



**Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**“LA IMPORTANCIA DE LAS PROTAMINAS EN EL
PROCESO DE COMPACTACIÓN NUCLEAR
ESPERMÁTICA”**

**Trabajo de investigación para optar por el grado académico de:
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Presentado por:

OLENKA MENDIETA VARAS

Lima – Perú

2019

ACTA DE SUSTENTACIÓN/APROBACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE BACHILLER

Lima, 14 de febrero de 2020.

Los integrantes del Jurado evaluador del trabajo de investigación:

Presidente: Dra. BERTHA ISABEL TUPAC YUPANQUI SAGASTEGUI
Miembro: Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE

Se reúnen para evaluar el trabajo de investigación de Bachiller:

"LA IMPORTANCIA DE LAS PROTAMINAS EN EL PROCESO DE COMPACTACIÓN NUCLEAR ESPERMÁTICA"

Presentada por el(la) estudiante:

- **OLENKA SOFIA MENDIETA VARAS**

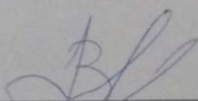
Para optar al grado de Bachiller en: **MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

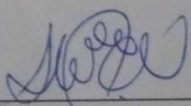
Asesorada por: **Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS**

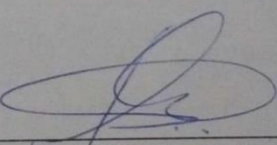
Luego de haber evaluado el informe final del trabajo de investigación de Bachiller, concluyen de manera unánime (X) por mayoría simple () calificar a:

Tesis: <i>Olenka Sofia Mendieta Varas</i>	Nota (en letras): <i>Dieciocho</i>		
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (X)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado/comité firman en señal de conformidad.


Dra. BERTHA ISABEL TUPAC YUPANQUI SAGASTEGUI
 Presidente(a) del Jurado


Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS
 Asesor(a)


Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE
 Miembro

ÍNDICE

1. Introducción	4
2. Reproducción en alpacas en Perú.....	6
3. Compactación del ADN espermático y su importancia.....	8
3.1 Protaminas... ..	9
3.1.1 Función de la protamina en la compactación del ADN espermático.....	11
3.1.2 Protaminas e infertilidad	13
4. Técnicas de evaluación de la compactación nuclear espermática	15
4.1 Directa	
4.2.1 Cromomicina A3.....	16
4.2 Indirecta	
4.1.1 Azul de Toluidina	17
4.1.2. TUNEL.....	18
4.1.3 Cometa	19
4.1.4. SCSA.....	20
5. Conclusión.....	25
6. Bibliografía	26

1. INTRODUCCIÓN

Las alpacas son una especie representativa del Perú con alto potencial productivo basado en la finura de su fibra y calidad de su carne (MINAGRI, 2015). Sin embargo, aún es reducida la aplicación de biotecnologías, lo cual afecta el mejoramiento genético de la especie, y a su vez, significa un retraso para la producción y rentabilidad de los pequeños y medianos productores (Huanca, 2007). Por tal motivo, es importante el estudio de pruebas de fertilidad que permitan la elección y cruzamiento de hembras y machos de alta calidad genética; para lo cual, se necesita analizar estructuras específicas contenidas en los gametos de ambos sexos. Una de estas es una proteína denominada protamina, la cual se encuentra adherida al ADN espermático y es la principal responsable de la compactación nuclear de esta célula. Las protaminas aparecen durante la espermiogénesis para reemplazar a las histonas, que se encontraban unidas al ADN formando nucleosomas. Al adherirse las protaminas, se dará la formación de una cromatina espermática hipercondensada que protegerá al genoma (Oliva, 2006).

Para el estudio directo de las protaminas, se ha validado en múltiples especies la prueba de Cromomicina A3. Este fluorocromo compite con las protaminas por los mismos espacios en el núcleo espermático, permitiendo visualizar mayor o menor fluorescencia en una célula, de acuerdo a la cantidad de protaminas presentes. La evaluación de los resultados se realiza empleando microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Por otro lado, existen pruebas indirectas como: como TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling test), SCSA (Sperm chromatin structure assay), ensayo de Azul de Toluidina (AT) y COMETA (single cell gel electrophoresis assay) que determinan el correcto funcionamiento o estructuración de la cromatina donde uno de los factores influyentes es la presencia o ausencia de protaminas unidas al ADN nuclear espermático (Alvarez, Arellano & Pérez, 2015).

Por todo lo mencionado anteriormente, el objetivo de esta monografía es conocer la importancia de la protamina en el proceso de compactación nuclear espermática en alpacas, informando acerca de su función y las técnicas de evaluación directas e indirectas que existen.

2. REPRODUCCIÓN DE ALPACAS EN EL PERÚ

El manejo reproductivo de los animales de producción suele depender de ciertos factores como la alimentación, ambiente, adaptación a condiciones climáticas, densidad poblacional, entre otros (Cebra, Anderson, Tibary, & Van Saun, 2014). En el caso de las alpacas, estos son animales bien adaptados a condiciones climáticas desafiantes como las del altiplano peruano y a épocas de carencia de pastos; sin embargo, existen ciertas características que aún dificultan el manejo reproductivo de las mismas. Los machos completan la pubertad, en promedio a los 2 años de edad y las hembras al año, sin embargo, estas dependerán de su condición corporal y peso vivo (Hafez E.S, 2000). En el caso específico de los camélidos, es importante verificar el desprendimiento de la adherencia prepucial (Franco, Pezo, García, & Franco, 2009). Ésta impide el correcto desvaine y penetración del macho hacia la hembra, por lo que su liberación indica que se encuentra listo para ser empleado en la monta. Este proceso ocurre entre los 2 y 3 años de edad, en la mayoría de los reproductores. Además, la cópula dura entre 15 a 45 minutos y será el estímulo del coito y otros factores los que permitirán la ovulación en la hembra. La gestación tarda aproximadamente 340 días, limitando a las hembras a producir solo una cría por año (Aller, 2015), y su supervivencia se verá afectada por la época del año en la que nazca y al suficiente desarrollo de inmunidad que logre. Estas implicancias del ciclo reproductivo de las alpacas conllevan a severas fallas en el manejo reproductivo, reflejándose en la tasa de natalidad que se mantiene por debajo del 50 por ciento (Huanca, Cordero, Huanca, & Adams, 2007).

Los pequeños y medianos productores representan más del 75% de la crianza de alpacas y el sistema de apareamiento que suelen implementar es el empadre libre o tradicional. Este es realizado al azar, sin tomar en cuenta color o características de la fibra. Los pequeños criadores suelen mantener a los animales en un mismo corral, sin distinguir edades ni sexo, lo que da oportunidad a empadres durante todo el año pero sin ningún tipo de control ni registro. Sin

embargo, existen medianos y algunos pequeños productores que mantienen a las hembras y machos en corrales separados y, durante el empadre reparten los machos en proporción de 5-6% respecto a las hembras, permaneciendo en el mismo corral durante 45 a 60 días (FAO, 2005). Si bien esto aporta mayor control sobre el empadre, la carencia de registros hace que este sistema genere altos niveles de consanguinidad y, en consecuencia, un 15 a 20% de malformaciones genéticas y tasas elevada de mortalidad (Torres, Lencinas, & Cáceres, 2011). Se ha reportado que otra desventaja del sistema tradicional donde no se separan los animales, es la reducción del lívido o inhibición de actividad sexual de los machos que conviven con las mismas hembras (Torres, 2014).

Los grandes productores o centros de investigación representan menos del 20% de criadores alpaqueros y emplean como sistema de apareamiento el empadre aleatorio. Este se realiza en los meses de enero a marzo, donde las pasturas se encuentran en abundancia y mejores condiciones (Huanca *et al.*, 2007). Durante diciembre, se seleccionan los mejores machos del grupo y las hembras vacías, se preparan las instalaciones y se separan a las hembras seleccionadas en un potrero cercano al área de empadre. Solo el 10 por ciento de los machos del plantel son seleccionados, escogiendo reproductores que cumplan las características de alta calidad que busca el productor (Abraham *et al.*, 2016; Incahuancho, 2018). En algunos casos, se realiza colecta de semen empleando vagina artificial para realizar un espermograma y determinar la calidad de la muestra espermática del macho. Sin embargo, esta prueba requiere herramientas de laboratorio, un área donde procesar la muestra, mayores técnicas de manejo y mano de obra; por tal motivo, son pocos los centros de crianza donde realmente se realiza. Y, pese a que el espermograma revela las características de la muestra espermática, se ha comprobado que no siempre define la capacidad fecundante del macho (Castillo, Simon de Mateo, Lewis, & Oliva, 2011; Fernando & Echeverri, 2007). Durante el empadre aleatorio, es importante tomar en cuenta que un macho puede realizar dos montas en un mismo día, tanto

en la mañana como en la tarde. Al día siguiente se debe repetir la misma monta entre los mismos ejemplares. Esta repetición se realiza debido a que, las alpacas ovularán 24 a 36 horas post monta; motivo por el cual, los ganaderos prefieren asegurar la fecundación realizando dos montas en días consecutivos (Rodríguez, 2011). Una vez realizada la jornada de empadre, se diagnosticará gestación con un macho calentador a los 15 días, tiempo en que demoraría el cuerpo lúteo en regresionar, en caso no existiera preñez (Hafez E.S, 2000). Se sabrá que una hembra ha quedado preñada, cuando rechaza al macho y no adquiere posición de monta. Este tipo de empadre es el que mejores resultados brinda para llevar un correcto registro de reproductores y conocer que machos poseen potencial de fertilidad y cuáles no. Sin embargo, mayores estudios sobre métodos de evaluación espermática en alpacas podrían facilitar la obtención de esta información y reducir la cantidad de tiempo que toma adquirirla (Aguilar & Torres, 2015).

3. COMPACTACIÓN DEL ADN NUCLEAR ESPERMÁTICO Y SU IMPORTANCIA

Las espermatogonias son las células germinales que inician una replicación mitótica para llegar a formar células espermáticas y así, completar el proceso denominado espermatogénesis (Champroux, Torres- Carreira, Gharagozloo, Drevet, & Kocer, 2016). Estas son células diploides que se encuentran en la lámina basal de los túbulos seminíferos del parénquima testicular. Existen dos tipos de espermatogonias, de acuerdo al tipo de cromatina, tipo A y B, pero son las células tipo B las que ingresan al proceso de mitosis (Nishimura & L'Hernault, 2017). La meiosis servirá para obtener múltiples espermatogonias que entrarán a la fase dos del proceso, la fase meiótica. Durante la meiosis, las espermatogonias tipo B darán lugar a espermatocitos primarios y secundarios; posteriormente, los espermatocitos secundarios realizarán una segunda meiosis y se convertirán en espermátidas, las cuales poseen carga genética haploide (Bergmann, 2006). Finalmente, se dará a inicio a la etapa de la

espermiogénesis, donde las espermátidas se convertirán en espermatozoides móviles con capacidad fecundante. Hasta esta etapa, la cromatina espermática se encuentra organizada en nucleosomas, los cuales son estructuras conformadas por octámeros de ADN e histonas (Ward, 2018). Las histonas son proteínas especializadas cargadas positivamente que poseen afinidad por la carga negativa de la doble hélice del ADN, lo cual permite el superenrollamiento del ADN y su correcta organización (Annunziato, 2008) (Figura 1).

El proceso de espermiogénesis consta de cuatro etapas: Golgi, Capuchón, acrosómica y de maduración (Cheng & Mruk, 2011). Durante la fase de capuchón se da la condensación nuclear espermática, el ADN espermático se compactará hasta reducirse al 10% del volumen del ADN de una célula somática (Annunziato, 2008; Simon, Castillo, Oliva, & Lewis, 2011). El proceso inicia cuando las histonas de las espermátidas son hiperacetiladas. En el hombre, esta hiperacetilación que sufren las histonas consta de una secuencia de fosforilación en distintos residuos de histonas que manera tal que, permanece durante todo el intercambio de histonas a protaminas (Balhorn, 2011). La hiperacetilación; por un lado, disminuye la interacción ADN-histona y por otro, proteínas de bromodominio (Brdt) reconocen los sitios de hiperacetilación, se unen, e inducen la condensación de cromatina independiente de ATP. En este momento, llegarán las proteínas de transición TP1, TP2 y TP4 para reemplazar a las histonas. TP1 y TP2 darán inicio a la condensación del núcleo en dirección de apical a caudal (Vásquez Cavero, 2012) . La primera desestabilizará los nucleosomas para evitar el enrollamiento del ADN; mientras que, TP2 se unirá, a través de sus terminaciones de zinc, a las islas CpG, las cuales son secuencias ricas en guanina y citosina presentes en la región genética 5' - 3', y dará inicio a la condensación de la cromatina. Asimismo, ambas proteínas de transición facilitan la reparación de ADN fragmentado. Cuando las 3 proteínas han completado el reemplazo, la cromatina se encontrará uniformemente condensada y los nucleosomas habrán desaparecido. Este grupo de proteínas serán luego reemplazadas por

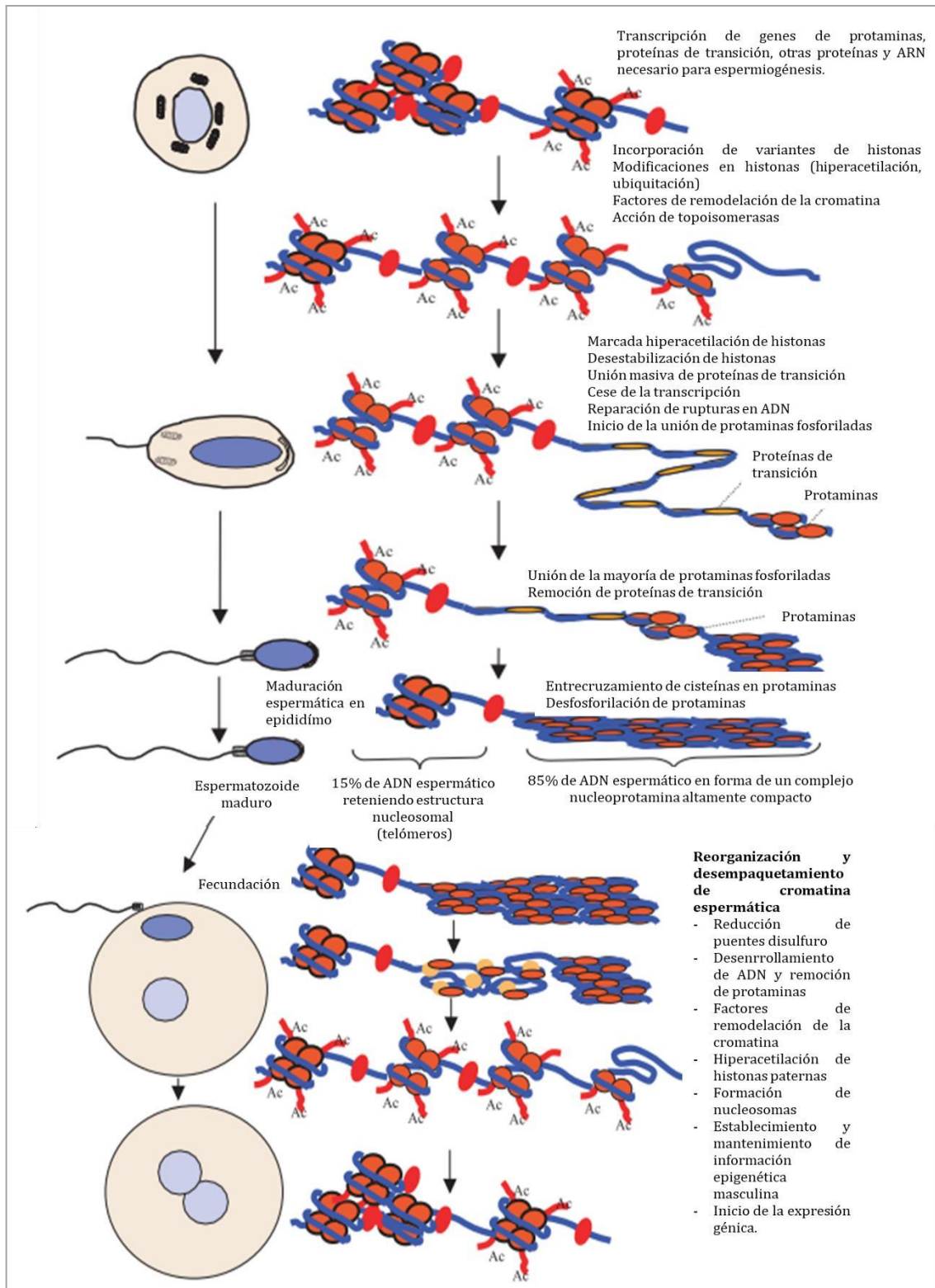


Figura 1. Esquema de los cambios que sufre la cromatina durante la transición de complejo nucleohistonas a nucleoprotamina en el proceso de espermiogénesis y el posterior desempaquetamiento de la unión ADN-protaminas y reconstitución de ADN+histonas en la fecundación para el inicio de la expresión génica.

FUENTE: Oliva, 2016

otras, llamadas protaminas, las cuales reorganizarán, una última vez, la cromatina espermática, permitiendo su total compactación (Oliva, 2006).

3.1 PROTAMINA

Las protaminas (Prms) fueron descubiertas hace más de cien años por el científico Friedrich Miescher (Frehlick & Ausio, 2007). Estas son proteínas pequeñas compuestas de 50-110 aminoácidos, que contienen más de 70% de arginina y alrededor de 10% de cisteína (Miller *et al*, 2010). Según teorías, aparecieron como resultado de una mutación en un gen ancestral de H1. Estas se encuentran presentes en los espermatozoides de todos los mamíferos. Los genes que codifican estas proteínas (*prm*) son expresados a la vez en las espermátidas redondas y los ARNm correspondientes, estos son almacenados e inactivados por 10 días hasta la fase de elongación. Las protaminas serán fosforiladas luego de la traducción del ARNm, proceso que es necesario inicialmente para la unión al ADN; sin embargo, dicha fosforilación es luego removida, incrementando la afinidad con el material genético y permitiendo mayor compactación (Balhorn, 2007; Hutchison, Rau, & DeRouche, 2017).

Existen dos tipos de protaminas en la cromatina espermática: protamina 1 (P1) y protamina 2 (P2) (Annunziato, 2008; Aoki & Carrell, 2003; Balhorn, 2007; Oliva, 2006). La primera se encuentra presente en todos los tipos de mamíferos existentes, mientras que la segunda ha sido evidenciada en primates, roedores, lagomorfos y perisodáctilos (Balhorn, 2011). En el resto de especies, solo se ha encontrado P1; sin embargo, en algunos como el verraco, se encuentra presente como una proteína disfuncional o aberrante. En el caso del toro, se creía que no poseía dicha protamina, sin embargo, un estudio reciente determinó la presencia de P2 en

espermatozoides epididimarios de toro (Hamilton *et al.*, 2019). P1 es una proteína de aproximadamente 50 aminoácidos que presenta 3 elementos: uno es una serie de dominios de anclaje ricos en arginina o lisina que se emplean en la adherencia al ADN, el segundo es un grupo de múltiples residuos de serina y threonina que se usan como sitios de fosforilación. Y, el tercero es un grupo de residuos de cisteína que se oxidan para dar lugar a puentes disulfuro que unen a las protaminas y dan estabilidad a la cromatina en las últimas etapas de la maduración espermática. La P2 comparte alrededor del 70% de la secuencia de P1 pero tiene mayor longitud. En el caso de los lagomorfos, probócidos y perisodáctilos se ha demostrado la existencia de dos tipos de P2: un precursor y una forma procesada. Además, P2 es capaz de unirse a un átomo de zinc por molécula. Si bien P2 posee características que parecen beneficiar al proceso, no se han encontrado mamíferos en los que solo se exprese P2, por lo que, se plantea que la condensación nuclear no será concretada sin la presencia de P1 (Steger & Balhorn, 2018).

3.1.1. Función de la protamina en la compactación del ADN espermático

Se han adjudicado múltiples funciones a las protaminas; sin embargo, la principal y totalmente comprobada es que la síntesis y adherencia de las protaminas a la cromatina nuclear espermática se relaciona positivamente con la condensación del genoma durante la elongación de la espermátida y la concomitante terminación de transcripción. Esto se da gracias a que las protaminas neutralizan la carga negativa de la cadena de enlaces fosfodiéster del ADN, esto a su vez, permite que las moléculas adyacentes al material genético

se agrupan de manera uniforme. Dicho proceso ocurre cuando la P1 envuelve a la doble cadena del ADN, esta interacción cubre determinado número de pares de base y genera que el ADN se curve en una conformación única. Luego, la presencia de diversos residuos de cisteína en las protaminas permitirá la formación de puentes disulfuro como paso inicial para estabilizar la unión de P1 y el ADN. Posteriormente, esta interacción provoca que las fibras de ADN adyacentes se junten e incrementen la compactación (Aoki & Carrell, 2003). De esta manera, se formarán estructuras denominadas toroides que serán las primeras estructuras de organización de la cromatina espermática madura (Chan, Orzylowska, Corselli, Jacobson, & Wei, 2015). En el caso de P2, esta actuará a través sus residuos de cisteína unidos a un átomo de zinc. El zinc participa en las últimas etapas de la condensación nuclear brindando protección a los grupos tiol de las protaminas, previniendo la oxidación y limitando la formación de puentes disulfuro inter e intra protamina (Pradeepa & Rao, 2007). Es decir, existe un equilibrio entre los residuos de cisteína de la P1 que forman parte de puentes disulfuro y los residuos de cisteína de P2 que actúan como quelantes del zinc para evitar la formación de puentes disulfuro (Balhorn, 2007). De esta manera, niveles elevados de zinc reducirán la formación de puentes y por lo tanto, se formará una cromatina menos compacta y, por el contrario, ante la deficiencia de zinc, se obtendrá una compactación mucho más densa.

Otra función de las protaminas se da durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo, donde las protaminas son encajadas por la formación de la red de puentes disulfuro y esto permitirá bloquear determinados genes de las espermátidas y reprogramar el genoma del macho para el inicio en

el desarrollo embrionario (Miller *et al.*, 2010). De esta manera evitará que, al llegar a la fecundación, el gameto siga funcionando como una célula testicular. Por otro lado, de manera indirecta, la formación de una cromatina hipercondensada en un volumen que representa la vigésima parte de una célula somática, permite la formación de una cabeza más hidrodinámica. Se ha demostrado que espermatozoides con una cabeza más hidrodinámica, se moverá más rápido dentro del útero. Por otro lado, las protaminas protegen el genoma al hacerlo inaccesible para nucleasas o mutágenos que podrían estar presentes dentro o fuera del organismo del macho (Oliva, 2006).

Otras de las funciones que se han atribuido a las protaminas, pero que no están directamente relacionadas con la compactación nuclear, es la remoción de factores de transcripción y otras proteínas de las espermátidas para generar un patrón genómico paterno con puntos epigénéticos que permitan su reprogramación por el ovocito, posterior a la fecundación. Asimismo, se sugiere su desempeño en la impresión del genoma paterno durante la espermatogénesis, e inclusive, las protaminas como tal pueden representar lugares o marcas epigénéticas en determinadas áreas del genoma, afectando su reactivación luego de la fecundación (Balhorn, 2007; Oliva, 2006; Torregrosa *et al.*, 2006).

3.1.2. Protaminas e infertilidad:

En humanos, el 30% de los problemas de concepción en parejas son por un factor de infertilidad masculina (Brugo-olmedo, Chillik, & Kopelman, 2003). Por este motivo, se han realizado múltiples estudios a cerca de la relación que tienen las protaminas con problemas de fertilidad en el hombre. En el caso de

las alpacas, el MINAGRI (2017) reporta un 45% de natalidad; sin embargo, no se ha logrado determinar si el factor principal es la capacidad fecundante de los machos, dado que, una limitante son los pocos registros y control que llevan los pequeños criadores. No obstante, en los últimos años, se ha buscado implementar técnicas de evaluación de las características espermáticas con la finalidad de aplicar biotecnologías como Fecundación *in vitro* (FIV) y otras en esta especie (Incahuancho, 2018; Rodríguez, 2011). En este caso, se busca establecer la relación que tienen las protaminas con la infertilidad del macho o del hombre. Los primeros reportes se dan en la década de los 90, donde se publican estudios como el de Khara (1997) que si bien concluyó que el ratio P1/P2 no estaba relacionado a infertilidad masculina, dio paso a mayores estudios que demostraron lo contrario. Vicent *et al* (2006) evaluó la relación de la proporción P1/P2 con problemas de fertilidad y resultados posteriores de FIV e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) en el mayor número de pacientes con ratio anormal de P1/P2 hasta ese momento, obteniendo como resultados que aquellos pacientes con bajo ratio P1/P2 mostraban bajos porcentajes de motilidad, concentración y morfología normal de la cabeza; esto podría referirse a un defecto en las últimas etapas de espermiogénesis donde se da la traducción y modificaciones post traduccionales de las protaminas. Además, pacientes con bajo ratio P1/P2 obtuvieron bajas tasas de fertilidad con FIV pero tasas normales con ICSI. Esto revela que una expresión génica anómala de protaminas se relaciona con las primeras etapas de la fecundación como la capacitación espermática, reacción acrosomal o penetración de la zona pelúcida, etapas de las cuales se prescinde en ICSI, a diferencia de FIV (Simon *et al.*, 2011). Como conclusión, mostraron que existe una relación significativa entre el ratio de protamina 1 y protamina 2 con la capacidad fertilizante que

tienen las células espermáticas. Por otro lado, es importante determinar cuál podría ser la causa de esta deficiencia de protaminación en determinados individuos. Algunos autores indican que mutaciones en los genes que expresan protaminas serían una de las principales razones para la escasa protaminación en estos individuos (Nayeri, Reza, Mehdi, Morteza, & Tabibnejad, 2018; Ravel *et al.*, 2007). Otra de las razones pueden ser una prematura traducción de P1 lo que conlleva a irregularidades en la condensación del núcleo espermático. Por otro lado, se ha determinado que ratios p1/p2 anormales pueden deberse a un incorrecto procesamiento de la proteína P2, ya que se mostraron niveles altos de precursores de P2, inclusive se han estudiado individuos con total pérdida o ausencia de P2. También se sostiene la teoría que las protaminas son necesarias para la unión a zona pelúcida y capacidad de penetración del espermatozoide, lo cual reforzaría los resultados de Aoki, en cuanto a las fallas en FIV y no en ICSI (Aoki & Carrell, 2003).

4. TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LA COMPACTACIÓN NUCLEAR ESPERMÁTICA.

Dada la importancia del ADN nuclear espermático, se han planteado diversas técnicas para su evaluación en distintas especies. Sin embargo, la mayoría de estas se enfocan en la fragmentación del material genético; es decir, daños que alteran la estructura del ADN y que se dan por distintos factores. Estos factores pueden presentarse en distintos momentos de la formación o procesos posteriores que atraviesa el espermatozoide (Kizilay & Altay, 2017). Dentro de ellos tenemos: defectos en espermiogénesis, protaminación ineficiente, y por lo tanto, compactación nuclear insuficiente, estrés oxidativo, alteraciones en la apoptosis, daño inducido por tóxicos ambientales y factores externos (Aitken, De Iuliis,

& Mclachlan, 2009) (Figura 2). Por tal motivo, los ensayos de evaluación del ADN espermático se enfocan en uno u otro factor, dependiendo de la prueba. En esta revisión, se considera de importancia aquellas pruebas que, de manera directa o indirecta, revelan el estado de la compactación nuclear espermática.

4.1. Directa

4.1.1. Cromomicina A3:

Este ensayo consiste en la adición del fluorocromo llamado Cromomicina A3 (CMA3) a la muestra espermática, este se une a regiones enriquecidas en guanidina y citosina en el ADN. Como se sabe, las protaminas son tienen afinidad por estos nucleótidos en el ADN, por lo tanto, el CMA3 compite por los mismos sitios, por esta razón, se considera un indicador eficaz de deficiencia de protaminación en el espermatozoide. Al evaluar los resultados, entre mayor fluorescencia sea detectada, menor será el porcentaje de protaminación presente en el ADN del espermatozoide (Hosseinifar *et al.*, 2015; Nijs *et al.*, 2009). La lectura de esta prueba puede realizarse con un microscopio de fluorescencia o con citometría de flujo, siendo este último un equipo de mayor complejidad en cuanto a su manipulación, pero mejores resultados de imagen. Zandemami *et al* (2012) realizó un estudio para establecer la correlación entre CMA3 y la calidad del semen y deficiencia de protaminas en humanos, sus resultados revelaron una alta especificidad y sensibilidad de la prueba para determinar maduración,

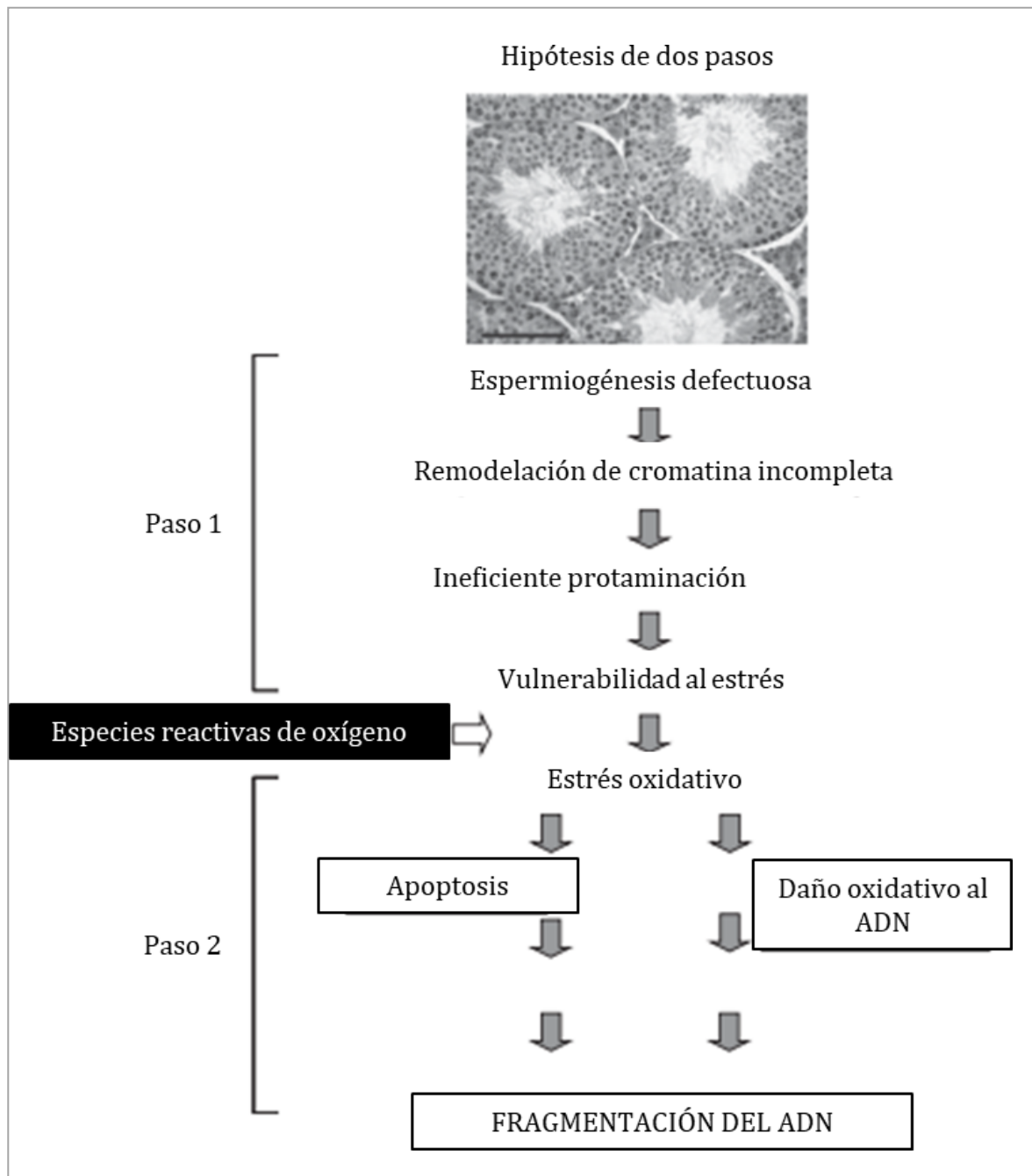


Figura 2. **Esquema explicativo de las causas de fragmentación del ADN espermático.** Aitken refiere la hipótesis de dos pasos que provocan fragmentación en el ADN. El primer paso incluye una espermiogénesis defectuosa, fallas en la remodelación de la cromatina, ineficiente protaminación y vulnerabilidad al estrés. En este punto se liberan especies reactivas de oxígeno que dan lugar al paso 2, donde el estrés oxidativo provocará alteraciones en la apoptosis y daño oxidativo al ADN, fragmentando sus cadenas.

FUENTE: Aitken, 2009

calidad y nivel de protaminación de las células espermáticas. Por otro lado, Simoes *et al* (2013) empleó la misma prueba para toros de raza Nelore donde se comprobó que los problemas de fertilidad que estos tenían no eran a causa de una deficiente protaminación, pues los valores de CMA3 fueron bajos. También se ha determinado que resultados positivos elevados del test de CMA3 están relacionados con anomalías morfológicas o bajos niveles de motilidad (Mengual, 2003). Estas conclusiones se obtuvieron a partir de estudios como el de Nijs *et al* (2009) donde emplean CMA3 como herramienta para predecir el éxito de biotecnologías reproductivas como FIV o ICSI (Figura 3).

4.2 Indirectas

4.2.1. Azul de toluidina

El azul de toluidina (AT) es una tinción catiónica que se aplica a las células espermáticas y que brinda, como resultado, colores metacromáticos azul-violeta, en el caso de interactuar con mayor cantidad de lisina, y colores ortocromáticos azul tenue- verdoso, en caso de generar escasa interacción con lisina (Carretero, Giuliano, Casaretto, Gambarotta, & Neild, 2009). Dicha interacción se basa en la unión de AT con grupos fosfatos aniónicos del ADN. Como se mencionó anteriormente, las histonas son proteínas ricas en lisinas, mientras que las protaminas, en argininas (Balhorn, 2011). Y, además, a diferencia de las histonas, las argininas de la protamina son capaces de neutralizar a los grupos fosfatos, razón por la cual estas no poseen afinidad por AT (Balhorn, 2007). Una

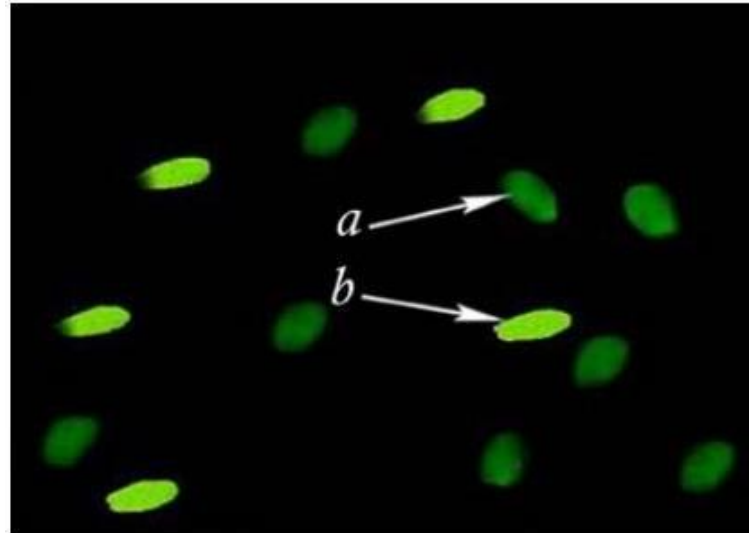


Figura 3. **Tinción de espermatozoides con CMA3.** Imagen de la muestra espermática de individuo con registro de baja fertilidad mostrando espermatozoides normales (a) y espermatozoides con deficiente de protamina (b).

FUENTE: Kazerooni *et al*, 2009

cromatina rica en protaminas y correctamente condensada, reflejará escasa o nula fluorescencia ante la presencia de esta tinción. De esta manera, el test de AT permite la diferenciación de un empaquetamiento laxo y más susceptible a daño con un empaquetamiento hipercondensado resistente (Cortés-Gutierrez, Dávila-Rodríguez, López-Fernández, Fernández, & Gosálvez, 2007). Esta técnica fue aplicada por Carretero *et.al* (2009) en 6 llamas, concluyendo que se pudo evaluar, con éxito, la condensación de la cromatina. La prueba de AT es de bajo costo y metodología sencilla; sin embargo, tanto este como otros estudios, reportan que la principal desventaja de esta prueba es la difícil y subjetiva valoración de coloraciones intermedias, además de la baja reproducibilidad de los resultados (Alvarez *et al.*, 2015) (Figura 4).

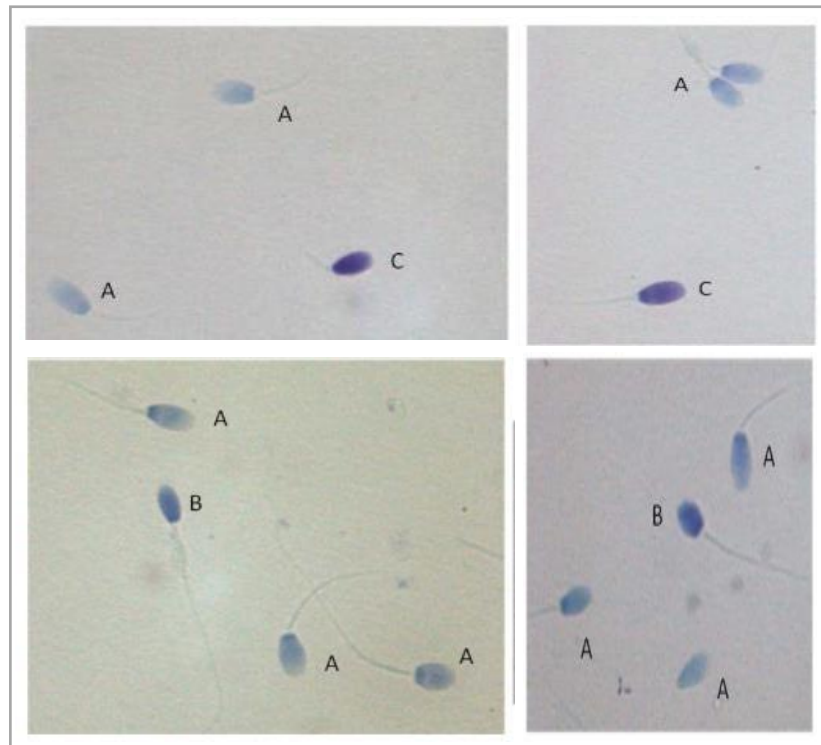


Figura 4. **Tinción azul de toluidina.** Espermatozoides de llama con tinción azul de toluidina: A) negativos, sin alteración en la condensación normal de la cromatina, B) intermedios, algún grado de descondensación C) positivos, alto grado de descondensación.

FUENTE: Carretero *et al*, 2009

4.2.2. “TUNEL”

Este test se basa en la detección de ruptura de ADN empleando una polimerasa denominada Terminal desoxinucleotidil transferasa (TdT) que agrega desoxirribonucleótidos a grupo hidroxilo de cadenas simples y dobles de ADN. TdT agrega desoxiuridina trifosfato (dUTP) a las terminaciones 3'-OH libres por la fragmentación del ADN en dichos sitios (Sharma, 2010). dUTP se encuentra marcada por un fluorocromo denominado isotianato de fluoresceína (FITC) que permitirá la

observación en el citómetro de flujo o microscopio de fluorescencia. Entre mayor sea la fragmentación del material genético, mayor será la fluorescencia observada (Manochantr, Chiamchanya, & Sobhon, 2012). Se considera una prueba indirecta de la evaluación de compactación nuclear, puesto que, esta solo está ratificando fragmentación en la cadena de ADN, sin embargo, no revela la procedencia de dicha ruptura. La prueba fue diseñada inicialmente para determinar poblaciones apoptóticas, no obstante, la posibilidad de ruptura por alteraciones en la compactación de la cromatina espermática también existe (Gunes, Al- sadaan, & Agarwal, 2015). Esto se ha comprobado en estudios como el de Terregrosa *et.al* (2006), en el que se comparó resultados del ensayo TUNEL con la presencia de bajos niveles de precursor de protamina 2 y se concluyó que se encontraban positivamente relacionados, por lo que se demostró la unión que existen entre deficiencias de protaminas con una baja integridad de la compactación del ADN (Quintero–Vásquez, Bermúdez-Cruz, & Castillo-Cadena, 2015) (Figura 5).

4.2.3. “Cometa”

Cometa fue el primer ensayo creado para identificar daño en el ADN de células individuales, motivo por el cual, también se le denomina ensayo de electroforesis de una sola célula. Consiste en colocar las células espermáticas en una lámina con gel de agarosa, esto permitirá una mejor visualización de las cometas y obtener un gel uniforme que permita su manipulación (Liao, McNutt, & Zhu, 2009). Luego, se provoca lisis de las células al aplicarles un agente alcalino reductor que afecta a los grupos sulfhidrilos de las protaminas y liberar el ADN. La muestra se somete a

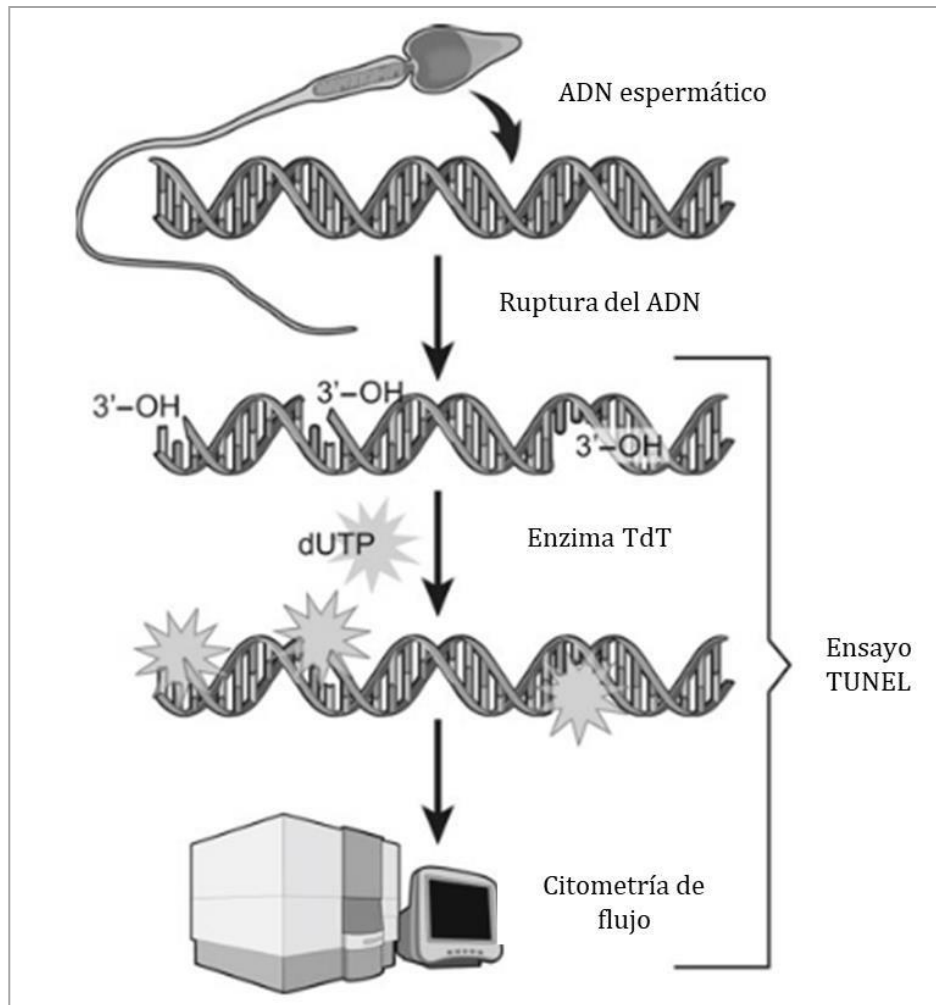


Figura 5. Esquema del ensayo TUNEL mostrando la acción de dUTP y TdT sobre las rupturas en la cadena de ADN para su posterior visualización en citometría de flujo.

FUENTE: Sharma, 2010

electroforesis, donde el material genético fragmentado migrará en el gel y saldrá a relucir una forma de cola de cometa (Cortés-Gutierrez *et al.*, 2007). Es posible la visualización de esta imagen, gracias a la tinción que se le agrega previamente, que por lo general, corresponde a bromuro de etidio, yoduro de propidio o SYBR-GREEN. De acuerdo al tamaño de la cola, se puede cuantificar el nivel de daño o fragmentación que posee el ADN nuclear de estas células (Küçük, 2018). Si bien este ensayo no diferencia

específicamente si el daño ocurre por fallas en la compactación de la cromatina, es una forma indirecta de detectarla y que requiere menor presupuesto, dado que, se visualizan los resultados en un microscopio de fluorescencia y no en un citómetro de flujo. El estudio de Simoes *et al* (2013) relaciona niveles anormales del ratio protamina1/protamina 2 con hallazgos elevados de fragmentación de ADN empleado el ensayo Cometa, dando como resultado una asociación positiva entre ambos (Figura 6).

4.2.4. SCSA

El ensayo de estructura de la cromatina espermática tiene su sustento en el principio que el ADN correctamente compactado y sin daño es más resistente a la desnaturalización por ácido o calor que el ADN fragmentado. Se emplea un ácido y una tinción llamada naranja de acridina (NA) para desnaturalizar al ADN y a la vez marcar las hebras bicatenarias (coloración roja) o monocatenarias (coloración verde) y se pueda interpretar el resultado en un citómetro de flujo (Evenson, 2016). Se calcula el índice de fragmentación de ADN (DFI) para determinar la proporción de material genético que presenta daño (Hosseinifar *et al.*, 2015). Es considerada una prueba indirecta para demostrar fallas en la compactación espermática, puesto que, el daño revelado en el ADN podría o no ser resultado de una deficiente compactación; sin embargo, sí está comprobado que existiría mayor susceptibilidad a la degradación cuando las protaminas no se encuentran correctamente acopladas formando toroides (Alvarez *et al.*, 2015; Nijs *et al.*, 2009) (Figura 7).

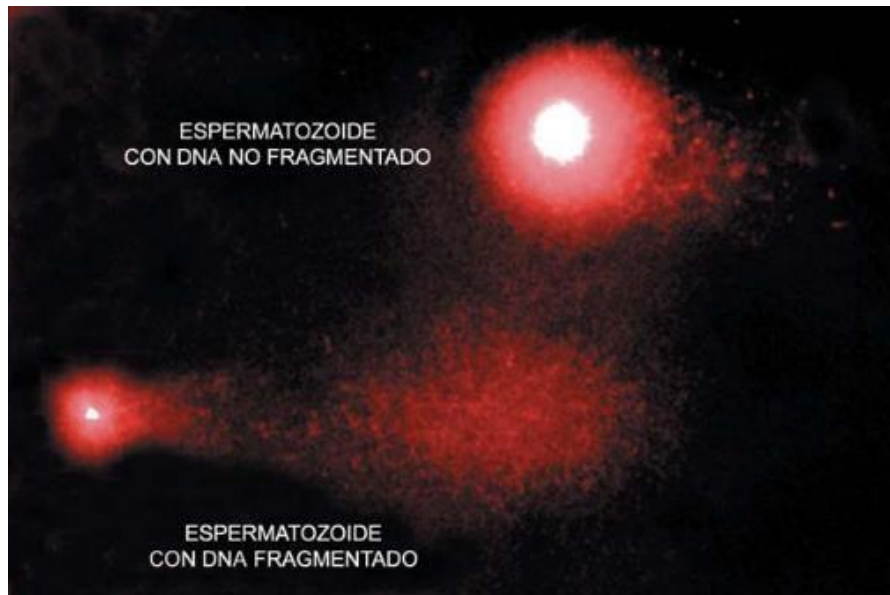


Figura 6. **Ensayo Cometa.** Muestra la integridad del ADN espermático a través del ensayo cometa. En la imagen inferior se observa el desplazamiento de los fragmentos de ADN a causa del campo eléctrico, formándose una forma de cola de cometa. Y, en la parte superior se observa un núcleo que mantiene su estructura, sin daño en el ADN.

FUENTE: Cortés-Gutierrez, 2007

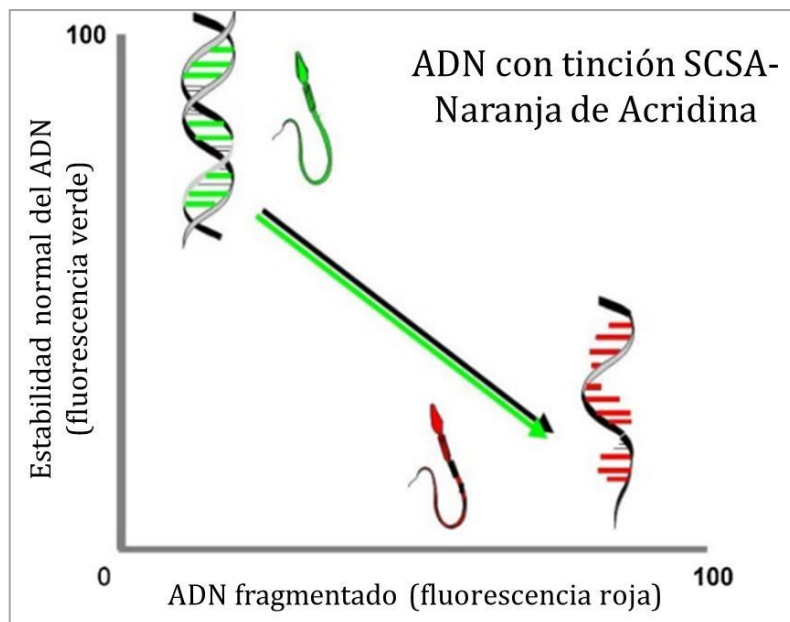


Figura 7. Esquema del cambio de fluorescencia de verde a roja en el caso de ADN fragmentado empleando el método de SCSA.

FUENTE: Evenson, 2016

5. CONCLUSIÓN:

Las protaminas son proteínas de gran importancia para la compactación de la cromatina espermática e influyen directamente en la capacidad fecundante de los espermatozoides; por este motivo, su deficiencia se considera posible indicador de fallas en la fertilidad del macho. Se han analizado estas proteínas en especies como el ser humano, bovinos y porcinos empleando la prueba de Cromomicina A3 y diversas pruebas indirectas: sin embargo, en alpacas no se han reportado estudios que demuestren la relevancia de las protaminas ni el tipo de prueba que mejor se ajuste a su análisis en esta especie. Por lo tanto, mayores estudios deberían realizarse a cerca estas proteínas en alpacas, con la finalidad de generar mejoras en la selección de reproductores.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, M. C., Puhakka, J., Ruete, A., Al-Essawe, E. M., Verdier, K., Morrell, J. M., & Båge, R. (2016). Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58(1).
<https://doi.org/10.1186/s13028-016-0191-x>
- Aguilar, M., & Torres, D. (2015). *CRianza y Mejora Genética de las Alpacas* (desco & MINSUR, eds.).
- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., & Mclachlan, R. I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *International Journal of Andrology*, 32(1), 46–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00943.x>
- Aller, J. (2015). *Reproducción en Camélidos Sudamericanos*. 220–222. Retrieved from http://infoalpacas.com.pe/wp-content/uploads/2016/02/Capitulo_09.pdf
- Alvarez, C., Arellano, F. E., & Pérez, A. (2015). Técnicas de estudio para la evaluación del daño al ADN y su aplicación en la producción animal. *SNS*, (January).
- Annunziato, A. (2008). DNA Packaging: Nucleosomes and Chromatin | Learn Science at Scitable. Retrieved October 6, 2019, from Nature Education website:
<https://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310/>
- Aoki, V. W., & Carrell, D. T. (2003). Human protamines and the developing spermatid: Their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian Journal of Andrology*, 5(4), 315–324.
- Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*, 8(9).
<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>
- Balhorn, R. (2011). Sperm Chromatin: An Overview. In *Sperm Chromatin: Biological and Clinical Applications in Male Infertility and Assisted Reproduction*.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9>
- Bergmann, M. (2006). Physiology of spermatogenesis. *Andrology for the Clinician*, 272–281.
https://doi.org/10.1007/3-540-33713-X_58
- Brugo-olmedo, S., Chillik, C., & Kopelman, S. (2003). Infertility : Causes and Definitions. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 54(1055), 228–248.
- Carretero, M., Giuliano, S., Casaretto, C., Gambarotta, M., & Neild, D. (2009). *Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina Effect of seminal plasma on cryopreserved llama (Lama glama) spermatozoa View project CRIOPRESERVACION DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA View project*. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/261876257>
- Castillo, J., Simon, L., de Mateo, S., Lewis, S., & Oliva, R. (2011). Protamine/DNA ratios and DNA damage in native and density gradient centrifuged sperm from infertile patients. *Journal of Andrology*, 32(3), 324–332.
<https://doi.org/10.2164/jandrol.110.011015>
- Cebra, C., Anderson, D., Tibary, A., & Van Saun, R. (2014). *Llama and Alpaca Care*. Linda Duncan.

- Champroux, A., Torres-Carreira, J., Gharagozloo, P., Drevet, J. R., & Kocer, A. (2016). Mammalian sperm nuclear organization: Resiliencies and vulnerabilities. *Basic and Clinical Andrology*, 26(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s12610-016-0044-5>
- Chan, P. J., Orzylowska, E. M., Corselli, J. U., Jacobson, J. D., & Wei, A. K. (2015). A simple sperm DNA toroid integrity test and risk of miscarriage. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/780983>
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2011). Actin binding proteins and spermiogenesis. *Spermatogenesis*, 1(2), 99–104. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16913>
- Cortés-Gutierrez, E., Dávila-Rodríguez, M., López-Fernández, C., Fernández, J., & Gosálvez, J. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*, 31(2), 120–131.
- Evenson, D. P. (2016). *The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility*. 169, 56–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.01.017>
- FAO. (2005). *Situación Actual De Los Camélidos Sudamericanos En Perú Organización De Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación*. Retrieved from https://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia_archivos/situacion_alpcas_peru.pdf
- Fernando, V. R., & Echeverri, D. V. (2007). Espermograma y su utilidad clínica. *Salud Uninorte*, 23(2), 220–230.
- Franco, M., Pezo, D., García, W., & Franco, F. (2009). *Manual de juzgamiento de alpacas y llamas*.
- Gunes, S., Al-sadaan, M., & Agarwal, A. (2015). Spermatogenesis , DNA damage and DNA repair mechanisms in male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 31(3), 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.010>
- Hafez E.S. (2000). *Reproduction in farm animals* (7th ed.; D. Balado, Ed.).
- Hamilton, T. R. S., Simões, R., Mendes, C. M., Goissis, M. D., Nakajima, E., Martins, E. A. L., ... Assumpção, M. E. O. A. (2019). Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. *Andrology*, 7(3), 373–381. <https://doi.org/10.1111/andr.12610>
- Hosseinfar, H., Yazdanikhah, S., Modarresi, T., Totonchi, M., Sadighi Gilani, M. A., & Sabbaghian, M. (2015a). Correlation between sperm DNA fragmentation index and CMA3 positive spermatozoa in globozoospermic patients. *Andrology*, 3(3), 526–531. <https://doi.org/10.1111/andr.12030>
- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T., & Adams, G. (2007). Biotecnología reproductiva en camelidos sudamericanos: avances y perspectivas. *XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú*, 15, 185–214.
- Hutchison, J. M., Rau, D. C., & DeRouchey, J. E. (2017). Role of Disulfide Bonds on DNA Packaging Forces in Bull Sperm Chromatin. *Biophysical Journal*, 113(9), 1925–1933. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.050>
- Incahuancho, L. (2018). *Eficiencia reproductiva de alpacas machos en relación al tamaño testicular y niveles hormonales durante época reproductiva en puna seca*.
- Kazerooni, T, Asadi, N , Jadid, L, Kazerooni, M, Ghanadi, A, Ghaffarpasand, F , & Kazerooni, Y , Zolghadr, J. (2009). Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with

- unexplained recurrent abortion. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26:591–596
- Khara, K., Vlad, M., Griffiths, M., Kennedy, R (1997). *Human Protamines and Male Infertility*. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 14(5)
- Küçük, N. (2018). *Sperm DNA and detection of DNA fragmentations in sperm*. 44(1), 1–5. <https://doi.org/10.5152/tud.2018.49321>
- Liao, W., McNutt, M. A., & Zhu, W. (2009). The Comet assay : A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.016>
- Manochantr, S., Chiamchanya, C., & Sobhon, P. (2012). Relationship between chromatin condensation, DNA integrity and quality of ejaculated spermatozoa from infertile men. *Andrologia*, 44(3), 187–199. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2010.01128.x>
- Mengual, L. (2003). *Marked Differences in Protamine Content and P1 / P2 Ratios*. 24(3), 438–447.
- Miller, D., Brinkworth, M., & Iles, D. (2010). Paternal DNA packaging in spermatozoa: More than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction*, 139(2), 287–301. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0281>
- MINAGRI. (2015). Camélidos sudamericanos. Retrieved November 17, 2019, from <http://minagri.gob.pe/portal/datero/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-producci/298-camelidos-sudamericanos?start=7>
- Nayeri, M., Reza, A., Mehdi, M., Morteza, S., & Tabibnejad, N. (2018). Polymorphisms of sperm protamine genes and CMA3 staining in infertile men with varicocele. *Revista Internacional de Andrología*, (xx). <https://doi.org/10.1016/j.androl.2018.07.005>
- Nijs, M., Creemers, E., Cox, A., Franssen, K., Janssen, M., Vanheusden, E., ... Ombelet, W. (2009). Chromomycin A3 staining, sperm chromatin structure assay and hyaluronic acid binding assay as predictors for assisted reproductive outcome. *Reproductive BioMedicine Online*, 19(5), 671–684. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.07.002>
- Nishimura, H., & L'Hernault, S. W. (2017). Spermatogenesis. *Current Biology*, 27(18), R988–R994. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.067>
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, 12(4), 417–435. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml009>
- Pradeepa, M. M., & Rao, M. R. (2007). Chromatin remodeling during mammalian spermatogenesis: role of testis specific histone variants and transition proteins. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 63(February 2007), 1–10.
- Quintero–Vásquez, G. A., Bermúdez-Cruz, R. M., & Castillo-Cadena, J. (2015). Infertilidad Masculina Y Fragmentación Del Adn Espermático: Un Problema Actual. *Tip*, 18(2), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2015.09.006>
- Ravel, C., Chantot-Bastaraud, S., El Houate, B., Berthaut, I., Verstraete, L., De Larouziere, V., McElreavey, K. (2007). Mutations in the protamine 1 gene associated with male infertility. *Molecular Human Reproduction*, 13(7), 461–464. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam031>
- Rodríguez, Y. (2011). *Evaluación de la eficiencia reproductiva de alpaca huacaya con empadre dirigido controlado de los fundos itita y MUNAY PAQOCHA*,

SPARMACUSANI - PUNO.

- Sharma, R. (2010). *TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility*.
- Simões, R., Nicacio, A., Binelli, M.; Paula-Lopes, F, Milazzotto, M., Visintin, J, y D'Ávila Assumpção, D. (2013), "Sperm-mediated gene transfer: effect on bovine in vitro embryo production", *Zygote* 21 (04), pp. 325-329.
- Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., & Lewis, S. E. M. (2011). Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(6), 724–734. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.08.010>
- Steger, K., & Balhorn, R. (2018). *Sperm nuclear protamines : A checkpoint to control sperm chromatin quality*. 4(April), 273–279. <https://doi.org/10.1111/ahe.12361>
- Torregrosa, N., Domínguez-fandos, D., Camejo, M. I., Shirley, C. R., Meistrich, M. L., Balleascà, J. L., & Oliva, R. (2006). *Protamine 2 precursors , protamine 1 / protamine 2 ratio , DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients*. 21(8), 2084–2089. <https://doi.org/10.1093/humrep/del114>
- Torres, D. (2014). *Desarrollo rural y los camélidos andinos: un largo recorrido, aciertos y limitaciones*.
- Torres, D., Lencinas, M., & Cáceres, Y. (2011). Gestión Sostenible de los Camélidos, Tecnología y valor agregado en la crianza campesina. In *desco*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vásquez Cavero, J. (2012). *Fisiología espermática , fragmentación del ADN y niveles de expresión génica de Prm1 , Prm2 , Tnp1 y Tnp2 en relación a la edad en ratones A mis padres Norma y Flavio por su amor infinito*. 84.
- Aoki, V. , Liu, L. , Jones, K. , Hatasaka, H. , Gibson, M. , Peterson, M. , Carrell, D. (2006). Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility*. 86(5)
- Ward, W. S. (2018). Organization of sperm DNA by the nuclear matrix. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 6(2), 87–92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29666836> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5902726>
- Zandemami, M. , Qujeq, Q. , Mehdi, D, Kamali, K. , Raygani, M. , Lakpour, N, Savadi, E., Reza M. (2012). Correlation of CMA3 Staining with Sperm Quality and Protamine Deficiency. *Labmedicine*. 43(6).