

## Índice de fragmentación del ADN espermático de alpacas (*Vicugna pacos*) utilizando la prueba de dispersión de la cromatina espermática

### Sperm DNA fragmentation index of alpaca (*Vicugna pacos*) using the sperm chromatin dispersion test

Nancy Huanca<sup>1,2</sup>, César Ordoñez<sup>1</sup>, Enrique Ampuero<sup>1</sup>, Hernán Cucho<sup>1</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue analizar la fragmentación del ADN espermático en espermatozoides de alpaca recuperados de la desviación de los conductos deferentes (DCD), así como de los colectados por electroeyaculación (EE) y mediante poscópula (PC). El semen fue colectado de tres machos por método en tres oportunidades por animal. Se evaluó el volumen, movilidad, concentración, vitalidad, funcionalidad de la membrana espermática e índice de fragmentación de ADN espermático. Las variables microscópicas se evaluaron con el Integrated Semen Analysis System - ISAS®; el índice de fragmentación de ADN espermático (IFAE) se determinó por el método de la dispersión de la cromatina (SCD). Los datos del IFAE fueron analizados mediante un diseño de bloques completamente al azar. Se encontró un IFAE de  $36.44 \pm 22.50\%$  en el método de DCD y de  $13.65 \pm 18.98\%$  y  $8.42 \pm 10.28\%$  para espermatozoides colectados por EE y PC, siendo estos dos últimos superiores ( $p < 0.05$ ) al método de DCD. Se encontró menor porcentaje de índice de fragmentación de ADN espermático en semen colectado mediante de poscópula y electroeyaculación.

**Palabra clave:** alpaca, ADN fragmentado, SCD, colección seminal

#### ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the DNA fragmentation in alpaca spermatozoa recovered from the vas deferens deviation (VDD), as well as those collected by electroejaculation (EE) and by post-copula (PC). The sperm was collected from three

<sup>1</sup> Escuela Profesional de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco, Perú

<sup>2</sup> E-mail: frineehm92@gmail.com

Recibido: 25 de junio de 2019

Aceptado para publicación: 30 de abril de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

males per method and three times per animal. Volume, motility, concentration, vitality, functionality of the spermatid membrane and sperm DNA fragmentation index were evaluated. Microscopic variables were evaluated with the Integrated Semen Analysis System - ISAS®; the sperm DNA fragmentation index (DFI) was determined by the chromatin dispersion method (VDD). The DFI data was analysed using a completely randomized block design. An DFI of  $36.44 \pm 22.50\%$  was found in the VDD method and  $13.65 \pm 18.98\%$  and  $8.42 \pm 10.28\%$  for sperm collected by EE and PC, the latter two being superior ( $p < 0.05$ ) to the VDD method. A lower percentage of sperm DNA fragmentation was found in semen collected by post-copulation and electroejaculation.

**Key words:** alpaca, DNA fragmentation, SCD, semen collection

## INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos tienen características seminales particulares, tales como semen filante y viscoso, escaso volumen, baja concentración espermática y ausencia de movilidad progresiva (Miragaya *et al.*, 2008). Por otro lado, las características de calidad habituales evaluadas en el semen, como volumen, concentración, movilidad, vitalidad, morfología y funcionalidad de la membrana plasmática no necesariamente reflejan la calidad del ADN espermático (Carretero *et al.*, 2012a, 2017), ni revelan alteraciones a nivel de la estructura de la cromatina en el ADN espermático (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007); de allí la importancia de considerar la evaluación del ADN espermático dentro de las valoraciones seminales de rutina (Tomsu *et al.*, 2002; Agarwal y Allamaneni, 2004).

La integridad del ADN espermático se le considera como un factor importante en la fertilidad del macho, pues es determinante tanto para el éxito en la fecundación, como para el desarrollo normal del embrión y del feto (Berenguer *et al.*, 2008; Gonsálvez *et al.*, 2008; Sakkas y Alvarez, 2010). Las anomalías en el material genético pueden expresarse por defectos en la maduración o condensación nuclear, rupturas del ADN y anomalías cromosómicas (Carretero *et al.*, 2017).

Se conocen algunos factores que pueden causar daño irreversible en el ADN del gameto, ya sea de origen intrínseco o extrínseco, que ocurren durante el proceso de espermatogénesis o en el transporte a través del tracto reproductivo. Entre estas se encuentran la apoptosis durante el proceso de espermatogénesis, empaquetamiento anormal de la cromatina, deficiencias en la recombinación del material genético, fragmentación de ADN pos-testicular, episodios de fiebre alta, enfermedades inflamatorias, y daños inducidos por radioterapias, quimioterapias o agentes tóxicos (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2007; Sakkas y Alvarez, 2010).

La defensa de los espermatozoides contra el daño de su material genético se sostiene básicamente por la sustitución de histonas por protaminas que producen una súper condensación de la cromatina y estabilizan el ADN covalentemente por enlaces intra e intermoleculares de disulfuro (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). En el semen de bovino se ha indicado que la inmadurez en los espermatozoides los hace más propensos a la degradación del ADN por la criopreservación (Mukhopadhyay *et al.*, 2011). Así, el objetivo de este estudio fue determinar y comparar el índice de fragmentación del ADN espermático de alpacas (*Vicugna pacos*) colectados por tres métodos (electroejaculación, desviación del conducto deferente y poscópula), utilizando la técnica de la dispersión de la cromatina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de Estudio y Animales

El estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya, de la Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. La zona se encuentra a 4133 msnm. Se utilizaron nueve alpacas macho adultos de 6-8 años, con peso inicial de  $69.1 \pm 9.8$  kg, criados sobre praderas naturales.

### Colección de Semen

Se utilizaron tres animales por método de colecta y se realizaron tres colectas por cada animal entre enero y abril. Para la recuperación de los espermatozoides de los conductos deferentes (DCD), se utilizó 0.3 ml de base Tris (Souza, 2009) en viales de 2 ml, siguiendo el procedimiento descrito por Meza *et al.* (2018). La colección de semen mediante electroeyaculación (EE) fue de acuerdo a la técnica descrita por Director *et al.* (2007) y modificada para este especie, utilizando anestesia general. La colección de semen por el método de poscópula (PC) fue según la técnica descrita por García *et al.* (2017). En todos los casos, las muestras fueron inmediatamente conservadas a 37 °C. Los eyaculados con concentraciones de espermatozoides menores a  $25 \times 10^6$ /ml, con presencia de orina, o de eyaculación parcial fueron excluidos del estudio.

### Evaluación de Semen

La movilidad total (móviles progresivos y móviles no progresivos), y la concentración se evaluaron en el ISAS® (Proiser R+D, Paterna, España), que incluye un microscopio de contraste de fase UOP – UB200i, con un objetivo de contraste de fase negativo de 10x (Meza *et al.*, 2018), y una video cámara (Ximea MQ003MG-CM; Ximea, Alemania).

La vitalidad se determinó mediante fluorescencia, usando el kit VitalTest® (Halotech, España) siguiendo las especificaciones del fabricante, capturando no menos de 200 espermatozoides por muestra. La funcionalidad de la membrana espermática se evaluó mediante la prueba hipoosmótica (50 mOsm/kg), contándose no menos de 200 espermatozoides por muestra. En estas dos últimas pruebas, se empleó el objetivo 40X del sistema ISAS®.

### Índice de Fragmentación de ADN Espermático

La fragmentación del ADN espermático se analizó con el test de la dispersión de la cromatina espermática - SCD (Fernández *et al.*, 2003), empleando el kit Halomax® ram (Halotech, España) (Gonsálvez *et al.*, 2008). Publicaciones sobre la técnica se han descrito tanto para el caso de humanos como para animales (Fernández *et al.*, 2005; Enciso *et al.*, 2006; Cortes-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Los portaobjetos con las muestras fueron teñidos con Diff Quik (6 min con Diff Quik I [Eosina] y 6 min con Diff Quik II [azul de metileno]), y 6 min con la tinción Wrigth. Luego fueron lavados con agua destilada, dejándose a secar a temperatura ambiente. El daño del ADN se determinó utilizando un microscopio de campo claro con objetivo de 40X, en el módulo de fragmentación de ADN del ISAS®. Se tomaron fotogramas de no menos de 300 espermatozoides por muestra (Figura 1). Los espermatozoides con ADN fragmentado presentan un gran halo de difusión de los fragmentos de cromatina, mientras que aquellos que no están afectados no presentan halo de bucles de cromatina, o este es de tamaño muy reducido y compacto (Posado, 2014; Carretero *et al.*, 2012a; Gonsálvez *et al.*, 2008). El control positivo para SCD se obtuvo exponiendo espermatozoides de alpaca a una temperatura de 80 °C por 5 minutos, consiguiendo 86% de espermatozoides fragmentados o dañados.

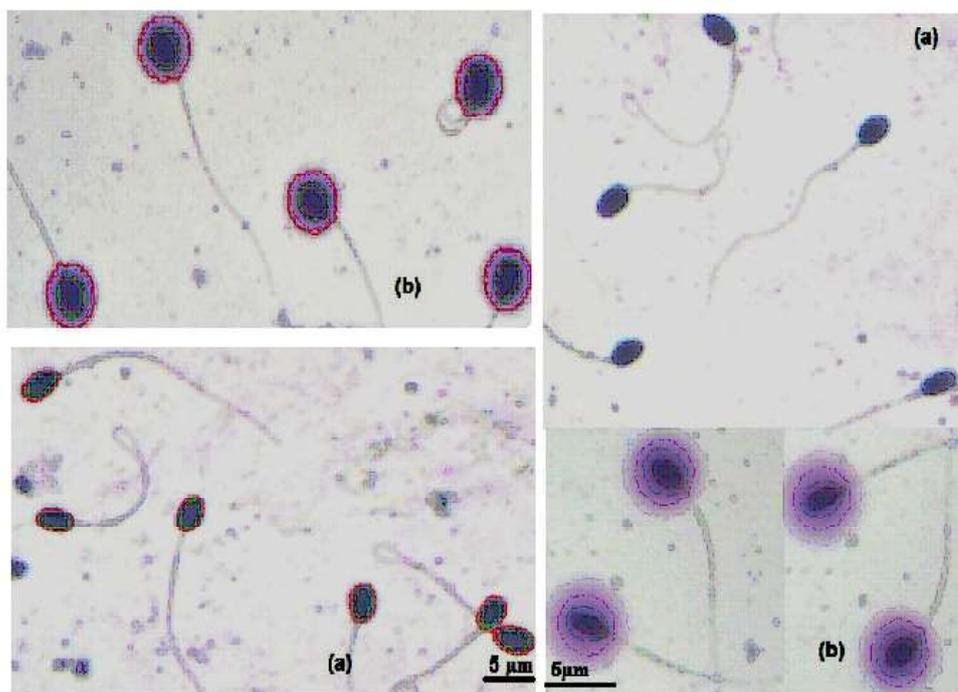


Figura 1. Espermatozoides de alpaca con ADN intacto (a) y con ADN fragmentado (b). Coloración Diff Quik y Wright (Barra de escala = 5 µm)

### Análisis Estadístico

Se obtuvo estadística descriptiva del volumen, movilidad, vitalidad, concentración y funcionalidad de la membrana espermática. El índice de fragmentación de ADN espermático se analizó con un diseño de bloques al azar, previo análisis de normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) y de homogeneidad de varianzas (test de Levene). Para los cálculos estadísticos se utilizó el SAS v. 8.2.

### RESULTADOS

Los resultados de las evaluaciones de las nueve muestras de semen colectadas por método de colecta se muestran en el Cuadro 1 y el porcentaje del índice de fragmentación de ADN espermático en el Cuadro 2. Los espermatozoides colectados por electroe-

yacuación y poscópula presentaron menor porcentaje de índice de fragmentación de ADN espermático con relación a los espermatozoides recuperados del conducto deferente ( $p < 0.05$ ). El esperma colectado del conducto deferente no contiene plasma seminal y los espermatozoides probablemente no han completado su maduración.

### DISCUSIÓN

Los resultados de la evaluación de los parámetros seminales de rutina de los tres métodos de colección fueron similares a los descritos en espermatozoides recuperados del conducto deferente por Meza *et al.* (2018) y Quispe (2015) en semen colectado pos-cópula por Alarcón *et al.* (2012) y en semen colectado por electroeyacuación por Ordoñez *et al.* (2013) y Ciprian (2019) en alpacas.

Cuadro 1. Características macroscópicas y microscópicas de semen de alpaca<sup>1</sup> colectado por electroeyaculación (EE), desviación del conducto deferente (DCD) y poscópula (PC)

| Variable  | DCD          | EE           | PC           |
|---|--------------|--------------|--------------|
|   | Promedio± DS | Promedio± DS | Promedio± DS |
| Volumen (ml)                                      | 0.03 ± 0.02  | 1.22 ± 0.51  | 2.80 ± 2.12  |
| Movilidad total (%)                               | 16.3 ± 12.0  | 14.7 ± 11.2  | 12.4 ± 7.3   |
| Concentración espermática (x 10 <sup>6</sup> /ml) | 247 ± 187    | 67.9 ± 67.9  | 100.3 ± 56.1 |
| Vitalidad (%)                                     | 62.9 ± 15.9  | 63.0 ± 15.2  | 70.2 ± 14.3  |
| Funcionalidad de la membrana espermática (%)      | 57.6 ± 8.9   | 50.4 ± 12.5  | 60.8 ± 15.5  |

<sup>1</sup> Tres machos por método y tres colecciones por macho

Cuadro 2. Porcentaje de fragmentación de ADN espermático de muestras seminales<sup>1</sup> de alpacas obtenidas mediante tres métodos de colección

|                                   | Media              | D.E:  | C.V (%) | Mínimo | Máximo |
|-----------------------------------|--------------------|-------|---------|--------|--------|
| Desviación del conducto deferente | 36.44 <sup>a</sup> | 22.50 | 61.75   | 0      | 62.61  |
| Electroeyaculación                | 13.65 <sup>b</sup> | 18.98 | 139.08  | 0      | 62.30  |
| Poscópula                         | 8.42 <sup>b</sup>  | 10.28 | 122.09  | 0      | 30.09  |

<sup>a,b</sup> Letras diferentes dentro de medias indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

<sup>1</sup> Tres machos por método y tres colecciones por macho

La integridad del ADN de los espermatozoides es importante para el desarrollo normal del embrión y del feto. La fragmentación del ADN se ve influenciada en gran parte por la susceptibilidad al daño de los espermatozoides producto del shock por frío (Salazar, 2013). En el presente estudio, tras exponer el semen a temperaturas altas se obtuvo mayor porcentaje de degradación de ADN espermático; por lo tanto, en camélidos sudamericanos, este es otro factor que aumenta el índice de fragmentación de ADN espermático (Carretero *et al*, 2012a). Así

mismo, el método de colecta afectó la calidad de las muestras de semen en el presente estudio. La velocidad de degradación de ADN espermático varía entre especies y método de colecta, siendo muy elevada para el caso de oveja, medio para el caso del humano y el caballo y baja en el caso del toro (Lorences, 2010).

Los espermatozoides recuperados del conducto deferente carecen de plasma seminal, que es un componente que juega un rol importante en la conservación de los

espermatozoides, ya que contiene una proteína secretora rica en cisteína (CRISP3), que ha sido asociada positivamente con la tasa de concepción (Novak *et al.*, 2010), además de diversos componentes que actúan como antioxidantes (Villa *et al.*, 2012). Así mismo, Pizarro *et al.* (2013) señala que el plasma seminal mantiene menores niveles de peroxidación lipídica de los espermatozoides; es decir, menos estrés oxidativo de la muestra. En consecuencia, los espermatozoides recuperados del conducto deferente, al carecer de plasma seminal, presentan una mayor degradación de ADN espermático frente a los otros dos métodos de colecta.

No se tienen reportes sobre la fragmentación del ADN espermático con el método de SCD en espermatozoides de alpacas recuperados del conducto deferente y de semen colectado por poscópula; sin embargo, Carretero *et al.* (2015) reportó en llamas 19.2% de espermatozoides fragmentados con este método en semen colectado por electroeyaculación, valor superior al hallado en este estudio por el mismo método de obtención de semen.

## CONCLUSIÓN

El método de colecta afecta la calidad seminal en camélidos sudamericanos. La obtención de semen por los métodos de poscópula y electroeyaculación muestran un menor porcentaje de ADN fragmentado en comparación con los recuperados del conducto deferente

## LITERATURA CITADA

1. **Alarcón V, García W, Bravo W. 2012.** Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev Inv Vet Perú* 23: 58-64. doi: 10.15381/rivep.v23i1.882
2. **Agarwal A, Allamaneni SS. 2004.** The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva Ginecol* 56: 235-245.
3. **Berenguer JG, Peregrín PC, López-Fernández C, Fernández JL, Calonge RN. 2008.** Fragmentación del ADN espermático. *Rev Int Androl* 6: 193-209. doi: 10.1016/S1698-031X(08)76145-4
4. **Carretero MI, Giuliano MS, Neild DM. 2017.** Evaluación de la calidad de ADN espermático en camélidos sudamericanos y otras especies domésticos. *Spermova* 7: 18-26.
5. **Carretero MI, Lombardo D, Arraztoa CC, Giuliano SM, Gambarotta MC, Neild DM. 2012a.** Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Anim Reprod Sci* 131: 63-71. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.02.008
6. **Carretero MI, Giuliano SM, Casaretto CI, Gambarotta MC, Neild DM. 2012b.** Evaluation of the effect of cooling and the addition of collagenase on llama sperm DNA using toluidine blue. *Andrología* 44: 239-247. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.01170.x
7. **Ciprian R. 2019.** Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Ingeniero Zootecnista. Cusco, Perú: Univ. Nacional de San Antonio Abad del Cusco. 118 p.
8. **Cortés-Gutiérrez EI, Crespo F, Gosálvez A, Dávila-Rodríguez MI, López-Fernández C, Gosalvez J. 2008:** DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leónés, a breed at risk of extinction. *Theriogenology* 69: 1022-1032. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.02.002
9. **Cortés-Gutiérrez EI, López-Fernández C, Fernández JL, Gosálvez J. 2007.** Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urol Esp* 31: 120-131.

10. **Director A, Giuliano S, Trasorras V, Carretero I, Pinto M, Miragaya M. 2007.** Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *J Camel Pract Res* 14: 203-206.
11. **Enciso M, López-Fernández C, Fernández JL, García P, Gosálvez J. 2006.** A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology* 65: 308-316. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.044
12. **Fernández JL, Muriel L, Goyanes V, Segrelles E, Gosálvez J, Enciso M, Lafromboise M, et al. 2005.** Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion (SCD) test. *Fertil Steril* 84: 833-842. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.11.089
13. **Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Alvarez JG. 2003.** The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl* 24: 59-66. doi: 10.1002/j.1939-4640.2003.tb02641.x
14. **García W, Alarcón V, Bravo W. 2017.** Inseminación artificial de alpacas con semen refrigerado y con inclusión de dos tipos de yema de huevo. *Rev Inv Vet Perú* 28: 337-344. doi: 10.15381/rivep.v28i2.13080
15. **Gonsálvez J, Vázquez M, Enciso MJ, Fernández L, Gosálbez AJ, Bridle R, López-Fernández C. 2008.** Sperm DNA fragmentation in rams vaccinated with miloxan. *Open Vet Sci J* 2: 7-10. doi: 10.2174/1874318800802010007
16. **Lorences ME. 2010.** La fragmentación del ADN en espermatozoides de mamíferos. Tesis Doctoral. Madrid, España: Univ. Autónoma de Madrid. 410 p.
17. **Meza A, Caldeira C, Ordonez C, Valverde A, Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H, et al. 2018.** Sperm kinematic characterization of alpaca (*Vicugna pacos*) during the reproductive season. *Reprod Domest Anim* 53: 1415-1423. doi: 10.1111/rda.13284
18. **Miragaya MM, Martínez-Sarrasague M, Casaretto E, Rubin de Celis I, Carretero MI, Giuliano S. 2008.** Assessment of apparent viscosity and analysis of rheological profiles in llama ejaculates. In: XVI International Congress on Animal Reproduction (ICAR). Budapest, Hungary.
19. **Mukhopadhyay CA, Gupta B, Yadav J, Chauhan A, Gupta T, Mohanty V, Raina. 2011.** Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. *Livest Sci* 136: 114-121. doi: 10.1016/j.livsci.2010.08.010
20. **Novak S, Smith TA, Paradis F, Burwash L, Dyck MK, Foxcroft GR, Dixon WT. 2010.** Biomarkers of *in vivo* fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology* 74: 956-967. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2010.04.025
21. **Ordóñez C, Ampuero E, Cucho H, Franco E. 2012.** Avances en la determinación de la velocidad del espermatozoide de alpaca en semen diluido usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). *Spermova* 2: 63-64.
22. **Ordoñez C, Cucho H, Ampuero E, Antezana W, Cayo S. 2013.** Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. *Spermova* 3: 65-66.
23. **Pizarro E, Restrepo G, Echeverry J, Rojano B. 2013.** Efecto del plasma seminal sobre el estado redox del semen de equino criopreservado. *Rev MVZ Córdoba* 18: 3672-3680.
24. **Posado R. 2014.** Estudio de la calidad seminal del toro de lidia fragmentación del ADN espermático. Tesis Doctoral. Madrid, España: Univ. Complutense de Madrid. 233 p.
25. **Quispe A. 2015.** Funcionalidad de la membrana espermática en semen de alpaca (*Vicugna pacos*) colectado por desviación de conducto deferente. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Cusco, Perú:

- Univ. Nacional de San Antonio Abad del Cusco. 106 p.
26. **Sakkas D, Alvarez J. 2010.** Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 93: 1027-1036. doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.10.046
  27. **Salazar K. 2013.** Análisis de fragmentación del ADN espermático de semen equino criopreservado en presencia de compuestos hipometabolizantes y la relación de este parámetro con el índice de preñez obtenido con el uso de dos diluyentes. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia, Chile: Univ. Austral de Chile. 37 p.
  28. **Souza T. 2009.** Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) adultos. Tesis de Maestría. Viçosa, Brasil: Universidad Federal de Viçosa. 81 p.
  29. **Tomsu M, Sharma V, Miller D. 2002.** Embryo quality and IVR treatment outcomes may correlate with different sperm comet assay parameters. *Hum Reprod* 17: 1856-1862.
  30. **Villa N, Castaño D, Duque P, Ceballos A. 2012.** Actividad de la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa en sangre y plasma seminal en caballos colombianos. *Rev Colomb Cienc Pec* 25: 64-70.