*. Se observa una relativa degradación en las extracciones, excepto ratón y carril 14. Se observan las bandas 28S y 18S del RNA en las extracciones con fenol/cloroformo. Se observa todavía contaminación con DNA en los carriles 8, 9, 12, 13 y 16.

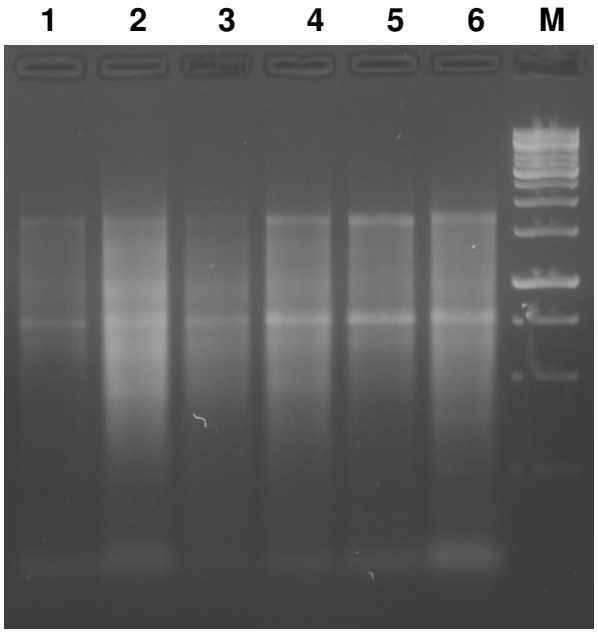


Figura 28. Electroforesis en RNA de *Vicugna pacos* extraído con fenol/cloroformo luego del segundo tratamiento con DNasa I.Gel de agarosa al 1.5%. Volumen de gel 40 mL, 1.5 μL de bromuro de etidio al 1%, buffer TAE 1X, 90 V por 60 min. Carriles: (1 y 4), RNA de *Vicugna pacos* > 3 años, conservado en NL_2; (2 y 3), RNA de *Vicugna pacos* de 2-3 años, conservado en NL_2; (5 y 6), RNA de *Vicugna pacos* de 2-3 años, conservado en ultracongelación a -80ºC; (M), marcador de tamaño molecular *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega). Muestras: 1 μL *loading dye 6X* +5 μL RNA tratado con DNasa I. Marcador: 1 μL *ladder 100 bp* + 4 μL agua tratada con DEPC + 1 μL *loading dye 6X* 1 μL. Se observa ausencia total de DNA genómico en todas las muestras; sin embargo, en el carril 2 hubo una notable degradación del RNA. Las muestras de RNA deben ser reextraídas antes de utilizarse para la retrotranscripción.

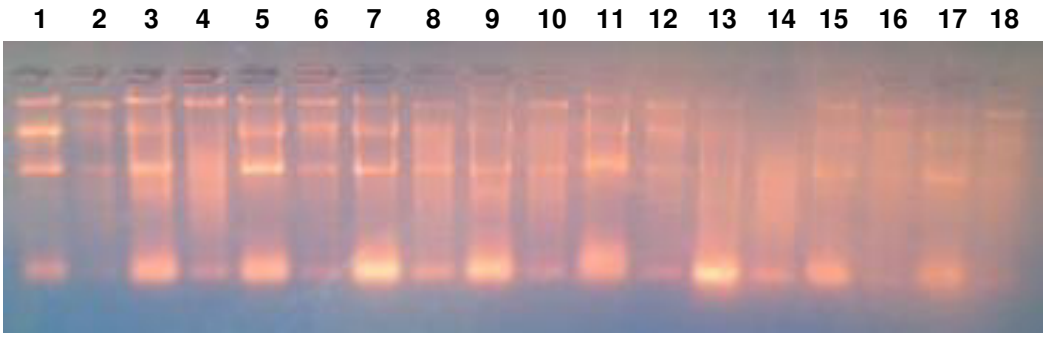


Figura 29. Control de calidad del RNA de tejido testicular de alpaca conservado a -80ºC luego de 6 meses. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. RNA de tejido testicular de *Vicugna pacos* extraído con fenol/cloroformo. Volumen de gel 120 mL, condiciones naturales, buffer TAE 1X, 90 V por110min. Carriles: (1-18), muestras de tejido testicular de alpaca de todas las edades. Los morteros y pilones, previamente autoclavados, fueron tratados con ELIMINase (Decon Labs, Inc., USA), un inhibidor de nucleasas, antes de pulverizar las muestras en NL_2.

En relación al diseño de *primers* para la detección a nivel transcripcional de biomarcadores específicos de SSC en tejido gonadal de alpaca, la Tabla 10 entrega información de las secuencias de los *primers* utilizados en la presente investigación, tanto para los genes experimentales (biomarcadores) y para los genes de referencia o *housekeeping*. La columna referida al tipo de biomarcador, indica si el biomarcador es propio de una espermatogonia comprometida con la autorrenovación, es decir, “positivo” para SSC; o si es propio para una espermatogonia comprometida con la diferenciación, es decir, “negativo” para SSC. Las secuencias correspondientes a los *primers* diseñados y sintetizados para todos los biomarcadores considerados inicialmente, se muestran en el Anexo 5.

Tabla 10. Secuencias de los *primers* para los genes experimentales y genes de referencia (*housekeeping*) detectados en tejido gonadal de *Vicugna pacos*.

Biomarcador	Tipo	Fordward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Tamaño Mol. (bp)
Nanos2	Positivo	GTGTCCCATCCTGCGGCACT	TGCGGCGGTAGAGAGACTGCT	113
Lin28	Positivo	GAAGCGCAGATCAAAGGGAGA	GCTGGGCCTTCAATGGACAC	149
Ckit	Negativo	CGGCTTCAGCACTTCCACCTA	CGGCTTCAGCACTTCCACCTA	112
Rplp0	Referencia	ATGCGCAAGGCCATCCGAGG	GGCGGCAGCTGGCACCTTAT	135
Actb	Referencia	CGGGACCTGACGGACTACCTC	TGGCCATCTCCTGCTCGAAGT	12

En la Tabla 11 se muestran los resultados de la expresión a nivel transcripcional de biomarcadores específicos de SSC en tejido testicular de alpaca. Todas las muestras de cDNA utilizadas para las reacciones de PCR, se obtuvieron a partir del banco de muestras de tejido testicular de alpaca mantenidas en ultracongelación a -80ºC, debidamente identificadas y codificadas según edad, procedencia y fecha de muestreo. Como se observa en la Tabla 11 y la Figura 30, mediante PCR convencional se lograron detectar dos biomarcadores positivos específicos para SSC de alpaca, *Nanos2* con un tamaño molecular de 113 bp y *Lin28* con un tamaño molecular de 149 bp, de los siete biomarcadores propuestos, en tejido testicular de alpacas de 12 meses de edad.

Asimismo, como se observa en la Tabla 11 y la Figura 31, se logró detectar en los tres grupos etarios un biomarcador negativo específico para SSC de alpaca, *Ckit* con un tamaño molecular de 112 bp, es decir, machos de 12 meses de edad, machos de 2-3 años y machos con edad mayor a 3 años. Asimismo, se logró detectar el gen de referencia *Rplp0* con un tamaño molecular de 135 bp, en tejido testicular de machos pertenecientes a los tres grupos etarios; mientras que el gen de referencia *Actb*, de 128 bp, solamente fue detectado en tejido gonadal de machos de 12 meses de edad y machos con edad mayor a 3 años. El tamaño molecular de todos los amplicones coincide con los estimados previamente durante el diseño de los *primers* utilizando el Programa Oligo6 (https://www.oligo.net/downloads.html).

Tabla 11. Detección de biomarcadores para SSC por PCR convencional en tejido testicular de alpaca durante el desarrollo testicular posnatal.

Biomarcador	Tipo	Ubicación	Edad de las alpacas		
			12 meses	2-3 años	> 3 años
Zbtb16	Positivo	Intracelular	Ausencia	Ausencia	Ausencia
GFRα-1	Positivo	Superficie	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Stra8	Positivo	Intracelular	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Nanos2	Positivo	Intracelular	PRESENCIA	Ausencia	Ausencia
Ngn3	Positivo	Intracelular	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Lin28	Positivo	Intracelular	PRESENCIA	Ausencia	Ausencia
Ecad	Positivo	Superficie	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Ckit	Negativo	Superficie	PRESENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA
Sohlh1	Negativo	Intracelular	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Sohlh2	Negativo	Intracelular	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Rplp0	Referencia	Intracelular	PRESENCIA	PRESENCIA	PRESENCIA
Gadph	Referencia	Intracelular	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Actb	Referencia	Intracelular	PRESENCIA	Ausencia	PRESENCIA

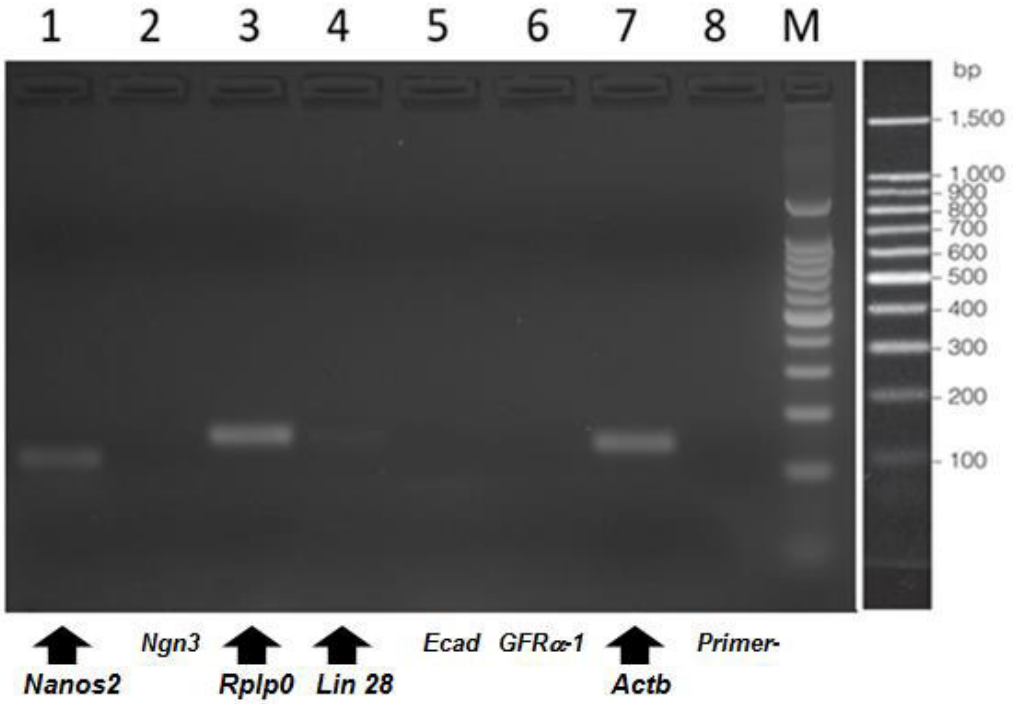


Figura 30. Detección cualitativa de los biomarcadores positivos ***Nanos2*** (113 bp) y ***Lin28*** (149 bp) y de los genes de referencia ***Rplp0*** (135 bp) y ***β-actina*** (128 bp) en tejido gonadal de *Vicugna pacos* macho pre púber de 12 meses de edad. Electroforesis de productos de PCR. Condiciones de PCR: se realizaron reacciones de 10 μL, que contenían 5 μL de *PCR master mix 2X* (Thermo Scientific, USA), 1 μL de *forward primer* 10 mM, 1 μL de *reverse primer* 10 mM, 2 μL de cDNA 1/100y 1 μL de agua PCR; el ciclaje fue: desnaturalización inicial a 95°Cx 2 min, seguida de 38 ciclos de desnaturalización a 95°C por30 seg, alineamiento (a 64.7°C x 3 seg para *Nanos2* y *Rplp0;* a 61.8°Cx 3 seg para *Lin28*; y a 65.4°C x 3 seg para *β-actina*) y extensión a 72°Cx 60 seg y una extensión final a72°C x 10 min. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa al 1.8% en TAE 1X, corrido a 85 V por 45 min. A los10 μL del producto de PCR se añadieron 2 μL de *loading 6X* que dieron12 μL, de los cuales se cargaron 8 μL. El marcador *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega) se cargó directamente con 7 μL. Carriles: (1) *Nanos2*, (2) *Ngn3*, (3) *Rplp0*, (4) *Lin28*, (5) *Ecad*, (6) *GFRα-1*, (7) *Actb*, (8) Control negativo de *primer* y (M) Marcador *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega). La flecha indica el amplificado del tamaño esperado.

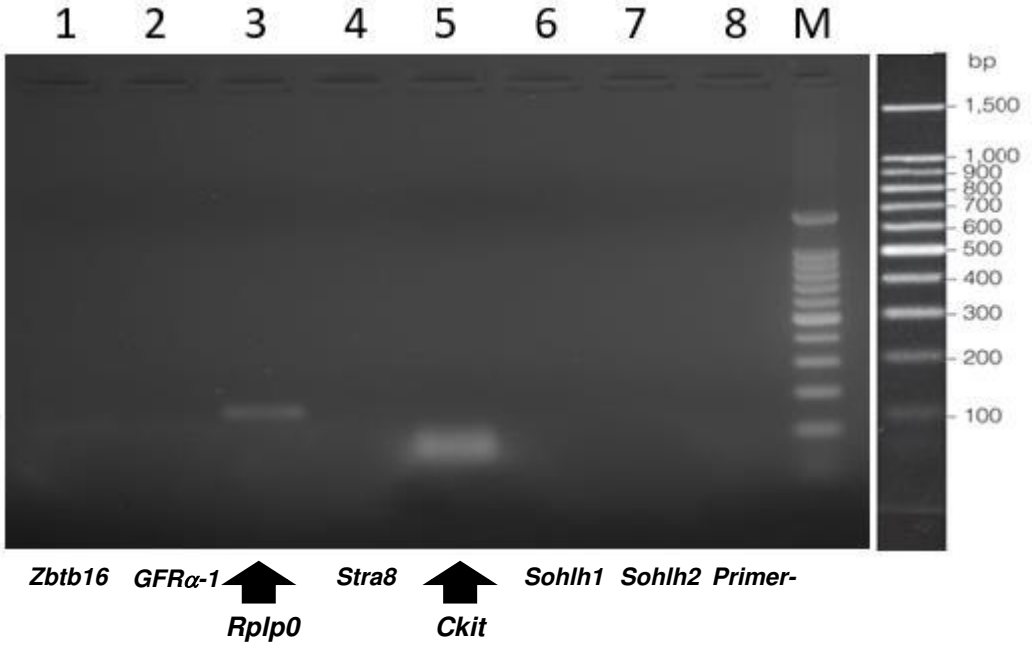


Figura 31. Detección cualitativa del biomarcador negativo ***Ckit*** (112 bp) y el gen de referencia ***Rplp0*** (135 bp) en tejido gonadal de *Vicugna pacos* macho pre púber de 12 meses de edad**.** Electroforesis de productos de PCR. Condiciones de PCR: se realizaron reacciones de 10μL, que contenían 5 μL de PCR *master mix 2X* (Thermo Scientific, USA), 1 μL de *forward primer* 10 mM, 1 μL de *reverse primer* 10 mM, 2 μL de cDNA 1/100 y 1 μL de agua PCR; el ciclaje fue: desnaturalización inicial a 95°C x 2 min, seguida de 38 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, alineamiento (a 64.0°C x 3 seg para *Ckit* y a 64.6°C x 3 seg para *Rplp0*) y extensión a 72°C x 60 seg y una extensión final a 72°C x 10 min. Condiciones de electroforesis: gel de agarosa al 1.8% en TAE 1X, corrido a 85 V por 45 min. A los 10 μL del producto de PCR se añadieron 2 μL de *loading 6X* que dieron 12 μl, de los cuales se cargaron 8 μL. El marcador *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega) se cargó directamente con 7 μL. Carriles: (1) *Zbtb16*, (2) *GFRα-1*, (3) *Rplp0*, (4) *Stra8*, (5) *Ckit*, (6) *Sohlh1*, (7) *Sohlh2*, (8) Control negativo de primer y (M)Marcador *bench top 100 bp DNA ladder* (Promega). La flecha indica el amplificado del tamaño esperado.

5.3. Caracterización biométrica durante el desarrollo testicular posnatal de *Vicugna pacos* "alpaca"

En la Figura 32 se muestra el aspecto general de los testículos de alpaca luego de la castración y descapsulación.Como se observa, prácticamente no hay diferencias notorias entre las características biométricas de los testículos de alpaca del grupo etario de 2-3 años (C) y el grupo etario mayor a 3 años de edad (D); lo que significa que es posible encontrar una alpaca macho de 2 años con testículos bien desarrollados (4.0 cm x 2.8 cm) y una alpaca macho de 4 años con testículos menos desarrollados (3.2 cm x 2.4 cm). Al menos entre estos dos grupos etarios la edad no tiene relación directa con el tamaño testicular y probablemente con la capacidad reproductiva individual (Anexo 4).

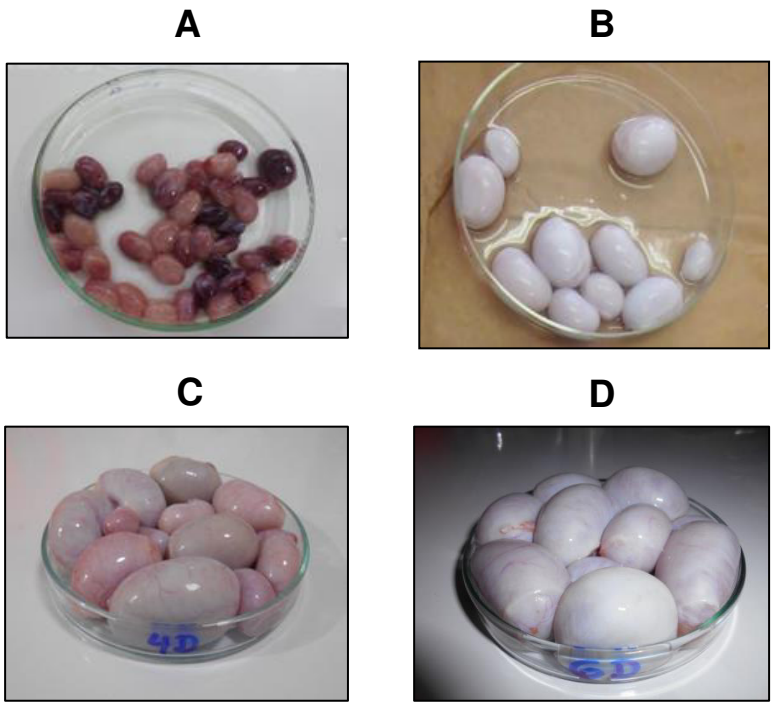


Figura 32. Aspecto general de los Testículos descapsulados de alpaca según la edad. (A) 10-12 meses; (B) 18-20 meses;(C) 24-36 meses;(D) Mayor a 36 meses.

Las medias y la desviación estándar del peso, longitud, ancho, circunferencia y volumen testicular, para los cuatro grupos etarios, 10-12 meses de edad (n=54), 18-20 meses de edad (n=30), 24-36 meses de edad (n=46) y mayor a 36 meses de edad (n=48), se muestran en las Figuras 33, 34 y 35. Los individuos que se incluyeron en la población muestral fueron machos que reunieron los criterios de inclusión (edad correspondiente al grupo etario y ausencia de malformaciones genitales) y de exclusión (edad distinta al grupo etario y presencia de malformaciones genitales). El ANOVA fue significativo para todos los niveles de confianza (P = 0.000 fue menor que α = 0.1, 0.05 y 0.01), por lo tanto, se rechaza la Hipótesis Nula (Anexo 3). Esto significa que al menos una media o promedio de los tratamientos, es diferente (Anexo 3). Así, la Prueba de Tukey permitió establecer que el promedio tanto del peso, longitud, ancho, circunferencia y volumen testicular, respecto a la edad, es diferente para cada grupo etario, observándose una tendencia en la que a mayor edad los parámetros biométricos testiculares son también mayores. Por tanto, sí hay una relación entre la edad y el tamaño testicular; sin embargo, entre machos en edad reproductiva la biometría testicular es muy variable.

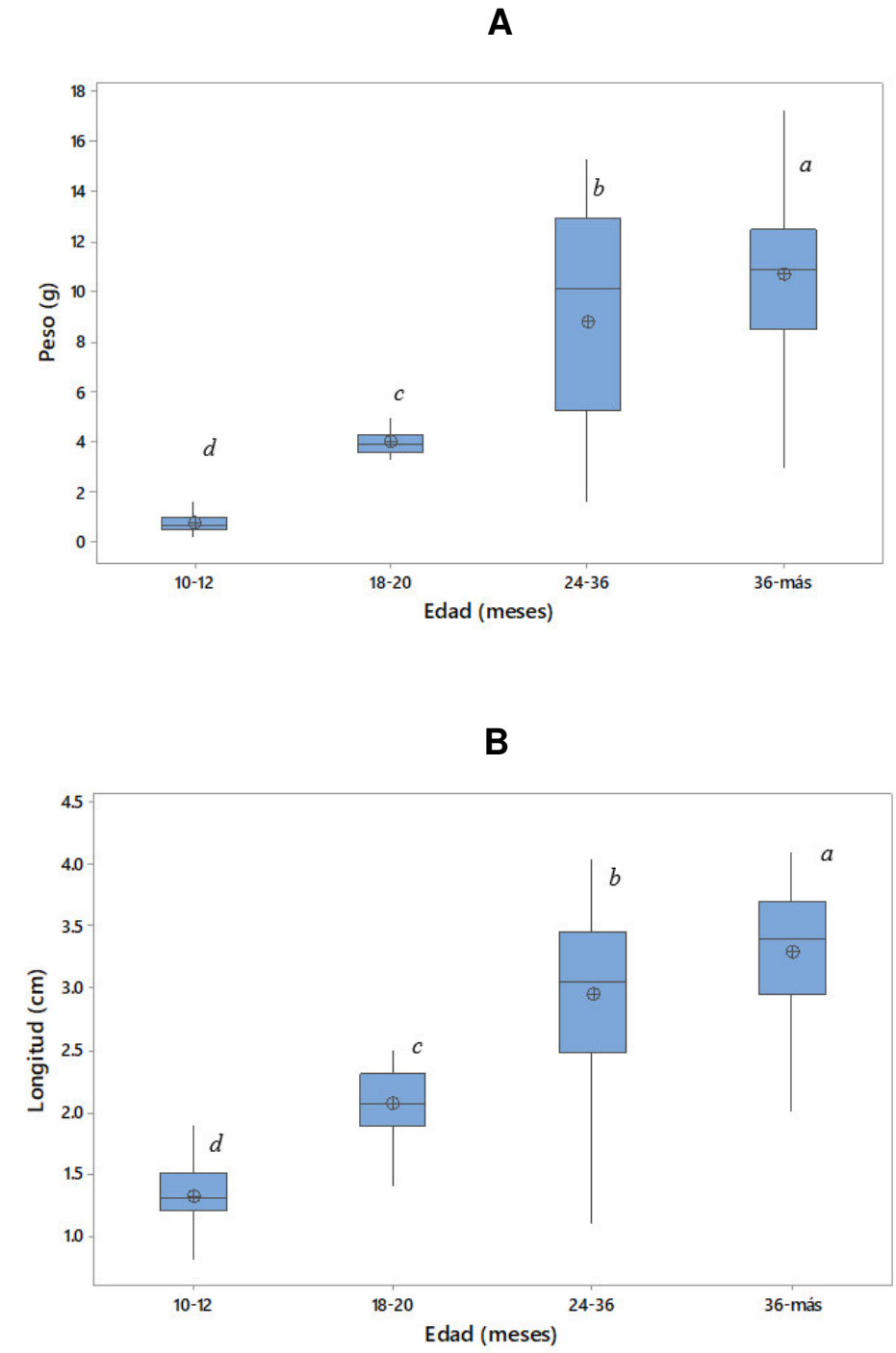


Figura 33. Peso y longitud testicular en alpacas según la edad. (A) Variación del peso en relación a la edad; (B) Variación de la longitud en relación a la edad. Las letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los parámetros biométricos testiculares ($p<0,01$).

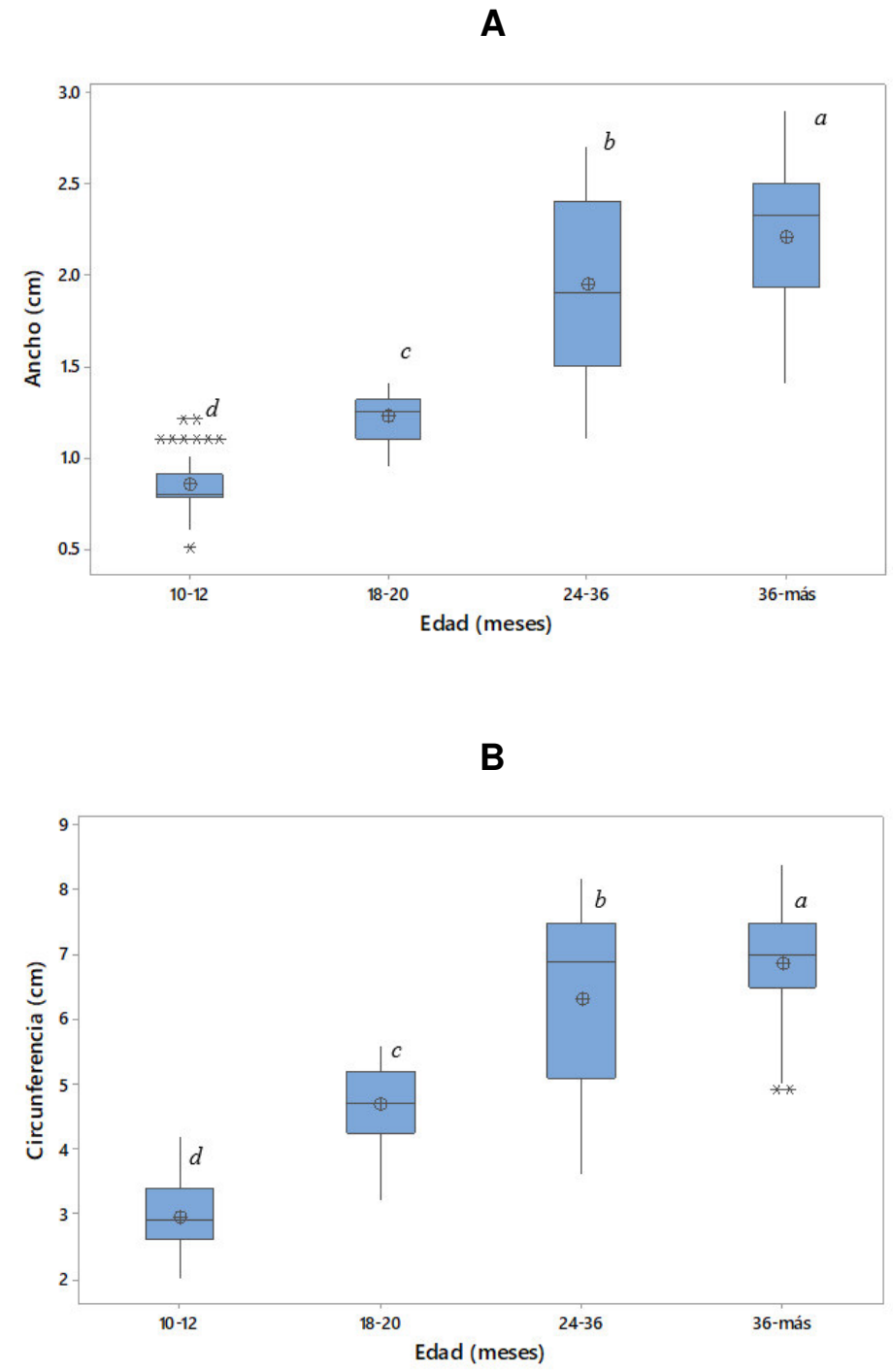


Figura 34. Ancho y circunferencia testicular en alpacas según la edad. (A) Variación del ancho en relación a la edad; (B) Variación de la circunferencia en relación a la edad. Las letras minúsculas representan diferencias estadísticamente significativas en cada uno de los parámetros biométricos testiculares ($p<0,01$).

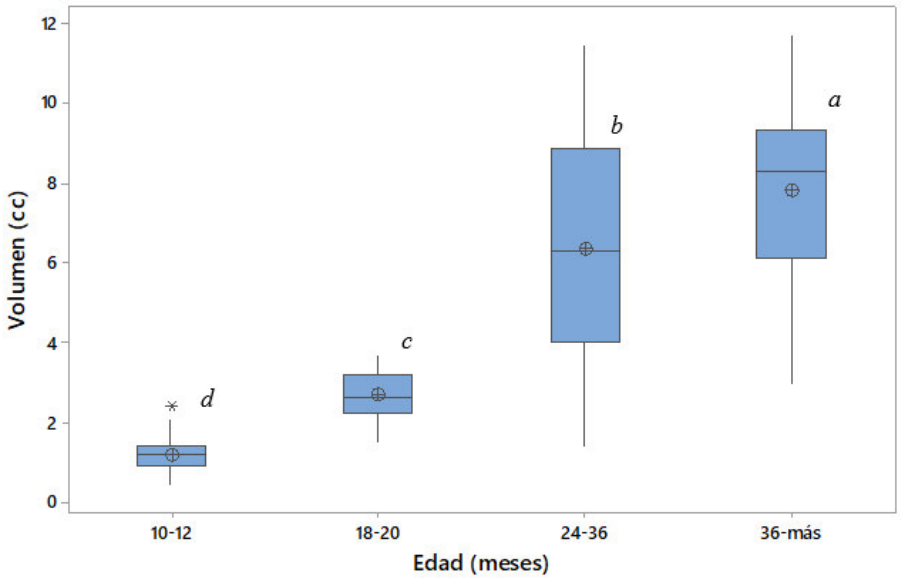


Figura 35. Volumen testicular en alpacas según la edad. Las letras minúsculas diferentes (*a, b, c y d*), denotan que las medianas entre los grupos etarios, difieren significativamente, a un nivel de confianza del 99% (p<0,01).

VI.- DISCUSIÓN

En relación a la viabilidad de las células germinales testiculares de alpaca aisladas por digestión enzimática, al revisar los valores del gráfico de cajas múltiples (Figura 19), se observa que la extensión o amplitud de los rangos de viabilidad en cada grupo etario varían, siendo los grupos etarios de 6-8 meses y de 10-12 meses los más variables, con medianas de 90.38% y 92.15%, respectivamente y promedios de 76.9% y 75.3%, respectivamente; en comparación a los grupos etarios de 24-26 meses y mayores a 36 meses, que son los menos variables, con medianas de 80% y 80.35%, respectivamente y promedios de 51.9% y 52.1%, respectivamente (Anexo 5). Estos resultados indican que la edad más apropiada para el aislamiento de espermatogonias en alpacas, es a los 10-12 meses de edad, con una mediana de 92.15% de viabilidad.

Respecto al rendimiento de las células germinales testiculares de alpaca aisladas por digestión enzimática, al revisar los valores del gráfico de cajas múltiples (Figura 21), se observa que la extensión o amplitud de los rangos de rendimiento en cada grupo eterio varían, siendo el grupo etario de 10-12 meses el más variable con una mediana de 52 x 10^6 espermatogonias/ml y un promedio de 55 x 10^6 espermatogonias/ml; mientras que el grupo etario de 24-36 meses fue el menos variable, con una mediana de 32 x 10^6 espermatogonias/ml y un promedio de 33 x 10^6 espermatogonias/ml. Estos resultados indican que el mejor rendimiento en el aislamiento de espermatogonias de alpaca, se obtiene a una edad entre 10-12 meses.

El análisis por citometría de flujo de las células germinales testiculares de alpaca, aisladas por digestión enzimática, permitió establecer diferencias entre las poblaciones de espermatogonias de los diferentes grupos etarios. De los gráficos de dispersión emitidos por el citómetro, se tiene que en el eje de X se reporta la dispersión frontal o *Forward Scatter* (FSC), que corresponde a la luz difractada y mide el tamaño de las células coloreadas con FICT-DBA; mientras que en el eje de Y se tiene la dispersión lateral o *Side Scatter* (SSC), que corresponde a la luz reflejada y refractada y mide la complejidad interna de las células coloreadas con FICT-DBA.

La población de células germinales aisladas de testículos de alpacas pre púberes y púberes, de 10-12 meses de edad y de 18-20 meses de edad, presenta una homogeneidad en lo que respecta a tamaño y complejidad y una alta afinidad o reactividad al fluorocromo DBA-FICT (Figuras 22-A y 22-B), lo que indicaría la abundancia de células espermatogoniales en el orden del 89-90% de la población total aislada.

En cambio, la población de células germinales aisladas de testículos de reproductores maduros y viejos, de 24-36 meses de edad y mayores a 36meses de edad, se divide en dos grupos que se diferencian sobre todo por su grado de complejidad y grado de reactividad frente al fluorocromo DBA-FICT (Figuras 22-C y 22-D). En estos grupos etarios, se observa una subpoblación de espermatogonias de mayor complejidad y tamaño, en el orden de aproximadamente 45% para alpacas de 24-36 meses de edad y 77% para alpacas con edad mayor a 36 meses; y otra subpoblación de espermatogonias de menor complejidad y tamaño, en el orden de 46% para alpacas de 24-36 meses de edad y 19% para alpacas con edad mayor a 36meses.

Con base en lo hallado por Izadyar *et al.* (2002a), se puede afirmar que lo encontrado en la presente investigación probablemente indica la presencia mayoritaria de espermatogonias diferenciadas en la población de células germinales aisladas de ambos grupos etarios, con tendencia a aumentar en el grupo etario de mayor edad; en cambio, en la fracción o subpoblación de espermatogonias de menor complejidad y tamaño estarían incluidas las SSC.

Los resultados son también concordantes con los reportados por Klisch *et al.* (2011), quienes demostraron la afinidad del DBA por las células germinales primordiales y espermatogonias de individuos pre púberes de vacuno, porcino, equino y de llama.

En la investigación hecha por Izadiar *et al.* (2002a), en bovinos, el DBA demostró tener afinidad tanto por espermatogonias de tipo A grandes y pequeñas y su aplicación en la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) dio como resultado porcentajes similares de espermatogonias de tipo A a los determinados por el examen morfológico bajo el microscopio de luz equipado con una lente de Nomarski. Casi todas las espermatogonias grandes de tipo A mostraron una fuerte inmunorreactividad al *Ckit*, lo que indica que estas células se habrían sometido por lo menos una etapa de diferenciación inicial. En contraste, aproximadamente la mitad de la población de espermatogonias pequeñas de tipo A fueron negativas para *Ckit*, lo que indica la presencia de células madre espermatogoniales en dicha población.

Esta afinidad fue previamente reportada por Ertl y Wrobel (1992), quienes estudiaron la distribución de residuos de azúcares en el testículo de bovinos durante la ontogénesis postnatal y señalan que laα-D-*N*-acetil-galactosamina (α-D-GalNAc) detectada en la zona del aparato de Golgi y su proximidad, en las preespermatogonias (PSG), parece jugar un papel importante durante la proliferación y migración de las PSG en el testículo prepuberal. Concomitantemente con la diferenciación de las PSG en espermatogonias, la intensidad de unión de DBA con la zona del aparato de Golgi de estas células disminuyó. Después de la aparición gradual de la espermatogénesis, la lectina reveló tinción de los complejos de Golgi en la mayoría de las etapas de células germinales. La glicosilación de los componentes de las células se lleva a cabo en el complejo de Golgi, lo que explica la fuerte afinidad de la lectina a este compartimento de las células (Ertl y Wrobel, 1992).

Poco después, Imberty *et al.* (1994), investigaron el modelamiento molecular de la lectina DBA, una proteína de unión a carbohidratos proveniente de la semilla de la leguminosa tropical *Dolichos biflorus,* frente a diferentes

carbohidratos y comprobaron que en efecto esta proteína tiene una especificidad muy estrecha frente a la α-D-GalNAc, la misma que está presente de manera abundante en la superficie de las células germinales de bovinos (Izadyar *et al*., 2002a). Todos estos resultaron parecen indicar que las células germinales de alpaca seguirían un patrón similar al del toro respecto a la distribución de residuos de azúcares, específicamente de α-D-*N*-acetil-galactosamina, durante la organogénesis postnatal de los testículos.

Todos estos resultados indican que la proporción de la población de células madre espermatogoniales, respecto a la población total de células germinales aisladas a partir de testículos de alpaca, disminuye conforme aumenta la edad reproductiva del macho y permite proponer que la edad más apropiada del macho para aislar células madre espermatogoniales, es entre 10-12 meses de edad. Esta afirmación se apoya en el hecho de que las alpacas macho pueden producir semen fértil cuando tienen alrededor de un año de edad y un peso promedio de 34 Kg, edad en la cual comienzan a mostrar interés sexual por las hembras; pero debido a que recién a la edad de 3 años el 100% de ellos está libre de adherencias pene-prepuciales, la práctica generalizada es destinar los machos a la reproducción a partir de los tres años, siendo sexualmente activos hasta la edad de 11-12 años aunque con una tasa baja de fecundidad (Sumar, 1983; FAO, 1996). No ha sido posible distinguir el número ni la proporción de machos con edad mayor a 5 años que fueron incluidos en el grupo muestral del presente estudio.

Respecto a la extracción de RNA a partir de tejido testicular de alpaca, diversos autores reportan haber extraído RNA total a partir de biopsias de piel de alpaca utilizando el kit de Qiagen S.A., Courtaboeuf, France (Bathrachalam *et al*., 2011), reactivo Trizol de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (Fan *et al*., 2011; Tian *et al*., 2012) y kit PureLink Micro-to-Midi Total RNA Isolation System de Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (Zhua *et al*., 2010); a partir de tejido hepático de antílope tibetano utilizando el reactivo Trizol de Invitrogen (Yingzhong*et al*., 2007) y a partir de mucosa intestinal de alpaca utilizando el kit *SV* Total RNA Isolation System, Promega (More *et al*., 2011).

La dificultad de extraer RNA de tejido testicular de alpaca con el método del trizol (Figuras 23, 24, 25 y 26), podría estar relacionada con el contenido de ribonucleasas, que es variable en los diferentes órganos de los mamíferos. Se conoce que el páncreas y el bazo son órganos con muy altos contenidos de nucleasas, a diferencia del riñón, hígado e intestino que tienen niveles menores aunque no despreciables. Respecto al tejido testicular, aparentemente no se ha encontrado literatura relacionada con estudios específicos del contenido de ribonucleasas, sin embargo, nuestros resultados indican que probablemente el tejido testicular tiene una alta actividad de ribonucleasas ya que como gónada está especializado en la formación continua e intensa de espermatozoides, es decir, que se trata de un órgano cuyas células tienen una elevada tasa transcripcional y traduccional y por ende requieren mayor actividad de ribonucleasas.

El diseño de *primers* para biomarcadores específicos de células madre espermatogoniales de alpaca (Tabla 10), se inició sobre la base de cuatro hechos concretos, que no eran muy alentadores por cierto: primero, que no está reportado el genoma completo de *Vicugna pacos* en la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI), sobre el que se estima un conocimiento de aproximadamente 80%; segundo, que para efectos de los alineamientos solamente se conocen secuencias específicas de fragmentos del genoma de la alpaca, es decir, el genoma incompleto *Shotgun* (miles de trozos de DNA genómico o gDNA, producidos al azar y distribuidos en *contigs* (islas de gDNA donde hay muchos pedazos ensamblados, los cuales forman parte del genoma), existiendo un estimado de por lo menos 10,000 *Contigs* disponibles del genoma de alpaca; tercero, que siendo *Bos taurus* la especie evolutivamente más cercana a *Vicugna pacos*, tenía que servir de “molde” o de “material de partida”; y cuarto, que en el presente caso, por tratarse de evaluar la expresión relativa de los biomarcadores propuestos, la idea era amplificar DNA complementario o cDNA y no gDNA, vale decir, solamente los exones de cada gen marcador, por lo que no se vio de mayor utilidad emplear programas conocidos como el Primer3, que trabaja con gDNA.

En relación a la expresión de biomarcadores específicos de SSC de alpaca durante el desarrollo testicular posnatal, el biomarcador *Nanos2* (Tabla 11 y Figura 30), cuya denominación en inglés corresponde a *Zinc-finger motif containing RNA-binding protein 2*, es un factor intrínseco a la vez necesario y suficiente para la autorrenovación de SSC. *Nanos2* pertenece a una familia de proteínas de unión a RNA evolutivamente conservadas que contienen *motif* con dedos de zinc. El primer miembro de la familia *Nanos* fue identificado como uno de los determinantes del destino posterior en el embrión de *Drosophila melanogaster* mediante la cooperación con su socio Pumilio para suprimir directamente la expresión "Jorobada". También funciona en la migración posterior de células germinales primordiales (PGC), que se forman en el extremo posterior del embrión, en gónadas durante la gastrulación y evita también su diferenciación después de alcanzar la gónada en desarrollo. Al igual que muchos otros genes evolutivamente importantes, *Nanos* tiene tres homólogos en mamíferos, *Nanos1*, *Nanos2* y *Nanos3*. La expresión de sólo *Nanos2* y *Nanos3* está restringida al linaje de células germinales. *Nanos2* es expresado predominantemente en células germinales masculinas para el mantenimiento de las células germinales primordiales (PGC), mientras que *Nanos3* se expresa en la migración de PGC y se requiere para su mantenimiento en ambos sexos. Está demostrado que *Nanos2* se requiere en las SSC de ratón para el mantenimiento de su autorrenovación mediante la prevención de su diferenciación (Shen y Xie, 2011).

De otro lado, el biomarcador *Lin28* o *Tex17* (Tabla 11 y Figura 30), es un gen que codifica una proteína de unión a microRNAs. *Lin28* se expresa predominantemente en espermatogonias primitivas de tipo A. *Lin28* codifica una proteína evolutivamente conservada de unión a microRNAs que se une y mejora la traducción del mRNA del GF-2 (Factor 2 de Crecimiento Similar a la Insulina). Fue primero identificado como un regulador clave en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans*. En *C. elegans*, *Lin28* es expresado en estado larval temprano, pero es suprimido rápidamente durante la embriogénesis y en los animales adultos por las proteínas de unión a microARN *Lin-4* y *Lin-14*. Recientemente, *Lin28* se utilizó junto con *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* para reprogramar las células somáticas humanas en células madre pluripotentes.

En ratones, *Lin28* se expresa en diversos tejidos embrionarios, células madre embrionarias y células de carcinoma embrionario, pero no en la mayoría de tejidos adultos. Colectivamente, estos estudios han demostrado que la expresión de *Lin28* se asocia con la pluripotencia (Zheng *et al*, 2009).

El biomarcador *Ckit* (Tabla 11 y Figura 31), es el receptor del Factor de Células Madre (SCF), que es expresado por algunas espermatogonias A_{al} y por A_1-A_4, y en espermatogonias de tipo B; pero no en espermatogonias A_S y A_{pr} (Schrans *et al*., 1999). Por lo tanto, la aplicación de *Ckit* para el aislamiento de espermatogonias resulta en la selección de más espermatogonias diferenciadas que de SSC. En contraste, el aislamiento de espermatogonias de ratón sobre la base de la integrina β–6 y la integrina α-1 resulta en una población enriquecida de SSC (Izadiar *et al*., 2002a; Ebata *et al*., 2008).

El gen de referencia *Rplp0* (Tabla 11 y Figura 31), cuya denominación en inglés corresponde a: *60S acidic ribosomal protein P0*, es un componente de la subunidad 60S de los ribosomas. Es una fosfoproteína neutra con un extremo C-terminal que es casi idéntico a los extremos C-terminales de las fosfoproteínas ribosomales ácidas P1 y P2. La proteína P0 puede interactuar con P1 y P2 para formar un complejo pentamérico que consiste en dímeros de P1 y P2 y un monómero P0. La proteína se encuentra en el citoplasma. El gen *Actb*, codifica para la proteína β-actina, la cual pertenece a una familia de proteínas globulares que forman los microfilamentos uno de los tres componentes fundamentales del citoesqueleto de las células de los organismos eucariotas. Puede encontrarse como monómero en forma libre, denominada actina G, o como parte de polímeros lineales denominados microfilamentos o actina F, que son esenciales para funciones celulares tan importantes como la movilidad y la contracción de la célula durante la división celular. Su secuencia está muy conservada, es decir, que ha cambiado muy poco a lo largo de la evolución (Bankhudarova *et al*., 2011; Reisler y Egelman, 2007).

A diferencia del ganado bovino, donde las características biométricas testiculares, tales como Circunferencia Escrotal (CE) y Volumen Testicular (VT), se utilizan como criterios de selección de reproductores, toda vez de que

existe una alta correlación entre la CE y la producción espermática, la libido y la capacidad reproductiva (Alves, 2007); en alpacas las características biométricas testiculares se toman en cuenta sobre todo como una característica reproductiva, porque el saco escrotal está pegado al cuerpo, es decir, no es posible medir la CE; y porque no se ha demostrado repetitividad respecto a la edad y al peso corporal. Adicionalmente, se ha informado que existe unrango amplio de la edad en que puede aparecer la pubertad, entre 1 y 3 años de edad, lo que hace que las decisiones de manejo sean difíciles y puedan estar influenciadas por las condiciones en que se mantienen las alpacas (Abraham *et al*., 2016). Es más, en alpacas, la proporción entre el peso corporal y el peso testicular es muy baja, habiéndose observado que, a los 10-12 meses de edad, esta proporción es casi inexistente, con un valor de 0.006; lo que significa que los testículos son demasiado pequeños respecto al tamaño del cuerpo. Sin embargo, la correlación aumenta hacia los 18-20 meses de edad, alcanzando un valor de 0.02 y se estabiliza a partir de los dos años en adelante, con un valor de 0.03 prácticamente constante durante toda la edad reproductiva de la alpaca (Sumar, 1983; Mujica, 2016).

Abraham *et al.* (2016), se propusieron averiguar cuándo se puede esperar que las alpacas suecas comiencen a producir esperma, al usar la longitud testicular y la puntuación de la condición corporal como un indicador indirecto más preciso que la edad. Ellos encontraron que las alpacas con una longitud testicular ≥3.8 cm estarían produciendo esperma, mientras que aquellas con una longitud testicular ≤1.6 cm no estarían produciendo esperma, habiendo sugerido el uso de una combinación de longitud testicular, puntaje de condición corporal y edad, como una herramienta para la toma de decisiones para la cría de alpacas en condiciones suecas.

El presente estudio, ha permitido establecer la edad reproductiva más óptima para aislar células germinales testiculares de alpaca, también ha permitido establecer una metodología sencilla para detectar a nivel transcripcional biomarcadores específicos para células madre espermatogoniales en tejido testicular de alpaca, siendo la edad de 10-12 meses la más indicada tanto para el aislamiento de células germinales testiculares, como para la detección a nivel transcripcional de biomarcadores específicos de células madre

espermatogoniales. Esto es concordante con Ertl y Wrobel (1992), quienes concluyeron que la aglutinina de *Dolichos biflorus*, una lectina con afinidad específica por la α-D-N-acetil-galactosamina presente en la superficie celular de gonocitos y espermatogonias, se puede usar como un marcador específico en tejido testicular de bovinos durante las primeras 30 semanas después del nacimiento.

VII.- CONCLUSIONES

1.- La viabilidad y el rendimiento de las células germinales testiculares aisladas de alpaca por digestión enzimática, fueron superiores en el grupo de alpacas de 10-12 meses de edad, con valores de 92.15% y 55 x 10^6 espermatogonias/ml, respectivamente. Las espermatogonias de *Vicugna pacos* tuvieron un diámetro promedio de 16 μ.

2.- Se reporta por primera vez la reactividad de las células germinales de alpaca frente al conjugado del fluorocromo isotiocianato de fluoresceína con la aglutinina de *Dolichos biflorus* (FICT-DBA), que es una lectina.

3.- La proporción de la población de células madre espermatogoniales, respecto a la población total de células germinales aisladas, disminuye conforme aumenta la edad reproductiva del macho, siendo la mejor edad para aislar células madre espermatogoniales, entre los 10-12 meses.

4.- Se logró detectar a nivel transcripcional en tejido testicular de *Vicugna pacos*, los biomarcadores *Nanos2, Lin28, Ckit, Rplp0*y *Actb*; considerando siete biomarcadores positivos para SSC seleccionados (*Zbtb16, GFRα-1, Stra8, Nanos2, Ngn3, Lin28* y *Ecad*), tres biomarcadores negativos (*Ckit, Sohlh1* y *Sohlh2*) y tres genes de referencia (*RPLP0*, *GADPH* y *Actb*).

VIII.- RECOMENDACIONES

1.- Para asegurar la detección positiva de biomarcadores específicos de SSC de alpaca, se debe colectar por castración, testículos de machos con edades entre 6 a 12 meses, aislar las células madre espermatogoniales por digestión enzimática e inmediatamente proceder con la extracción de RNA a partir del paquete celular.

2.- Aislar y cultivar SSC de alpaca, estandarizando un sistema que permita y favorezca la proliferación de células individuales o troncales no comprometidas con la diferenciación, para que a partir de ellas se proceda con la extracción de RNA y la detección de los biomarcadores específicos de SSC. Esta segunda alternativa, de hecho, sería la más segura; pero demanda el manejo de otras metodologías y manejo de otras variables, tales como, selección del medio de cultivo, suplementación con suero fetal bovino, co-cultivo con células alimentadoras, adición de factores de crecimiento y hormonas, optimización de otros parámetros físicos como pH, temperatura y mezcla de gases en la incubadora de CO_2.

3.- Las alpacas macho pre púberes y púberes de 6 a 12 meses de edad, constituyen un grupo etario a tomarse en cuenta en la aplicación de biotecnologías reproductivas, teles como inseminación artificial y transferencia de embriones.

IX.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, M.; PUHAKKA, J.; RUETE, A.; AL-ESSAWE, E.; DE VERDIER, K.; MORRELL, J.; BÅGE, R. (2016). Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Vet Scand.* 58(10): 1-8.

ALVES, A. (2007). Biometria e morfologia testicular em bovinos da raça nelore criados a pasto. Universida de Estadual do Sudoeste da Bahia. Brasil.

AOKI, Y.; NAKAMURA, S.; ISHIKAWA, Y.; TANAKA, M. (2009). Expression and syntenic analyses of four nanos genes in medaka. *Zoolog. Sci*. 26: 112-118.

ARIAS, O. (2006). Caracterización de hatos de alpacas en tres comunidades del Distrito de Paras, Provincia de Cangallo, Región Ayacucho – 2004. Tesis-Maestría. Escuela de Posgrado. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú.

AL-ASMAR, N.; HERRERO, J.; INIESTA, I.; LIÑÁN, A; REYES, A.; VALLEJO, J. (2009). Células madre espermatogoniales en el contexto del nicho. www.mural.uv.es

BALLOW, D.; MEISTRICH, M.; MATZUK, M.; RAJKOVIC, A. (2006a). Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. *Dev. Biol.* 294: 161-167.

BALLOW, J.; XIN, Y.; CHOI, Y.; PANGAS, S.; RAJKOVIC, A. (2006b). Sohlh2 is a germ cell specific bHLH transcription factor. *Gene Expr. Patterns*. 6: 1014-1018.

BARKHUDAROVA, F.; DÄHNRICH, C.; ROSEMANN, A.; SCHNEIDER, U.; STÖCKER, W.; BURMESTER. G.; EGERER, K.; SCHLUMBERGER, W.; HIEPE, F.; BIESEN, R. (2011). Diagnostic value and clinical laboratory associations of antibodies against recombinant ribosomal P0, P1 and P2 proteins and their native heterocomplex in a Caucasian cohort with systemic *lupus erythematosus*. *Arthritis Res Ther*. 13(1): 1-11.

BARRIOS, F.; FILIPPONI, D.; PELLEGRINI, M.; PARONETTO, M.; DI SIENA, S.; GEREMIA, R.; ROSSI, P.; DE FELICI, M.; JANNINI, E.; DOLCI, S. (2010).Opposing effects of retinoic acid and FGF9 on Nanos2 expression and meiotic entry of mouse germ cells. *Journal of Cell Science.* 123: 871-880.

BATHRACHALAM, C.; LA MANNA, V.; RENIERI, C.; LA TERZA, A. (2011). *Asip* and *MCIR* cDNA polymorphism in alpaca. In: "Fibre production in South American camelids and other fibre animals". Wageningen Academic Publishers. Germany.

BELLVE, A.; CAVICCHIA, J.; MILLETTE, C.; O'BRIEN, D.; BHATNAGAR, Y.; DYM, M. (1977). Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization. *Journal of Cell Biology*. 74:68-85.

BRACK, A. (2004). Biodiversidad, Pobreza y Bionegocios. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo – PNUD. Lima.

BRAVO, P. (1995). Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. *Proceedings of Post Graduate Foundation in Veterinary Science.* 257: 61-66.

BUAAS, F.; KIRSH, A.; SHARMA, M.; MCLEAN, D.; MORRIS, J.; GRISWOLD, M. (2004). Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet.* 36: 647-52.

BUAGEAW, A.; SUKHWANI, M.; BEN-YEHUDAH, A.; EHMCKE, J.; RAWE, V.; PHOLPRAMOOL, C.; ORWIG, K.; SCHLATT, S. (2005). GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biol. Reprod.* 73: 1011-1016.

CLERMONT, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*. 52: 198-236.

CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.(1959). Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*. *Am J Anat.* 104: 237-271.

CLERMONT, Y.; ANTAR, M. (1973). Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides.Am J Anat.* 136: 153-165.

CORTEZ, J. (2011). Bipartición de embriones de *Vicugna pacos* "alpaca" producidos *in vitro* en diferentes etapas de desarrollo. Ayacucho, 2011. Tesis-Pregrado. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho-Perú.

COSTOYA, J.; HOBBS, R.; BARNA, M.; CATTORETTI, G.; MANOVA, K.; SUKHWANI, M. (2004). Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet.* 36: 653-659.

DE ROOIJ, D. (1998). Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Pathol.* 79: 67-80.

DE ROOIJ, D.; RUSSELL, L. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* . 21: 776-798.

DIRAMI, G.; RAVINDRANATH, N.; PURSEL, V.; DYM, M. (1999). Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. *Biology of Reproduction*. 61:225-230.

ERTL, C.; WROBEL, K. (1992). Distribution of sugar residues in the bovine testis during postnatal ontogenesis demonstrated with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *Histochemistry.* 97(2): 161-171.

EBATA, K.; YEH, J.; ZHANG, X.; NAGANO, M. (2008). The application of biomarkers of spermatogonial stem cells for restoring male fertility. *Disease Markers.* 24: 267–276.

FAN, R.; DONG, Y.; CAO, J.; BAI, R.; ZHU, Z.; LI, P.; ZHANG, J.; HE, X.; LU,L.; YAO, J.; MONDAL, L.; SMITH, G.; DONG, C. (2011). Gene expression profile in white alpaca (*Vicugna pacos*) skin. *Animal Reproduction Science*. 5(8): 1157-1161.

FAO. (1996). Manual de Prácticas de Manejo de Alpacas y Llamas. Estudio FAO producción y sanidad animal. Roma.

FERNÁNDEZ, S**.** (1991). Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. FAO. 420 pp.

GIULIANO, S.; MIRAGAYA, M. (2011). Biotecnologías reproductivas aplicadas en el macho de Camélidos Sudamericanos. En: "Producción y tecnología en Camélidos Sudamericanos". (Ruiz, J., editor). Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica-Perú.

GOEL, S.; REDDY, N.; SINGH R.; KUMAR, S.; MOHANCHANDRA, R. (2011). Spermatogonial stem cells in the testis of an endangered bovid: Indian black buck (*Antilope cervicapra* L.). *Animal Reproduction Science.* 126: 251-257.

GONZALES, G. (1992). Andrología Fertilidad e Infertilidad. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Instituto de Investigaciones de la Altura. Lima.

GONZALES, H. (2008). Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia.* X(10): 223-234.

GRISWOLD, M. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod.* 52(2): 211-216.

GUILLÉN, H. (2001). Evaluación de las características seminales en carneros Blackbelly. Tesis-Pregrado. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de Zootecnia. Lima.

HALL, J. (2011). Tratado de Fisiología Médica. Edit. Elsevier. 10mo. 2da. Edic. Barcelona-España.

HE, J.; DONGA, C.; YOUA, R.; ZHUA, Z.; LVA, L.; SMITH, G. (2009). Localization of epidermal growth factor (EGF) and its receptor (EGFR) during postnatal testis development in the alpaca (*Lama pacos*). *Animal Reproduction Science*.116: 155-161.

HERMANN, B; SUKHWANI, M.; SIMORANGKIR, D.; CHU, T.; PLANT, T.; ORWIG, K. (2009). Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in Rhesus macaques. *Human Reproduction*. 24(7): 1704–1716.

HUANCA, T. (1996). Manual del Alpaquero. Serie Manual Nº 1-96. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Proyecto Alpaca. INIA/COTESU. Puno.

HUANCA, W.; CORDERO, AÍDA; HUANCA, T.; ADAMS, G. (2007). Biotecnologías reproductivas en Camélidos Sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. *Arch Latinoam Prod Anim*. Vol. 15 (Supl. 1).

HUCKINS C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec.* 169: 533-557.

IMBERTY, A.; CASSET, F.; GEGG, C.; ETZLER, M.; PÉREZ, S. (1994). Molecular modelling of the *Dolichos biflorus* seed lectin and its specific interactions with carbohydrates: α-D-N-acetyl-galactosamine, Forssman

disaccharide and blood group A trisaccharide. *Glycoconjugate Journal.* 11: 400-413.

IZADYAR, F.; SPIERENBERG, G.; CREEMERS, L.; DEN OUDEN, K.; DE ROOIJ, D. (2002a). Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction.*124: 85–94.

IZADYAR, F.; RIJSENBILT, M.; DEN OUDEN, K.; CREEMERS, L.; WOELDERS, H.; DE ROOIJ, D. (2002b). Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *Journal of Andrology*. 23(4): 537-545.

IZADYAR, F.; DEN OUDEN, K.; CREEMERS, L.; POSTHUMA, G.; PARVINEN, M.; DE ROOIJ, D. (2003). Proliferation and Differentiation of Bovine Type A Spermatogonia During Long-Term Culture. *Biology of* Reproduction. 68: 272–281.

JIJIWA, M.; KAWAI, K.; FUKIHARA, J.; NAKAMURA, A.; HASEGAWA, M.; SUZUKI, C.; SATO, T.; ENOMOTO, A.; ASAI, N.; MURAKUMO, Y.; TAKAHASHI, M.(2008). GDNF-mediated signaling via RET tyrosine 1062 is essential for maintenance of spermatogonial stem cells. *Genes Cells.* 13: 365-374.

KIERSZENBAUM, A. (1994). Mammalian spermatogenesis *in vivo* and *in vitro*: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages, *Endocrine Reviews.* 15(1): 116-134.

KLISCH, K.; CONTRERAS, D.; SUN, X.; BREHM, R.; ALBERIO, R. (2011). The Sda/GM2-glycan is a carbohydrate marker of porcine primordial germ cells and of a subpopulation of spermatogonia in cattle, pigs, horses and llama. Reproduction. 142(5):667-74.

MASEK, T.; VOPALENSKY, V.; SUCHOMELOVA, P.; POSPISEK, M. (2004). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal. Biochem.* 336: 46-50.

MIRAGAYA, M.; CHÁVEZ, M.; AGÜERO, A. (2006). Reproductive biotechnology in South American Camelids. *Small Ruminant Research*. 61: 299-310.

MORE, B.; MANCHEGO, A.; SANDOVAL, N.; RAMÍREZ, M.; PEZO, D.; LAM, K.; RIVERA, H. (2011). Detección genómica y expresión de péptidos antimicrobianos (? - y ? -defensinas) en mucosa intestinal de crías de alpaca (V*icugna pacos*). *Rev. Inv. Vet. Perú.* 22 (4): 324-335.

MORENA, A.; BOITANI, C.; PESCE, M.; DE FELICI, M.; STEFANINI, M.(1996). Isolation of highly purified type A spermatogonia from prepubertal rat testis. *Journal of Andrology*. 17: 708-717.

MORTON, K.; VAUGHAN, J.; MAXWELL, C. (2008).Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. Australian Government. Rural Industries Research and Development Corporation. Sydney.

MUJICA, F. (2016). Evaluación biométrica testicular de alpacas para el aislamiento de células espermatogoniales. *Revista Investigación*. 24(1): 61-65.

OAKBERG, E. (1971). Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat Rec.* 169: 515-531.

OATLEY, J.; AVILA, D.; REEVES, J.; MCLEAN, D. (2004a). Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells. *Biol. Reprod.* 70**:** 625–631.

OATLEY, J.; REEVES, J.; MCLEAN, D. (2004b). Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during *in vitro* culture. *Biol. Reprod.* 71: 942–947.

OATLEY, J.; AVARBOCK, M.; TELARANTA, A.; FEARON, D.; BRINSTER, R. (2006). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*103: 9524-9529.

OULAD, M.; BOUILLET, P.; DECIMO, D.; GANSMULLER, A.; HEYBERGER, S.; DOLLE, P. (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *J Cell Biol*. 135: 469-77.

PRESCIUTTINI, S.; VALBONESI, A.; APAZA, N.; ANTONINI, M.; HUANCA, T.; RENIERI, C. (2010). Fleece variation in alpaca (*Vicugna pacos*): a two-locus model for the Suri/Huacaya phenotype. *BMC Genetics*. 11: 1-8.

REISLER, E.; EGELMAN, E. (2007). Actin structure and function: what we still do not understand. *J Biol Chem*. 282(50): 36133-7.

Ruíz, J. (2011). Biotecnologías reproductivas aplicadas en la hembra de Camélidos Sudamericanos. En: “Producción y Tecnología en Camélidos Sudamericanos”. (Ruiz, J., editor). Universidad Nacional de Huancavelica. Huancavelica-Perú.

RUÍZ, B.; RUÍZ, H.; MENDOZA, P.; OLIVA, M.; GUTIÉRREZ, F.; ROJAS, R. (2010). Caracterización reproductiva de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* y sus cruzas en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico mexicano. *Revista Científica UDO Agrícola.* 10 (1): 94-102.

RUSSELL, L.; ETTLIN, A.; HIKIM, S.; CLEGG, E. (1990). Histological and histopathological valuation of the testis. Cache River Press, Clearwater. 1-58.

SADA, A.; SUZUKI, A.; SUZUKI, H.; SAGA, Y. (2009). The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science*. 325: 1394-1398.

SCHRANS, B.; VAN DE KANT, H.; DE ROOIJ, D.; VAN PELT, A. (1999). Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology*. 140: 5894-5900.

SHEN, R.; XIE, T. (2009). NANOS: a germ line stem cell's guardian angel. *J. Mol. Cell Biol.* Doi:10.1093/jmcb/mjp043.

SIMORANGKIR, D.; MARSHALL, G.; EHMCKE, J. (2005). Prepubertal expansion of dark and pale type A spermatogonia in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) results from proliferation during infantile and juvenile development in a relatively gonadotropin independent manner. *Biol Reprod.* 73: 1109-1115.

SUMAR, J. (1983). Studies on reproductive pathology in alpacas. MSc Thesis. Upsala, Sweden: Swedish University of Agrarian Sciences, Department of Obstetric and Gynaecology, Veterinary Medicine Faculty.

SUMAR, J. (2000). Llamas y Alpacas. En: "Reproducción e Inseminación Artificial". (Hafez, E. y Hafez, B., editores). Séptima Edic. Edit. McGraw-Hill Interamericana. México, D.F.

SUZUKI, H.; WON, H.; CHU, T.; BOWDEN, W.; GASSEI, K.; ORWIG, K.; RAJKOVIC, A. (2012). SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation. *Developmental Biology.* 361: 301–312.

TEGELENBOSCH, R.; DE ROOIJ, D. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res*. 290:193-200.

TIAN, X.; JIANG, J.; FAN, R.; WANG, H.; MENG, X.; HE, X.; HE, J.; LI, H.;GENG, J.; YU, X.; SONG, Y.; ZHANG, D.; YAO, J.; SMITH, G.; DONG, C. (2012). Identification and characterization of microRNAs in white and brown alpaca skin. *BMC Genomics*. 13: 555-566.

TOKAS, J.; MUKHOPADHYAY, C.; VERMA, A. (2011). Self renewal of spermatogonial stem cells: the most promising multipotent cells - A review. *Veterinary World*. 4(5): 234-240.

TOYODA, S.; MIYAZAKI, T.; MIYAZAKI, S.; YOSHIMURA, T.; YAMAMOTO, M.; TASHIRO, F.; YAMATO, E.; MIYAZAKI, J. (2009). Sohlh2 affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia. *Dev. Biol.* 325: 238-248.

VAN DISSEL, F.; DE ROOIJ, D.; MEISTRICH, M. (1989). Isolation of rat gonocytes by velocity sedimentation at unit gravity. *J Reprod Fert.* 86: 759-766.

VAN PELT, A.; MORENA, A. VAN DISSEL, F.; BOITANI, C.; GAEMERS, I.; DE ROOIJ, D.; STEFANINI, M. (1996). Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biology of Reproduction*.55: 439-444.

WHEELER, J. (2006). Informe final. INCAGRO. Proyecto identificación y rescate de alpacas genéticamente puras de la amenaza de extinción. Lima.

YINGZHONG, Y.; DROMA, Y.; GUOEN, J.; ZHENZHONG, B.; LAN, M.; HAIXI, Y.; YUE, C.; KUBO, K.; RILI, G. (2007). Molecular cloning of Hemoglobin alpha-chain gene from *Pantholops hodgsonii*, a hypoxic tolerance species. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 40(3): 426-431.

YOSHIDA, S. (2010). Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Develop. Growth. Differ.*52: 311–317.

YOSHIDA, S.; TAKAKURA, A.; OHBO, K.; ABE, K.; WAKABAYASHI, J.; YAMAMOTO, M.; SUDA, T.; NABESHIMA, Y. (2004). Neurogenin3 delineates the earliest stages of spermatogenesis in the mouse testis. *Dev. Biol.* 269: 447-458.

ZHENG, K.; WU, X.; KAESTNER, K.; WANG, P.(2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC Dev. Biol.* 9: 38.

ZHUA, Z.;HE, J.; JIA, X.; JIANG, J.; BAI, R.; YU, X.; LV, L.; FAN, R.; HE, X.; GENG, J.; YOU, R.; DONG, Y.; QIAO, D.; LEE, K.; SMITH, G.; DONGA, C. (2010). MicroRNA-25 functions in regulation of pigmentation by targeting the transcription factor MITF in alpaca (*Lama pacos*) skin melanocytes. *Domestic Animal Endocrinology*. 38: 200-209.

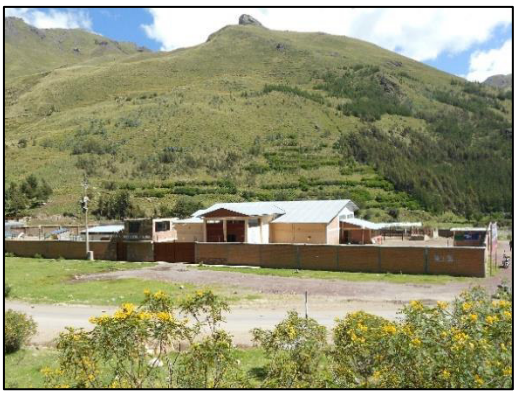
X.- ANEXOS

Anexo 1. Procedencia de los testículos de alpacas de 10-12 meses de edad y de 18-20 meses de edad, colectados por castración, en estancias alpaqueras de las regiones de Ayacucho y Huancavelica.

Región de Ayacucho		
Provincia	Distrito	Estancias alpaqueras
Cangallo	Chuschi	Pampawasi-Huaqraccocha
	Paras	Santa Fe, Anccolla, Licapa-Paccha, Licapa-Chiricmachay, Licapa-Acchimachay
Huamanga	Vinchos	Minas Corral-Tropa Apan
Región de Huancavelica		
Provincia	Distrito	Estancias alpaqueras
Huaytará	Pilpichaca	Llillinta, Tacsana

Anexo 2. Instalaciones del Camal Municipal de Huancavelica.









Anexo 3. Análisis de varianza y Prueba de Tukey de la biometría testicular de alpacas.

ANOVA de un solo factor: Peso (g) vs. Edad (meses)

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	α = 0.05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Edad (meses)	4	10-12, 18-20, 24-36, 36-más

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad (meses)	3	3012	1004.11	122.15	0.000
Error	174	1430	8.22		
Total	177	4443			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2.86709	67.80%	67.25%	66.38%

Medias

Edad (meses)	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
10-12	54	0.7287	0.3764	(-0.0414, 1.4988)
18-20	30	3.9407	0.4815	(2.9075, 4.9738)
24-36	46	8.728	4.286	(7.893, 9.562)
36-más	48	10.660	3.541	(9.843, 11.477)

Desv.Est. agrupada = 2.86709

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Edad (meses)	N	Media	Agrupación
36-más	48	10.660	A
24-36	46	8.728	B
18-20	30	3.9407	C
10-12	54	0.7287	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Longitud (cm) vs. Edad (meses)

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	α = 0.05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Edad (meses)	4	10-12, 18-20, 24-36, 36-más

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad (meses)	3	118.79	39.5969	160.52	0.000
Error	174	42.92	0.2467		
Total	177	161.71			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.496672	73.46%	73.00%	72.26%

Medias

Edad (meses)	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
10-12	54	1.3148	0.2437	(1.1814, 1.4482)
18-20	30	2.0690	0.2928	(1.8900, 2.2480)
24-36	46	2.947	0.706	(2.802, 3.091)
36-más	48	3.2917	0.5628	(3.1502, 3.4332)

Desv.Est. agrupada = 0.496672

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Edad (meses)	N	Media	Agrupación
36-más	48	3.2917	A
24-36	46	2.947	B
18-20	30	2.0690	C
10-12	54	1.3148	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Ancho (cm) vs. Edad (meses)

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	α = 0.05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Edad (meses)	4	10-12, 18-20, 24-36, 36-más

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad (meses)	3	57.92	19.3058	171.05	0.000
Error	174	19.64	0.1129		
Total	177	77.56			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.335952	74.68%	74.24%	73.56%

Medias

Edad (meses)	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
10-12	54	0.8444	0.1621	(0.7542, 0.9347)
18-20	30	1.2200	0.1277	(1.0989, 1.3411)
24-36	46	1.9450	0.4780	(1.8472, 2.0428)
36-más	48	2.2052	0.3992	(2.1095, 2.3009)

Desv.Est. agrupada = 0.335952

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Edad (meses)	N	Media	Agrupación
36-más	48	2.2052	A
24-36	46	1.9450	B
18-20	30	1.2200	C
10-12	54	0.8444	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Circunf. (cm) vs. Edad (meses)

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia	α = 0.05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Edad (meses)	4	10-12, 18-20, 24-36, 36-más

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Edad (meses)	3	470.5	156.837	192.14	0.000
Error	174	142.0	0.816		
Total	177	612.5			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.903485	76.81%	76.41%	75.75%

Medias

Edad (meses)	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
10-12	54	2.9389	0.4977	(2.6962, 3.1816)
18-20	30	4.678	0.622	(4.353, 5.004)
24-36	46	6.298	1.351	(6.035, 6.561)
36-más	48	6.853	0.871	(6.596, 7.111)

Desv.Est. agrupada = 0.903485

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Edad (meses)	N	Media	Agrupación
36-más	48	6.853	A
24-36	46	6.298	B
18-20	30	4.678	C
10-12	54	2.9389	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Volumen (cc) vs. Edad (meses)

```
Método

Hipótesis nula          Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna       Por lo menos una media es diferente
Nivel de significancia  α = 0.05

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor        Niveles  Valores
Edad (meses)        4  10-12, 18-20, 24-36, 36-más

Análisis de Varianza

Fuente         GL  SC Ajust.  MC Ajust.  Valor F  Valor p
Edad (meses)    3     1360.7    453.564   126.08    0.000
Error         174      626.0      3.598
Total         177     1986.7

Resumen del modelo
                     R-cuad.  R-cuad.
      S  R-cuad.  (ajustado)   (pred)
1.89672   68.49%      67.95%   67.09%

Medias

Edad
(meses)   N   Media  Desv.Est.      IC de 95%
10-12    54  1.1870     0.3919  (0.6776, 1.6964)
18-20    30   2.676      0.610  ( 1.993,  3.360)
24-36    46   6.309      2.764  ( 5.757,  6.861)
36-más   48   7.785      2.367  ( 7.244,  8.325)

Desv.Est. agrupada = 1.89672
```

Comparaciones en parejas de Tukey

```
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Edad
(meses)   N   Media  Agrupación
36-más   48   7.785  A
24-36    46   6.309    B
18-20    30   2.676      C
10-12    54  1.1870        D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.
```

Anexo 4. Estadísticos descriptivos de la biometría testicular de alpacas.

Variable	Edad (meses)	Media	Desv.Est.	Varianza	Coef.Var	Mínimo	Máximo	Rango
Peso (g)	10-12 (n=54)	0.73	0.38	0.14	51.65	0.16	1.57	1.41
	18-20 (n=30)	3.94	0.48	0.23	12.22	3.21	4.95	1.74
	24-36 (n=46)	8.73	4.29	18.37	49.11	1.60	15.28	13.68
	36-más (n=48)	10.66	3.54	12.54	33.22	2.90	17.24	14.34
Longitud (cm)	10-12 (n=54)	1.31	0.24	0.06	18.54	0.80	1.90	1.10
	18-20 (n=30)	2.07	0.29	0.09	14.15	1.40	2.50	1.10
	24-36 (n=46)	2.95	0.71	0.50	23.94	1.10	4.05	2.95
	36-más (n=48)	3.29	0.56	0.32	17.10	2.00	4.10	2.10
Ancho (cm)	10-12 (n=54)	0.84	0.16	0.03	19.20	0.50	1.20	0.70
	18-20 (n=30)	1.22	0.13	0.02	10.47	0.95	1.40	0.45
	24-36 (n=46)	1.95	0.48	0.23	24.57	1.10	2.70	1.60
	36-más (n=48)	2.21	0.40	0.16	18.10	1.40	2.90	1.50
Circunf. (cm)	10-12 (n=54)	2.94	0.50	0.25	16.93	2.00	4.20	2.20
	18-20 (n=30)	4.68	0.62	0.39	13.29	3.20	5.60	2.40
	24-36 (n=46)	6.30	1.35	1.82	21.44	3.60	8.20	4.60
	36-más (n=48)	6.85	0.87	0.76	12.70	4.90	8.40	3.50
Volumen (cc)	10-12 (n=54)	1.19	0.39	0.15	33.02	0.42	2.39	1.97
	18-20 (n=30)	2.68	0.61	0.37	22.78	1.47	3.67	2.20
	24-36 (n=46)	6.31	2.76	7.64	43.80	1.38	11.45	10.07
	36-más (n=48)	7.79	2.37	5.60	30.41	2.93	11.73	8.80

Anexo 5. Análisis de Kruskal-Wallis de la viabilidad durante el aislamiento de espermatogonias de alpaca.

Estadísticas descriptivas

Edad (meses)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
10-12	28	92.1538	75.3	2.15
24-36	35	80.0000	51.9	-2.05
36-más	35	80.3571	52.1	-2.02
6-8	26	90.3846	76.9	2.29
General	124		62.5	

Prueba

Hipótesis nula	H_0: Todas las medianas son iguales
Hipótesis alterna	H_1: Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	3	13.67	0.003
Ajustado para empates	3	13.70	0.003

Means

	Viabilidad	rank	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
1	87.14962	76.86538	12.388553	26	54.55	100.00	77.8575	90.385	99.6625
2	85.08036	75.33929	16.854646	28	38.46	100.00	75.5700	92.155	100.0000
3	79.27486	51.92857	10.201269	35	42.31	96.15	75.0000	80.000	84.3900
4	79.69171	52.12857	7.805312	35	57.33	93.62	75.7200	80.360	84.5450

Comparison

	Difference	pvalue	Signif.	LCL	UCL
1 - 2	1.526099	1.0000		-23.50946322	26.56166
1 - 3	24.936813	0.0346	*	1.13717373	48.73645
1 - 4	24.736813	0.0370	*	0.93717373	48.53645
2 - 3	23.410714	0.0483	*	0.10387435	46.71755
2 - 4	23.210714	0.0516	.	-0.09612565	46.51755
3 - 4	-0.200000	1.0000		-22.17389942	21.77390

Anexo 6. Análisis de Kruskal-Wallis del rendimiento durante el aislamiento de espermatogonias de alpaca.

Estadísticas descriptivas

Edad (meses)	N	Mediana	Clasificación de medias	Valor Z
10-12	28	52000000	75.2	2.13
24-36	35	32000000	52.4	-1.96
36-más	35	37000000	67.8	1.03
6-8	26	30500000	55.3	-1.16
General	124		62.5	

Prueba

Hipótesis nula	H_0: Todas las medianas son iguales
Hipótesis alterna	H_1: Al menos una mediana es diferente

Método	GL	Valor H	Valor p
No ajustado para empates	3	8.09	0.044
Ajustado para empates	3	8.10	0.044

Means

	Rendimiento	rank	std	r	Min	Max	Q25	Q50	Q75
1	38423077	55.25000	24244048	26	1.6e+07	1.06e+08	22000000	30500000	48750000
2	54964286	75.21429	34341943	28	1.0e+07	1.24e+08	25750000	52000000	78250000
3	33457143	52.40000	15345708	35	1.0e+07	7.50e+07	19000000	32000000	42500000
4	44542857	67.81429	25131821	35	1.8e+07	1.28e+08	29000000	37000000	47500000

Comparison

	Difference	pvalue	Signif.	LCL	UCL
1 - 2	-19.96429	0.2352		-45.652509	5.723937
1 - 3	2.85000	1.0000		-21.570081	27.270081
1 - 4	-12.56429	1.0000		-36.984366	11.855795
2 - 3	22.81429	0.0704	.	-1.100148	46.728720
2 - 4	7.40000	1.0000		-16.514434	31.314434
3 - 4	-15.41429	0.4147		-37.961030	7.132459

Anexo 7. Base de datos sobre viabilidad y rendimiento de espermatogonias aisladas de alpacas de 6-8 meses de edad.

Viabilidad y rendimiento de espermatogonias (6-8 meses; n=26)

Aislamiento	Vivas	Muertas	Total	Viabilidad (%)	Rendimiento (Esperm/ ml)
1	73	1	74	98.65	74'000,000
2	23	2	25	92.00	25'000,000
3	36	13	49	73.47	49'000,000
4	32	3	35	91.43	35'000,000
5	81	25	106	76.42	106'000,000
6	70	2	72	97.22	72'000,000
7	14	3	17	82.35	17'000,000
8	27	3	30	90.00	30'000,000
9	11	6	17	64.71	17'000,000
10	16	0	16	100.00	16'000,000
11	16	5	21	76.19	21'000,000
12	16	0	16	100.00	16'000,000
13	22	0	22	100.00	22'000,000
14	16	0	16	100.00	16'000,000
15	22	0	22	100.00	22'000,000
16	25	0	25	100.00	25'000,000
17	22	0	22	100.00	22'000,000
18	59	6	65	90.77	65'000,000
19	72	13	85	84.71	85'000,000
20	24	7	31	77.42	31'000,000
21	12	10	22	54.55	22'000,000
22	25	9	34	73.53	34'000,000
23	38	10	48	79.17	48'000,000
24	33	6	39	84.62	39'000,000
25	49	7	56	87.50	56'000,000
26	31	3	34	91.18	34'000,000

Anexo 8. Base de datos sobre viabilidad y rendimiento de espermatogonias aisladas de alpacas de 10-12 meses de edad.

Viabilidad y rendimiento de espermatogonias (10-12 meses; n=28)

Aislamiento	Vivas	Muertas	Total	Viabilidad (%)	Rendimiento (X 10_6)
1	21	9	30	70.00	30000000
2	72	5	77	93.51	77000000
3	24	8	32	75.00	32000000
4	23	2	25	92.00	25000000
5	53	4	57	92.98	57000000
6	78	4	82	95.12	82000000
7	51	1	52	98.08	52000000
8	76	9	85	89.41	85000000
9	48	6	54	88.89	54000000
10	124	0	124	100.00	124000000
11	115	0	115	100.00	115000000
12	105	0	105	100.00	105000000
13	46	18	64	71.88	64000000
14	20	18	38	52.63	38000000
15	10	16	26	38.46	26000000
16	75	24	99	75.76	99000000
17	30	24	54	55.56	54000000
18	96	21	117	82.05	117000000
19	20	0	20	100.00	20000000
20	15	0	15	100.00	15000000
21	10	0	10	100.00	10000000
22	37	3	40	92.50	40000000
23	17	3	20	85.00	20000000
24	10	0	10	100.00	10000000
25	44	28	72	61.11	72000000
26	48	4	52	92.31	52000000
27	32	8	40	80.00	40000000
28	24	0	24	100.00	24000000

Anexo 9. Base de datos sobre viabilidad y rendimiento de espermatogonias aisladas de alpacas de 24-36 meses de edad.

Viabilidad y rendimiento de espermatogonias (24-36meses; n=30)

Aislamiento	Vivas	Muertas	Total	Viabilidad (%)	Rendimiento (X 10_6)
1	35	12	47	74.47	47000000
2	24	5	29	82.76	29000000
3	25	5	30	83.33	30000000
4	69	6	75	92.00	75000000
5	24	6	30	80.00	30000000
6	36	12	48	75.00	48000000
7	14	14	28	50.00	28000000
8	10	2	12	83.33	12000000
9	36	12	48	75.00	48000000
10	12	3	15	80.00	15000000
11	13	1	14	92.86	14000000
12	13	3	16	81.25	16000000
13	14	4	18	77.78	18000000
14	42	15	57	73.68	57000000
15	47	8	55	85.45	55000000
16	50	2	52	96.15	52000000
17	33	5	38	86.84	38000000
18	26	7	33	78.79	33000000
19	23	6	29	79.31	29000000
20	27	10	37	72.97	37000000
21	31	6	37	83.78	37000000
22	24	8	32	75.00	32000000
23	11	15	26	42.31	26000000
24	8	2	10	80.00	10000000
25	17	2	19	89.47	19000000
26	14	3	17	82.35	17000000
27	14	5	19	73.68	19000000
28	26	10	36	72.22	36000000
29	30	9	39	76.92	39000000
30	34	11	45	75.56	45000000
31	22	5	27	81.48	27000000
32	15	3	18	83.33	18000000
33	31	5	36	86.11	36000000
34	51	8	59	86.44	59000000
35	34	6	40	85.00	40000000

Anexo 10. Base de datos sobre viabilidad y rendimiento de espermatogonias aisladas de alpacas de 36 meses de edad a más.

Viabilidad y rendimiento de espermatogonias (mayor 36meses; n=35)

Aislamiento	Vivas	Muertas	Total	Viabilidad (%)	Rendimiento (X 10_6)
1	32	5	37	86.49	37000000
2	17	4	21	80.95	21000000
3	25	5	30	83.33	30000000
4	34	11	45	75.56	45000000
5	36	11	47	76.60	47000000
6	26	11	37	70.27	37000000
7	38	13	51	74.51	51000000
8	18	13	31	58.06	31000000
9	21	7	28	75.00	28000000
10	27	8	35	77.14	35000000
11	26	4	30	86.67	30000000
12	16	6	22	72.73	22000000
13	21	5	26	80.77	26000000
14	28	9	37	75.68	37000000
15	35	6	41	85.37	41000000
16	44	3	47	93.62	47000000
17	51	15	66	77.27	66000000
18	84	21	105	80.00	105000000
19	43	32	75	57.33	75000000
20	83	20	103	80.58	103000000
21	107	21	128	83.59	128000000
22	35	12	47	74.47	47000000
23	41	7	48	85.42	48000000
24	36	8	44	81.82	44000000
25	22	2	24	91.67	24000000
26	31	5	36	86.11	36000000
27	17	2	19	89.47	19000000
28	16	5	21	76.19	21000000
29	15	3	18	83.33	18000000
30	36	4	40	90.00	40000000
31	20	5	25	80.00	25000000
32	45	11	56	80.36	56000000
33	50	13	63	79.37	63000000
34	25	8	33	75.76	33000000
35	36	7	43	83.72	43000000

Anexo 11. Secuencias de los primers diseñados y sintetizados para los biomarcadores de SSC seleccionados para *Vicugna pacos*.

(A)Biomarcadores positivos.

Nº	Gen	Fordward (5'→3')	Código	Reverse (5'→3')	Código
1	*Gfrα-1*	GCGCATCTACTGGAGCATGTA TGCCACCACCACCACAGCCTT CCCGTGTACCACCAGCATGTC ACCGCTTGGACTGTGTGAAAG	GFRa1.F1 GFRa1.F2 GFRa1.F3 GFRa1.F4	TGAATGGGACCACTCGGAATA CCCGACATATTGGATTTCAG AGCAGAAGAGCATCCCGTAG CCCGAGGTCAGGCTGAAGTTG	GFRa1.R1 GFRa1.R2 GFRa1.R3 GFRa1.R4
2	*Nanos2*	GTGTCCCATCCTGCGGCACT	Nanos2.F1	TGCGGCGGTAGAGAGACTGCT	Nanos2.R1
3	*Ngn3*	GACGACGCGAAGCTCACCAA AAGAAAGCCAACGACCGTGAG AAAGTGACCTGCGTCGCATCC	Ngn3.F1 Ngn3.F2 Ngn3.F3	AGAGGCTGTGGTCCGCTATGC GCAGCGTCTCGATCTTGGTGA CCGGTTCCGTCTCTGCTTGCT	Ngn3.R1 Ngn3.R2 Ngn3.R3
4	*Zbtb16*	GTGATCAGTGTGGTGCCCAGT AGGAGAGCGGGTATGCCAGTG GGGCGTGCGCAGCTACATCT	Zbtb16.F1 Zbtb16.F2 Zbtb16.F3	CCGCACAGCAGACAGAAGAC GCCGCCTTGGTGGGACTCAT TTCGTACGGGTGGTCGCCTGT	Zbtb16.R1 Zbtb16.R2 Zbtb16.R3
5	*Stra8*	GGAGGACGGGAATGCAAACAG	Stra8.F1	GGAACAGGAAGGGCAGCAACT	Stra8.R1
6	*E-Caderina*	TCAAACGGCCTTTACAACTTC	E.Cad.F1	GCCCTGGTGCCTTCAGCGTCA	E.Cad.R1
7	*Lin28*	GAAGCGCAGATCAAAGGGAGA CGGCATCTGTAAGTGGTTCAA	Lin28.F1 Lin28.F2	GCTGGGCCTTCAATGGACAC CTCCTGAAGCCCTCCATGTGA	Lin28.R1 Lin28.R2

(B) Biomarcadores negativos.

Nº	Gen	Fordward (5'→3')	Código	REVERSE (5'→3')	Código
1	*Ckit*	CGGCTTCAGCACTTCCACCTA CGGCTTCAGCACTTCCACCTA	Ckit.F1 Ckit.F2	GTCAGAGGACAGCGGACCAG CCGGTCAGGGAGTAATGGGTC	Ckit.R1 Ckit.R2
2	*Sohlh1*	GAGCGAAGAGCCTCTGA TCGGGTCTGGCTAAGGCCCC ACTCAGCGAGAGGGAGCGCA CGCTGGACGCCAGGTCTGTG	Sohlh1.F1 Sohlh1.F2 Sohlh1.F3 Sohlh1.F4	CTTCTACATCACATCCCGACAC CATCGAACCGGGGCAGCAGG CAGCCAGCCGGAGGAACTGC GAAGCCTGGCTCTGCCCTGC	Sohlh1.R1 Sohlh1.R2 Sohlh1.R3 Sohlh1.R4
3	*Sohlh2*	GAGGCAACGGTCGATTATGTG GGCCAGATTACAGAAGCACT	Sohlh2.F1 Sohlh2.F2	GGGCATCTGTTGTTTCTTACA TCCCTTTGTGCCATGATCGTG	Sohlh2.R1 Sohlh2.R2

(C) Genes de referencia.

Nº	Gen	Fordward (5'→3')	Código	Reverse (5'→3')	Código
1	*Rplp0*	GCCACACATCCGGGGGAACG ATGCGCAAGGCCATCCGAGG CGGTGCCATAGCCCCGTGTG	RPLP0.F1 RPLP0.F2 RPLP0.F3	GACCAGTGTTCTGGGCGGGC GGCGGCAGCTGGCACCTTAT GTGGCTTCGCTGGCTCCCAC	RPLP0.R1 RPLP0.R2 RPLP0.R3
2	*Gadph*	AAACCTGCCAAATATGACGAC CCTGCCAAATATGACGACATC	GADPH.F1 GADPH.F2	ACAACCTGGTCCTCCGTGTAG GACAACCTGGTCCTCCGTGTA	GADPH.R1 GADPH.R2
3	*Actb*	CGGGACCTGACGGACTACCTC GAGCGGGAAATTGTGCGTGAC GCGGGAAATTGTGCGTGACAT TCATCACCATCGGCAATGAG CGTGCTGCTGACTGAGGCCC	ACT.F1 ACT.F2 ACT.F3 ACT.F4 ACT.F5	TGGCCATCTCCTGCTCGAAGT GAAGCGCTCATTGCCGATGG GAAGCGCTCATTGCCGATGG GTTGAAGGTAGTCTCGTGGATG AGGGACAGCACGGCCTGGAT	ACTB.R1 ACTB.R2 ACTB.R3 ACTB.R4 ACTB.R5