



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, Decana de América)

ESCUELA DE POSGRADO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

***EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA Proteína rica en Cisteína
asociada a Mitocondrias Espermáticas (SMCP) EN ALPACA (Lama pacos).***

TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Bach. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS

LIMA - PERÚ

2011

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a mi esposo Alexei Santiani por brindarme su amor, respeto, por confiar en mí más que yo misma y ser mi roca en todo momento. A mis hijos: María Isabel, Sofía y Daniel por ser la luz de mi vida e incentivarme con sus palabras, miradas, sonrisas y gestos a continuar esforzándome cada día más y más, los amo.

También quisiera agradecer a mis padres: Ydeliza y Tomas y a Diego mi hermano, por creer en mí y apoyarme durante toda mi vida, gracias a su amor, comprensión y ejemplo, he podido desarrollar cada fase de mi carrera y mi propia familia. Y a mi suegro Edgar Santiani a quien aprecio mucho y con el que cuento en todo momento.

A mi asesora la MsSc Martha Esther Valdivia Cuya por su apoyo, comprensión y amistad durante el desarrollo de los estudios de Maestría y la redacción de la tesis. Ella sin ningún tipo de reparo me abrió las puertas de su laboratorio y me ha venido incentivando a seguir investigando.

A todos los chicos del laboratorio Fisiología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en especial a Alejandro Florentini, Jonathan Vásquez y Luis Tataje, quienes fueron parte muy importante para el desarrollo del trabajo de investigación.

Sobre todo a Dios, por todas las bendiciones que me ha brindado durante toda mi vida, ya que con su inmensa sabiduría él me ha guiado hasta donde estoy.

Un especial agradecimiento al Consejo de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC), quienes me brindaron el financiamiento para realizar la carrera de Postgrado y terminar satisfactoriamente el presente trabajo de investigación. Y a laboratorios Roche por facilitarnos el sistema LightCycler 480 II.

DEDICATORIAS

Dedicado a mi familia entera por todo su amor, apoyo, comprensión y por confiar en mí. Son el eje de mi vida, sin uds. no hubiera podido lograr nada, ya que llenan mi existencia y me hacen sentir más que realizada.

CONTENIDO

	Pág.
Agradecimientos	ii
Dedicatorias	iii
Contenido	iv
Resumen	vii
Abstract	viii
I. Introducción.	1
II. Antecedentes	3
2.1. Los camélidos sudamericanos y su importancia en la sociedad altoandina.	3
2.2. Importancia de la selección de alpacas para la formación de núcleos reproductores.	3
2.3. Motilidad espermática	5
2.4. Proteína rica en Cisteína asociada a Mitocondria Espermática (SMCP)	8
III. Hipótesis y Objetivos.	12
3.1. Hipótesis.	12
3.2. Objetivo General.	12

3.3. Objetivos Específicos.	12
IV. Materiales y métodos.	13
4.1. Muestreo.	13
4.2. Procedimiento experimental	15
4.3. Evaluación espermática.	15
4.3.1. Concentración	16
4.3.2. Motilidad progresiva total	16
4.3.3. Vitalidad	17
4.3.4. Integridad de membrana	17
4.4. Diseño de primers.	18
4.4.1. Alineamientos	19
4.4.2. Generación in silico de amplicones	20
4.4.3. Selección de primers	20
4.5. Extracción de ARN.	20
4.6. Formación de cDNA.	20
4.7. Estandarización de la técnica de PCR convencional.	21
4.8. Cuantificación de la expresión de SMCP mediante RT-qPCR.	22
4.9. Análisis estadísticos.	23

V. Resultados.	24
5.1. Resultados de motilidad, concentración vitalidad e integridad de membrana de espermatozoides epididimarios de alpaca.	24
5.2. Alineamientos	24
5.3. Análisis In Sílico	30
5.4. Resultados de la técnica de PCR convencional.	31
5.5. Resultado de la técnica de RT-qPCR.	32
5.6. Resultados de la Correlación entre la motilidad espermática y la expresión génica de SMCP	33
VI. Discusión.	34
VII. Conclusiones.	40
VIII. Recomendaciones.	41
IX. Referencias Bibliográficas.	42
X. Anexos.	46

RESUMEN.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión del gen de la Proteína rica en Cisteína asociada a la Mitocondria Espermática (SMCP) en alpacas y correlacionar los valores de expresión de dicho gen con la motilidad espermática.

Con ese fin se diseñaron *primers* para el gen SMCP en alpacas mediante la utilización de alineamientos de secuencias de nucleótidos de homólogos del gen de SMCP de especies filogenéticamente relacionadas a alpaca (*Sus scrofa* y *Bos taurus*) tomadas de la base de datos del GenBank de la NCBI. A la par se trabajó con alineamientos de la secuencia “al azar” de alpaca de la base de datos del FASTA – Whole Genome Shotgun Sequence Similarity Search del European Bioinformatics Institute.

Se seleccionaron los *primers* mediante el uso de la técnica de PCR convencional y electroforesis. Posteriormente se cuantificaron los niveles de expresión del gen en tejido testicular mediante RT-qPCR.

Los niveles de expresión en el Grupo I (animales con menos del 25% de motilidad espermática progresiva) fueron relativamente más altos (3.524 ± 2.730) que en el Grupo II compuesto por animales con motilidad espermática progresiva mayor o igual a 25% (1.598 ± 1.246). También se observó que el porcentaje de motilidad espermática fue superior en el Grupo I (38.54 ± 4.18 %) con respecto al Grupo II (5.54 ± 1.08 %). Además se demostró que los niveles de expresión del gen de SMCP en alpaca presentan correlación positiva ($r= 0.4397$) con el porcentaje de motilidad espermática.

En conclusión, se ha determinado los niveles de expresión del gen SMCP en alpaca y se ha comprobado que existe correlación positiva entre sus niveles de expresión y el porcentaje de motilidad espermática. Con lo cual se propondría un marcador molecular de motilidad espermática, y con ello una nueva metodología para los sistemas de selección de machos reproductores de alpaca.

Palabras Clave: Alpaca, *gen*, motilidad espermática, RT-qPCR, SMCP.

ABSTRACT.

The objective of this study was evaluate the expression patterns of the alpaca's Sperm Mitochondria-associated Cysteine-rich Protein gene (SMCP) and correlates the expression values of that gene with sperm motility.

To this aim were used FASTA sequences from homologs of the SMCP gene from alpaca's phylogenetically related species (*Sus scrofa* and *Bos taurus*). These sequences were taken from the NCBI GenBank database. Also we worked with alpaca's shotgun sequence from the FASTA database - Whole Genome Shotgun Sequence Similarity Search of the European Bioinformatics Institute, to design primers for the homolog gene by aligning the sequences.

The primers selected went through a process of standardization by using standard PCR technique and was by means of electrophoresis that was identified to the homolog gene to SMCP in alpaca. Subsequently was quantified the expression levels of this gene in testicular tissue by means RT-qPCR.

In animals of Group I (animals with motility percentage less than 25%), expression levels found were relatively higher (3,524 + 2,730) than the expression levels on the Group II formed by animals with motility percentage equal or higher than 25% (1,598 + 1,246). The motility average was higher on the Group I (38.54 + 4.18%) than the Group II (5.54 + 1.08%). Also we determined that the levels of gene expression in the homolog SMCP in alpaca had a positive correlation with sperm motility average.

In conclusion, we identified expression patterns of SMCP gene in alpaca. And we determined that there is positive correlation between their expression levels and the percentage of sperm motility. Thus propose a molecular marker of sperm motility in alpaca, and therefore a new methodology for the selection system of breeding males.

Key words: Alpaca, gene, sperm motility, RT-qPCR, SMCP.

I. INTRODUCCIÓN.

Cuando nos referimos a la motilidad del espermatozoide, el flagelo es la estructura más importante, ya que este facilita su transporte en el tracto reproductivo de la hembra. En consecuencia la expresión de proteínas relacionadas a la motilidad espermática, constituye uno de los factores importantes para conseguir una fecundación exitosa. Los flagelos de los espermatozoides mamíferos se encuentran constituidos por tres estructuras específicas: la vaina mitocondrial, las fibras densas externas y la cubierta fibrosa, que son los componentes que intervienen en la motilidad y son el lugar de la localización de las proteínas que producen ATP y regulan dicha motilidad (Eddy *et al.*, 2003).

Trabajos previos han demostrado que la vaina mitocondrial está asociada con muchas proteínas, siendo una de ellas y posiblemente una de las más importantes para la motilidad, la Proteína rica en Cisteína asociada a la Mitocondria Espermática (SMCP) (Hawthorne *et al.*, 2006), ya que se ha comprobado que su expresión está positivamente correlacionada con la motilidad espermática en ratones (Nayernia *et al.*, 2002).

Además, se ha determinado que la delección específica del gen SMCP en ratones, no genera ningún efecto ultraestructural en la vaina mitocondrial; sin embargo, la motilidad espermática se encuentra sumamente afectada, lo que no permite la migración de los espermatozoides a través del tracto reproductivo femenino y por consiguiente la fecundación del ovocito (Nayernia *et al.*, 2005; Ward *et al.*, 2003; Escalier, 2006).

Cabe resaltar que los estudios utilizando marcadores moleculares ha permitido la selección de animales más aptos desde el punto de vista sanitario, productivo y reproductivo. Dichos estudios no solo se han ejecutado en animales de laboratorio, (ratón y hámster) sino también en otras especies de mamíferos de importancia productiva y por ende económica (bovino, porcino). Sin embargo, en la actualidad la utilización de marcadores moleculares y los estudios de genómica

y proteómica aún no se han implementado eficientemente en el ámbito de los camélidos sudamericanos (CSA).

La alpaca es uno de los CSAs más importantes en nuestro país desde el punto de vista social, económico, cultural y científico. En la actualidad se vienen desarrollando diversos trabajos de reproducción asistida en esta especie sin la adecuada selección de reproductores, ya que dicha selección se realiza de forma subjetiva por características fenotípicas tales como: talla, peso, fibra, etc., sin tomar en cuenta las características genotípicas de dichos animales.

Por todo lo antes expuesto nos vemos motivados a plantear un trabajo de investigación a través del cual se logre caracterizar la expresión del gen SMCP y con ello proponer un marcador molecular de motilidad espermática en alpacas, y por consiguiente potenciar y mejorar los sistemas de selección de machos reproductores.

II. ANTECEDENTES

1. Los Camélidos Sudamericanos y su importancia en la sociedad altoandina.

Los CSA constituyen un recurso genético de gran importancia social, económica, cultural y científica para nuestro país. En la actualidad, constituyen el único medio de utilización productiva de las extensas áreas de pastos naturales de las zonas alto andinas donde no es posible la agricultura ni la crianza económica de otras especies de animales domésticos (FAO, 2005).

La crianza de alpacas en el Perú se desarrolla en la región altoandina, en mayor proporción en la sierra sur y central, en altitudes que van de los 3800 hasta más de 5000 metros sobre el nivel del mar (FAO, 2005).

La alpaca es una especie que representa un factor importante de la economía de nuestro país, siendo el Perú el país con la mayor población de alpacas con aproximadamente 3 millones de cabezas (Esponda *et al.*, 2004).

La producción alpaquera genera fuentes de ingreso para por lo menos 1.5 millones de campesinos de más de 1000 comunidades de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Lima y Puno (Esponda *et al.*, 2004).

2. Importancia de la selección de alpacas para la formación de núcleos reproductores.

Fernández-Baca (1993) realizó un análisis sobre los estudios realizados sobre los aspectos básicos de la fisiología reproductiva de los CSA, en especial en machos y concluyó que hasta esa fecha no existían, muchos estudios al respecto y que la mayoría de ellos eran sobre la fisiología reproductiva de la hembra. Desde el análisis de Fernández-Baca (1993) a la actualidad, no se han reportado estudios enfocados en la fisiología reproductiva de los CSA, ya que las investigaciones han estado orientadas al desarrollo de biotecnologías reproductivas.

En general, las alpacas presentan una pobre fertilidad, con un porcentaje de preñez entre 40 - 60 % (Brown, 2000). Estos valores pueden deberse a diversas variables de índole reproductivo que pueden afectar tanto a la hembra como al macho. En el caso de los machos, la evaluación de las características seminales es uno de los métodos más simples de determinación indirecta de la fertilidad (Ax *et al.*, 2000).

Entre los métodos utilizados para la obtención de una muestra seminal en CSA tenemos: la funda vaginal; la esponja vaginal, la electroeyaculación (Fernández-Baca y Calderón, 1963), fistula uretral, la vagina artificial (Sumar y Leyva, 1981), desviación de conductos deferentes e incluso se viene utilizando la recuperación de espermatozoides de epidídimo como parte de la metodología de diversas investigaciones.

Además, se debe de resaltar que no todos los alpacas macho responden de forma eficiente a los diversos métodos de colección de semen previamente mencionados. Se suma el hecho de que la mayoría de los eyaculados obtenidos cuentan con concentración, motilidad y viabilidad bajos, y un alto porcentaje de espermatozoides anormales en comparación con otras especies (Pacheco, 2008).

Es cierto que en la actualidad se vienen desarrollando diversos trabajos de investigación en reproducción asistida en CSA, en especial en alpacas, muchos de ellos de última tecnología, como: la transferencia de embriones y la fecundación *in vitro*. Sin embargo, dichos trabajos se ejecutan, no con animales seleccionados por sus características genéticas deseables, sino con aquellos que responden a los métodos de colección de semen anteriormente nombrados. Por consiguiente las crías nacidas de dichas biotecnologías, no necesariamente pasarían a formar un núcleo reproductivo superior, ya que sus progenitores fueron seleccionados por su adaptabilidad a las técnicas empleadas y no por su superioridad genética.

Hasta el momento la selección de reproductores se realiza de forma subjetiva a través de la observación de las características fenotípicas de los

animales (talla, peso, fibra, etc), sin tomar en cuenta sus características reproductivas a nivel espermático (motilidad, concentración y vitalidad espermáticas) y en especial características genotípicas. Esto podría traer como consecuencia la presencia de animales con anomalías de naturaleza hereditaria.

Es por ello que correlacionar características reproductivas como por ejemplo la motilidad espermática con la expresión génica, nos ayudaría a establecer parámetros para la selección de machos reproductores, mediante un manejo básico, como sería la extracción de sangre, piel o folículos pilosos, dependiendo de los niveles de expresión génica en diversos tejidos, de aquellos animales que presentan renuencia a los métodos de colección de semen.

3. Motilidad Espermática

La motilidad es una de las características fisiológicas más importantes que posee el espermatozoide, ya que sin ella este gameto, no podría movilizarse y cumplir con su objetivo, el cual es llegar hasta el ovocito y fecundarlo.

Es el flagelo el que impulsa al espermatozoide hacia adelante durante su migración a través del útero y el oviducto, y es debido a la hiperactivación del mismo que se facilita la unión del espermatozoide al ovocito y su posterior penetración (Gagnon y Lamirande, 2006).

El flagelo del espermatozoide de mamífero está formado por 4 distintos segmentos: la pieza conectora (cuello), la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. Los mayores componentes estructurales del flagelo son: el axonema, la vaina mitocondrial, las fibras densas externas y la vaina fibrosa.

El axonema está dispuesto a lo largo de todo el flagelo y se encuentra compuesto por un complejo de microtúbulos dispuestos de la siguiente manera: 2 microtúbulos centrales rodeados por 9 dobletes de microtúbulos. Las fibras densas se encuentran rodeando al axonema y se extienden desde la pieza

conectora hasta la porción posterior de la pieza principal. La vaina mitocondrial se encuentra en la pieza media del flagelo rodeada por las fibras densas externas, en su interior se encuentran las mitocondrias espermáticas que son las encargadas de generar la energía necesaria para la motilidad espermática. La vaina fibrosa rodea las fibras densas en la pieza principal (Eddy, 2006).

Durante el movimiento espermático la onda flagelar se propaga en un plano perpendicular al par de microtúbulos centrales del axonema. Los 9 dobletes de microtúbulos externos son los encargados de la actividad durante dicho movimiento (Eddy, 2006). Las fibras densas externas y la vaina fibrosa aparentemente juegan un rol pasivo en el movimiento flagelar (Rikmenspoel, 1984). Donde la curvatura de las fibras densas es necesaria para disminuir la resistencia local a la flexión y esto explica el progresivo de la amplitud de la curvatura observada durante la propagación de la onda flagelar (Serres et al., 1984).

En la mayoría de mamíferos los espermatozoides provenientes de la cabeza del epidídimo tienen un movimiento vibratorio lento, lo cual genera patrones de movimiento circular. En cambio los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo, se mueven de forma vigorosa, rápida y progresiva. Este cambio de motilidad se ve relacionado a un menor arco de curvatura y rigidez del flagelo, los cuales pueden deberse al incremento de la formación de puentes disulfuro que ocurre en las fibras densas externas y la vaina fibrosa, durante la maduración epididimal (Calvin y Bedford, 1971).

Ya fuera del epidídimo el espermatozoide se moviliza por medio de dos tipos de motilidad: motilidad progresiva y motilidad hiperactivada. La motilidad progresiva es adquirida durante el tránsito epididimal, pero es observada solo después de la dilución con el plasma seminal al momento de la eyaculación. Se caracteriza por ser un movimiento vigoroso y relativamente simétrico, lo que conlleva a un movimiento progresivo rápido. Después de un período en el tracto reproductivo de la hembra o en un medio de cultivo apropiado, el espermatozoide pasa por una hiperactivación, debido a la exposición a

dineína. Lo cual produce un movimiento flagelar que se caracteriza por ser de alta amplitud, con un batimiento asimétrico, fuerte y rápido del flagelo, que se observa como un cambio en el movimiento espermático que genera una trayectoria circular o errática (Eisenbach, 1999). Esta hiperactivación ocurre en forma paralela al proceso de capacitación espermática.

Existen diversos factores envueltos en la iniciación de la motilidad progresiva y la inducción de la motilidad hiperactivada del espermatozoide, los identificados hasta el momento y al parecer los más importantes son: iones de calcio (Ca^{2+}), bicarbonato (HCO_3^-), y adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (Rikmenspoel, 1984).

Para que el espermatozoide mantenga su motilidad durante el paso por el tracto reproductivo de la hembra, son necesarios niveles adecuados de energía, es decir, adenosín trifosfato (ATP). La mitocondria espermática es fisiológicamente activa y puede generar ATP a partir de varios sustratos (Gagnon y Lamirande, 2006).

Los azúcares del plasma seminal, tales como glucosa y fructuosa, son altas fuentes de ATP que mantienen la motilidad espermática durante horas (Mukai y Okuno, 2004). Para que estos sustratos energéticos sean procesados hasta ATP, el espermatozoide cuenta con un centro energético fundamental, localizado en el flagelo, esta es la vaina mitocondrial. La cual está conformada por mitocondrias alineadas de extremo a extremo formando una hélice alrededor del complejo formado por el axonema y las fibras densas externas (Eddy, 2006). Las vías utilizadas para la producción de ATP a nivel de la mitocondria espermática son: la fosforilación oxidativa y la glicolisis (Mukai y Okuno, 2004).

La membrana externa de las mitocondrias espermáticas de mamífero está circunscrita en una estructura rica en queratina conocida como cápsula mitocondrial, la integridad de esta estructura está mediada por puentes

disulfuro y es sumamente resistente al dodecilsulfato sódico (SDS) (Cataldo *et al.*, 1996).

Diversos estudios (bioquímicos e inmunocitoquímicos) han demostrado que la cápsula mitocondrial se encuentra asociada a muchas proteínas (Calvin *et al.*, 1981; Cataldo *et al.*, 1996; Nayernia *et al.*, 2004).

4. Proteína rica en Cisteína asociada a Mitocondria Espermática (SMCP)

Pallini y Bacci (1979) reportaron que la proteína más abundante hallada después de la purificación de cápsulas mitocondriales de semen de toro, es una proteína de 20 kD con una muy inusual composición que incluye cisteína y prolina en un porcentaje mayor o igual a 20%, y un bajo porcentaje de aminoácidos hidrófobos. Dicha proteína en un inicio fue llamada Proteína de la Cápsula Mitocondrial (MCP) (Calvin *et al.*, 1981).

La deficiencia de selenio causa desarrollo anormal de la pieza media del flagelo espermático, lo cual genera una desorganización de la vaina mitocondrial (Calvin *et al.*, 1981). Es por ello que se pensó que la proteína MCP era afectada por esta deficiencia de selenio (Calvin *et al.*, 1987); sin embargo, investigaciones posteriores mostraron que el gen que codifica a la MCP no contiene codones para selenocisteína (Cataldo *et al.*, 1996), es por ello que la proteína fue renombrada como Proteína rica en Cisteína asociada a la Mitocondria Espermática (SMCP por sus siglas en ingles).

También se llegó a determinar los porcentajes exactos de cisteína (18%) y prolina (26%) de la SMCP en ratón y su ubicación en el flagelo espermático (Cataldo *et al.*, 1996). Mediante inmunocitoquímica se observó la distribución homogénea de SMCP en el citoplasma espermático durante los estadios de espermátida, cuando aún la vaina mitocondrial se está formando (Cataldo *et al.*, 1996).

Cataldo *et al.* (1996) concluyen que la asociación de la SMCP a la periferia de las mitocondrias en el estadio de espermátida tardía, sugiere que las funciones de esta proteína son tres: estabilización de la cápsula mitocondrial, unión intermitocondrial y fijación de la vaina mitocondrial a las fibras densas externas.

Shih y Kleene (1992) determinaron que el ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de SMCP comienza a ser detectado en el estadio de espermátida temprana hasta el estadio de espermátida tardía. Asimismo la proteína comienza a ser expresada alrededor de 6 días después del inicio de la transcripción, es decir, en el estadio de espermátida intermedia. Otros estudios en el desarrollo de expresión de SMCP usando ácido desoxirribonucleico (DNA) recombinante e inmunocitoquímica demuestran que es regulado a nivel transcripcional y post-transcripcional (Cataldo *et al.*, 1996).

Los altos niveles de expresión de SMCP están restringidos a las espermátidas haploides y su traducción es regulada, ya que los mRNA de SMCP son transicionalmente reprimidos y almacenados como ribonucleoproteínas mensajeras libres (mRNPs), la transcripción es activada cuando pasan a ser células haploides tardías (Cataldo *et al.*, 1996). Hallazgo que fue confirmado por Hawthorne *et al.* (2006) mediante inmunofluorescencia con proteína verde fluorescente (GFP).

El gen SMCP se encuentra localizado en el complejo de diferenciación epidermal (EDC), específicamente cerca a la mitad del mismo. El EDC es un *cluster* de aproximadamente 50 genes que codifican proteínas que forman las barreras epiteliales (Hawthorne *et al.*, 2006). El EDC se localiza exactamente en el cromosoma 1q21 en humano (Aho *et al.*, 1996) y el cromosoma 2q34 en rata (Adham *et al.*, 1996). Las similitudes entre las funciones y la secuencia del gen SMCP y los EDC corroboran la paralogía entre estos genes.

Hawthorne *et al.* (2006), demostraron que el mRNA de SMCP contiene secuencias altamente conservadas en las regiones no traducidas (UTRs) 5' y 3' en 7 especies de 4 órdenes de mamíferos y mediante estudios comparativos

de genómica se determinó, que el sitio de inicio de la transcripción en ratón, ratón ciervo, rata y humano es único.

Además se halló que el perro posee varios sitios de inicio de la transcripción de SMCP, sin embargo, especies como el ratón y el ratón ciervo poseen una misma posición del sitio de inicio de transcripción (Hawthorne et al, 2006). La comparación de secuencias de cDNAs y DNAs genómicos de SMCP revelan que el gen presenta un único intrón, el cual está localizado a 20 nt “rio arriba” del codón ATG de iniciación de la transcripción (Shih y Kleene, 1992)

También es interesante resaltar que dependiendo de la especie los niveles de transcripto podían ser elevados (ratón y ratón ciervo) o bajos (humano), lo cual fue independiente de la calidad del *primer* utilizado. Ya que a pesar de que en humano se usaron *primers* de diversa calidad, aún así los niveles de transcripto resultaron mucho más bajos a los niveles de transcripto obtenidos en ratón, ratón ciervo y perro (Hawthorne et al., 2006)

Mediante la utilización de RT-PCR y Southern blot se logró detectar los niveles de expresión de mRNA de SMCP, siendo altos en tejido testicular y mucho más bajos en útero, lengua, piel, hígado, corazón y riñón (Hawthorne et al., 2006).

En algún momento se llegó a postular la hipótesis, de que debido a que la SMCP se encontraría formando parte de la vaina mitocondrial, la falta de expresión de dicha proteína ocasionaría daños ultraestructurales en el flagelo espermático. Lo cual quedó descartado a partir del trabajo de Nayernia et al. (2005), en el cual se observó que ratones con delección del gen de SMCP producen espermatozoides con morfología normal de cabeza, vaina mitocondrial y flagelo, lo cual fue determinado mediante microscopía electrónica.

Nayernia et al. (2002) demostraron que la expresión de SMCP está positivamente correlacionada con la motilidad espermática. En dicho estudio se determinó que machos 129/Sv con antecedente genético de delección del gen de SMCP, resultaron infértiles debido a defectos observados en la

motilidad espermática, los cuales impiden la migración del espermatozoide por el tracto reproductivo de la hembra y por consiguiente no se logra la fecundación del ovocito.

Sin embargo, ratones machos C56BL/6 con disrupción en el gen SMCP fueron fértiles, lo cual implicaría que el gen de SMCP interactúa con un modificador genético desconocido, que le permite al espermatozoide mantener sus características móviles (Nayermia *et al.*, 2002).

Es por ello que el presente trabajo tiene como fin determinar cuáles son los niveles de expresión de SMCP en alpacas macho y correlacionarlos con los porcentajes de motilidad observados para cada muestra. Y con ello proponer un marcador molecular de motilidad espermática en alpacas, y por consiguiente potenciar y mejorar los sistemas de selección de machos reproductores.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

En la alpaca (*Lama pacos*), la expresión del gen SMCP tiene una correlación positiva con la motilidad espermática.

3.2. Objetivo General

- Evaluar la expresión del gen SMCP en alpacas.

3.3. Objetivos Específicos

- Realizar alineamientos *in silico* de las secuencias del gen SMCP de diferentes especies filogenéticamente relacionadas a alpaca.
- Diseñar los *primers* para el gen SMCP.
- Realizar una correlación entre los niveles de expresión del gen y los patrones de motilidad espermática (A, B, C y D) de los machos evaluados.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

A continuación se muestra un esquema general de la metodología experimental realizada durante el presente trabajo (Figura 1).

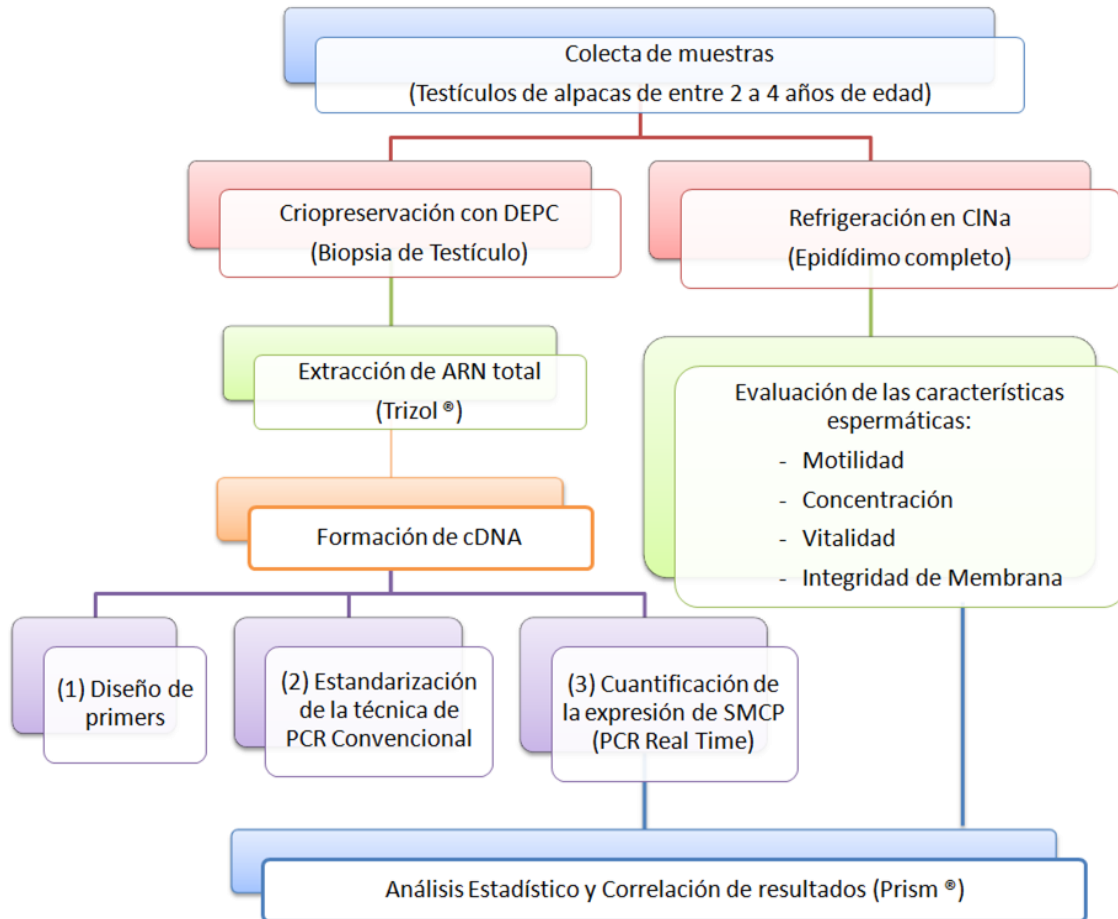


Figura 1: Esquema de la metodología experimental

1. Muestreo.

Se colectaron testículos con sus respectivos epidídimos intactos, de un total de 51 alpacas beneficiadas en el Camal de Municipal de Huancavelica (Figura N°2).



Figura N°2: Camal Municipal de Huancavelica

Los animales muestreados presentaban dentición correspondiente a una edad entre 2 a 4 años y se encontraban en buen estado sanitario. Se procedió a realizar una biopsia de médula testicular de 1 cm³. usando previamente DEPC como inhibidor de RNAasas. Dichas muestras se conservaron en crioviales, los cuales fueron correctamente identificados y mantenidos en nitrógeno líquido, para su transporte. Las muestras de epidídimo fueron almacenadas en suero fisiológico a 4°C y transportadas al laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en la ciudad de Lima para su evaluación. Durante el muestreo se midieron y pesaron los testículos (Figura N°3), se identificó la raza y color de los animales, más no fueron determinados como criterio de selección. Todos los datos fueron depositados en fichas diseñadas con tal fin.

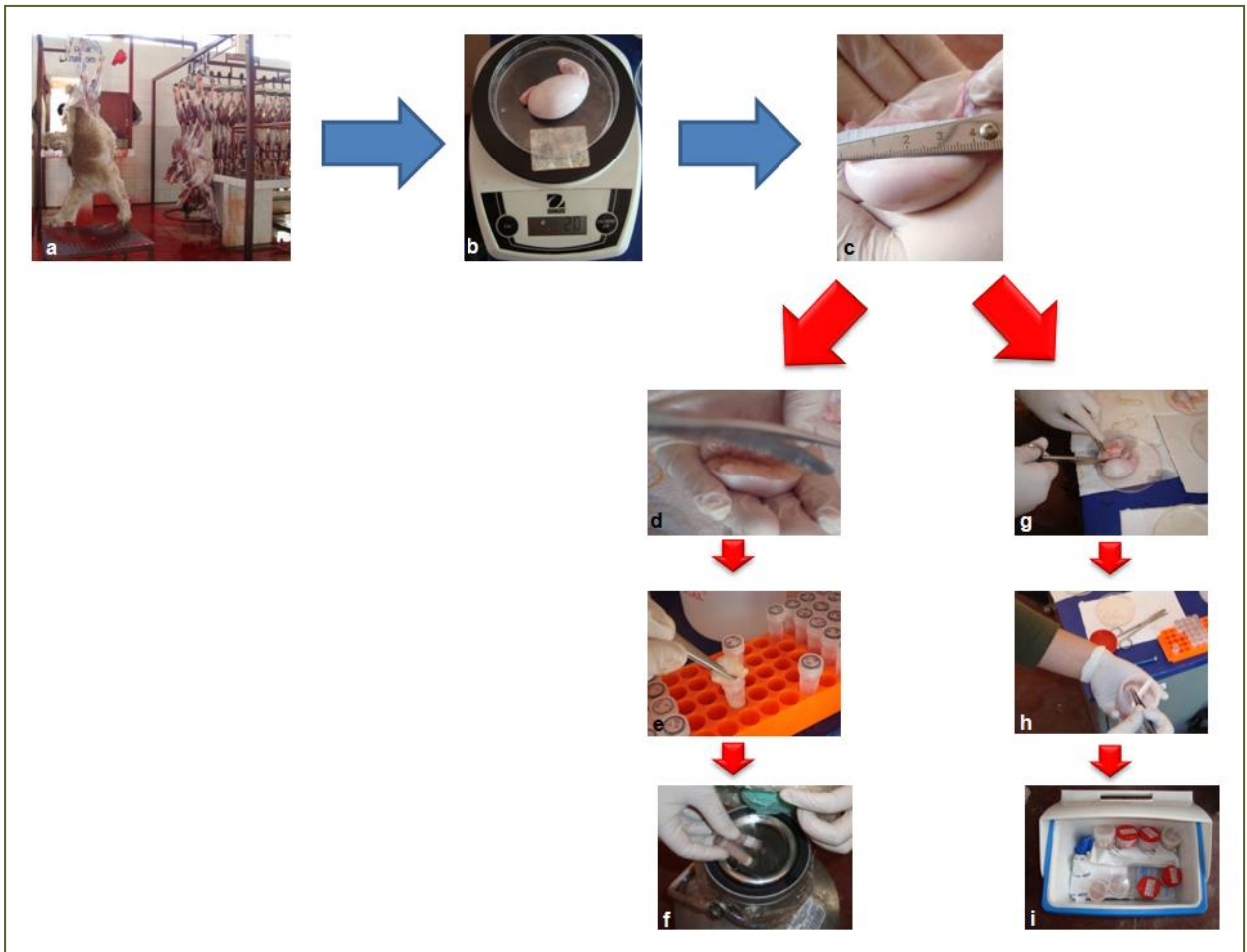


Figura N°3: Metodología de Muestreo. a. Canales de animales a muestrear. b. Pesaje de testículos. c. Medición de testículos. d. Biopsia testicular. e. Conservación de tejido testicular en crioviales. f. Conservación de crioviales en nitrógeno líquido. g. División del epidídimo. h. Almacenamiento del epidídimo en suero fisiológico. i. Transporte de los crioviales.

Conservación del epidídimo en suero fisiológico. i. Frascos conteniendo muestras de epidídimo a 4°C de temperatura.

2. Procedimiento Experimental

El criterio con el cual se formaron los grupos de investigación, estuvo basado en la evaluación del parámetro reproductivo de motilidad espermática. Esto se debe a que en otras especies (Nayernia *et al.*, 2005) existe correlación positiva entre la expresión del gen SMCP y la motilidad espermática.

Es por ello que se realizó la evaluación de las características espermáticas de los epidídimos muestreados. A partir de dicha evaluación se descartaron 17 individuos, por no presentar espermatozoides epididimarios. Por lo tanto el trabajo se realizó con un total de 34 individuos divididos en 2 grupos:

- Grupo I (n=20): Aquellos individuos que a la evaluación espermática presentaron una motilidad progresiva menor al 25%, los cuales fueron considerados de pobre motilidad.
- Grupo II (n=14): Aquellos individuos que presentaron motilidad progresiva mayor o igual al 25%, los cuales fueron considerados de motilidad normal a superior.

2.1. Evaluación Espermática.

Se realizó en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, y se tomaron en cuenta cuatro parámetros reproductivos: motilidad, concentración, vitalidad, e integridad de membrana.

Para la evaluación espermática se procedió a realizar la extracción de espermatozoides de epidídimo. Los epidídimos se lavaron con buffer fosfato salino (PBS) temperado a 37°C y se procedió a la total remoción del tejido conectivo que se encontraba alrededor de los mismos. Cada epidídimo se colocó en una placa Petri estéril, se dividió en secciones pequeñas y se realizó la suspensión de las secciones en 1 ml de PBS a una temperatura de 37 °C. Las

secciones obtenidas fueron prensadas suavemente con pinzas planas estériles, para lograr la salida de los espermatozoides de los conductos epididimarios. Dichos espermatozoides fueron recuperados en tubos Eppendorf de 1,5 ml de acuerdo a lo descrito por Banda *et al.* (2010).

Terminado todo este proceso, se realizó la evaluación individual de cada muestra espermática obtenida por epidídimo.

2.1.1. Concentración

La concentración fue evaluada de acuerdo al criterio establecido por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010). Se usó el método de recuento con cámara o hemocitómetro de Neubauer. Para lo cual se usó 10 μ l de solución inicial de espermatozoides diluidos en 990 μ l de agua, de esta solución se uso 10 μ l para ser realizado el conteo. Se contaron todos los espermatozoides que se encontraban en los 25 cuadrados. El número final de espermatozoides obtenido fue multiplicado por 10^6 espermatozoides por volumen de solución. El conteo fue realizado bajo observaciones en microscopía óptica de campo claro (400X)..

2.1.2. Motilidad Progresiva Total

La motilidad fue evaluada de acuerdo al criterio establecido por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2010) mediante el conteo porcentual de los patrones de motilidad que presentaban los espermatozoides. Los patrones considerados fueron:

- Motilidad A = motilidad progresiva rápida
- Motilidad B = motilidad progresiva lenta
- Motilidad C = motilidad no progresiva
- Motilidad D = inmóviles

Siendo determinado el parámetro de motilidad progresiva total como la suma de las motilidades progresivas A + B. Todo este análisis fue realizado bajo observaciones en microscopía óptica de campo claro (400X).

2.1.3. Vitalidad

Se realizó mediante el uso del colorante vital eosina. Para lo cual se incubó una gota de muestra con una gota del colorante a 37°C por quince minutos. El porcentaje de vitalidad se consigue al realizar el conteo de 100 espermatozoides y determinar cuántos de ellos tiñeron y cuantos no. Tomando en cuenta que:

- Espermatozoides incoloros: espermatozoides vivos
- Espermatozoides de color rosa: espermatozoides muertos.

Todo este análisis fue realizado bajo observaciones en microscopia óptica de campo claro (400X) (Figura N° 4).



Figura N°4: Vitalidad espermática. Flechas amarillas: señalan espermatozoides vivos. Flecha roja: señala espermatozoide muerto.

2.1.4. Integridad de Membrana

Se realizó el Test Hipoosmótico (HOS test), desarrollado por Jeyendran (1984) para evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática. Dicho test consiste en incubar 100 μ l de la muestra en 900 μ l de una solución de fructosa-citrato a 600 miliosmoles (mOsm) por treinta minutos a 37°C, si la membrana plasmática es funcional, se produce endósmosis, que se manifiesta con un enrollamiento o engrosamiento a nivel de la cola del espermatozoide. El porcentaje de integridad de membrana se consigue al realizar el conteo de 100

espermatozoides y determinar cuántos de ellos manifiestan los siguientes patrones:

- Espermatozoides con el flagelo enrollado o engrosado: espermatozoides con la membrana intacta.
- Espermatozoides con el flagelo recto, sin enrollamiento o engrosamiento de ninguna clase: espermatozoides con la membrana alterada.

Todo este análisis fue realizado bajo observaciones en microscopía óptica de campo claro (400X) (Figura N°5).



Figura N°5: Integridad de membrana espermática. Flechas amarillas: señalan a aquellos espermatozoides que reaccionaron positivamente al Test HOS (HOS +). Flechas rojas: señalan a aquellos espermatozoides que reaccionaron negativamente al Test HOS (HOS -)

2.2. Diseño de *Primers*.

Se realizó la búsqueda de los genes homólogos a SMCP de las especies más filogenéticamente relacionadas (cerdo y bovino) con alpaca, en la base de datos de secuencias FASTA del National Center for Biotechnology Information (NCBI). En el estudio genómico de la SMCP en dichas especies, se determinó que tal gen posee 2 exones y 1 intrón, y que a su vez en el interior del intrón se pueden observar 6 dominios conservados.

En base a esta información se realizaron los alineamientos de las secuencias

FASTA. Posteriormente se trabajó *in silico* con el programa FastPCR. Mediante el uso del programa perlprimer (<http://perlprimer.sourceforge.net/>), se buscó los *primers* más adecuados, para su posterior uso en la estandarización de la técnica de PCR convencional y electroforesis, y con ello identificar al homólogo de SMCP en alpaca.

2.2.1. Alineamientos

Se realizaron 3 alineamientos con la finalidad de determinar que *primers* serían los más adecuados, para el homólogo de SMCP en alpaca. El algoritmo de estimación utilizado para determinar la Temperatura Melting, fue el Santalucía.

Primer Alineamiento

El primer alineamiento se realizó entre las dos especies filogenéticamente más relacionadas a alpaca, *Sus scrofa* (Accession N°: NM_001008685) y *Bos taurus* (Accession N°: NM_001008417). Ya que no existe un secuenciamiento previo para alpaca.

Segundo Alineamiento

El segundo alineamiento se realizó entre *Sus scrofa*, *Bos taurus* y la secuencia *shotgun* de ADN genómico de alpaca que poseía mayor similitud con el primer alineamiento. La secuencia *shotgun* fue seleccionada utilizando el FASTA – Whole Genome Shotgun Sequence Similarity Search del European Bioinformatics Institute (www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/wgs.html).

Tercer Alineamiento

Para el tercer alineamiento se utilizó como referencia la secuencia de nucleótidos de los aminoácidos conservados de la proteína SMCP para *Sus scrofa* y *Bos taurus*.

Posteriormente en forma manual se realizó el alineamiento de la zona que comprendía el extremo 5' del exón 2, con la secuencia de *Lama pacos* que se

encuentra en el Genbank, con el fin de encontrar la secuencia de nucleótidos de los aminoácidos conservados.

Además se trabajó con el programa perlprimer, con el cual se obtuvieron 2 posibles *primers* para SMCP.

2.2.2. Generación *in silico* de amplicones

Mediante el uso de del programa FastPCR ©, se procedió a determinar el tamaño y la viabilidad de los posibles amplicones producto de la combinación de todos los *primers* obtenidos, con lo cual se obtuvo catorce posibles combinaciones, de las cuales los productos presentaban un tamaño probable de entre 459 bp hasta 100 bp.

2.2.3. Selección de *primers*

Los *primers* que fueron seleccionados para ser utilizados durante la técnica de PCR Real Time fueron aquellos que después de la técnica de PCR convencional mostraron un patrón de bandeo positivo durante la electroforesis.

2.3. Extracción de RNA.

Una vez descongeladas las muestras en baño maría se procedió a la extracción de RNA. Para la realización de dicha técnica se utilizó el reactivo TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones comerciales con algunas modificaciones. La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro, tomando la medida de absorbancia de A260, la corresponde a 40 µg de RNA.

2.4. Formación de cDNA.

Se formó cDNA mediante el uso de **kits comerciales**. La cuantificación también se llevó a cabo mediante el uso de un espectrofotómetro, tomando la medida de absorbancia de A260, la cual corresponde a 50 µg de cDNA.

2.5. Estandarización de la técnica de PCR convencional

El PCR convencional es una técnica desarrollada durante los años ochenta por Kary Mullis y Fallona (1987), la cual se basa en el descubrimiento de la actividad biológica a altas T° de las DNA polimerasas encontradas en bacterias termófilas. Tiene como propósito generar un gran número de copias de un fragmento de DNA de interés *in vitro*. La concentración de copias del gen aumenta exponencialmente, ya que en cada ciclo se copian las dos cadenas del DNA.

Como parte de la estandarización de la técnica de PCR convencional para detectar en forma cualitativa la expresión del gen de SMCP en alpaca, se procedió a la adaptación de la mezcla de reacción. Para la misma se utilizó un volumen final de 50 µl, utilizando solución tampón de amplificación (200 µM Tris HCl, 500 µM KCl pH 8,4), 2 µM MgCl₂, 0,2 µM de dNTPs, 0,2 µM de *housekeeping* (GAPDH) y 1 µM de *primer* para SMCP, 5 ng/ml de cDNA blanco, 2 UI *Taq* DNA Polimerasa.

El programa de termociclación asignado fue el presentado en la Tabla N°1.

Tabla N°1: Temperaturas y ciclos empleados para PCR convencional

	Temperaturas (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)	Ciclos
Iniciación	94	00:05:00	1
Desnaturalización	94	00:00:30	35
Annealing	58	00:00:30	
Elongación	72	00:00:30	
Elongación Final	72	00:05:00	1

La resolución de los fragmentos amplificados por PCR se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% (p/v) en solución tampón de corrida TBE (0,09 M Tris-Borato; 0,002 M EDTA) y teñidos con bromuro de etidio al 0,005% (v/v). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 10 volt/cm. Y por último, se realizó la observación de los fragmentos amplificados.

2.6. Cuantificación de la expresión de SMCP mediante RT-qPCR.

La RT-qPCR (transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) se realizó con el sistema LightCycler 480 II (Roche Applied Science, Basel, Suiza) (Figura N° 6), en donde el producto de PCR en tiempo real fue medido por la señal fluorescente del SYBR Green I, con 530nm de longitud de onda de emisión.



Figura N° 6: Light Cycler 480 II (Roche)

La mezcla de reacción utilizada fue de 12 μ l de PCR que contenía: 1.2 μ l de cDNA blanco, 0.8 μ l de $MgCl_2$ (1.5mM), 1.2 μ l de cada *primer* (0.5 μ M, concentración final), 1.2 μ l del Master DNA SYBR Green I (Roche) y 6.4 μ l de agua de grado molecular, fueron agregados a los capilares y cargados al equipo LightCycler 480 II.

El programa de termociclación asignado contó con las temperaturas y ciclos que se muestran a continuación (Tabla N°2)

Tabla N°2: Temperaturas y ciclos empleados para cuantificación relativa por RT-PCR en tiempo real.

	Ciclos	Temperaturas (°C)	Tiempo (hh:mm:ss)	Rampa (°C / s)	Medición de fluorescencia
Preincubación	1	96	00:05:00	4.8	No
Amplificación	30	95	00:00:10	4.8	No
		60	00:00:10	2.5	Simple
		72	00:00:10	4.8	No
Disociación	1	95	00:00:05	-	No
		65	00:01:00	0.03	Continua
Enfriamiento	1	40	00:00:10	2	No

Los datos obtenidos fueron evaluados usando el software del LightCycler 480 II. Dichos datos fueron expresados en una plataforma RAS para análisis de expresión génica. Se trabajó con el formato para 96 muestras.

2.7. Análisis Estadísticos

Se utilizó el programa estadístico Prism® v. 3.0. Los porcentajes de motilidad, concentración, espermatozoides HOS (+) y viabilidad se transformaron a valores angulares ($\text{ángulo} = \arcseno \sqrt{x}$) para acercar los datos a la distribución normal. Para determinar si existen diferencias estadísticas se utilizó la prueba de T-student. Además se realizó el análisis de correlación de Spearman para los parámetros de motilidad y expresión génica de SMCP.

V. RESULTADOS

5.1. Resultados de motilidad, concentración, vitalidad e integridad de membrana de espermatozoides epididimarios de alpaca.

Los valores promedios obtenidos para los parámetros reproductivos evaluados se muestran a continuación en la Tabla N°3.

Tabla N°3: Promedio de los parámetros de calidad espermática.

Parámetro de calidad espermática	Grupo I (n = 20)	Grupo II (n = 14)	Valor p
Motilidad progresiva total (%)	5,54 ± 1,08 ^a	38,54 ± 4,18 ^b	p<0,0001
Concentración (espermatozoide x 10 ⁶ / ml)	89,90 ± 86,12 ^a	101,4 ± 71,44 ^a	p=0,3153
Vitalidad (%)	82,70 ± 7,73 ^a	81,79 ± 9,01 ^a	p=0,2638
Integridad de membrana (%)	58,13 ± 22,07 ^a	48,37 ± 8,94 ^b	p=0,0009

Los valores se expresan en promedio ± desviación estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencias significativas (p<0,05)

5.2. Alineamientos

Como resultado de los tres alineamientos realizados con la finalidad de diseñar *primers* para el homólogo de SMCP en alpaca, se obtuvieron ocho *primers*.

Primer Alineamiento

El primer alineamiento se realizó entre las secuencias de nucleótidos del gen de SMCP de las dos especies más relacionadas filogenéticamente con alpaca: *Sus scrofa* (Accession N°: NM_001008685) y *Bos taurus* (Accession N°: NM_001008417) (Figura N°8).

En este primer alineamiento se logró determinar la ubicación del dominio 1 del gen de SMCP para estas dos especies. Debido a que esta zona no se encuentra secuenciada en alpaca, se diseñó un *primer* a partir de este alineamiento (Tabla N°4).

Tabla N°4: *Primer* diseñado a partir del primer alineamiento

<u>Primer DOM 1</u>	
Secuencia= TGGAYTCACTAGGCTGCTGA	Tm= 61,615

Segundo Alineamiento

El segundo alineamiento se realizó entre *Sus scrofa*, *Bos taurus* y la secuencia *shotgun* de ADN genómico de alpaca que poseía mayor similitud con el primer alineamiento (Figura N° 9).

Con este segundo alineamiento se pudo reconocer los dominios 3, 4, 5 y 6. Con lo cual se diseñaron los *primers* para tales dominios. Estos *primers* fueron diseñados en base al exón 2, secuenciado en alpaca, el cual consistía en todo el ORF más el 3'UTR (Tabla N° 5).

Tabla N°5: *Primers* diseñados a partir del segundo alineamiento.

<u>Primer DOM 3</u>		
FDOM3.	Secuencia= GCTGTTTGGAGCCCAAGC	Tm= 64,34°C
<u>Primer DOM 4</u>		
FDOM4	Secuencia= CCAAAGTCCAAAAGTGGAGC	Tm= 61,78°C
<u>Primer DOM 5</u>		
FDOM5	Secuencia= GGGTCAGGCTAGACCTAC	Tm= 60,39 °C
RDOM5	Secuencia= GTAGGTCTAGCCTGACCC	Tm= 60,39 °C
<u>Primer DOM 6</u>		
RDOM6	Secuencia= CCACTAGGAGAGATGGTTC	Tm= 60,35 °C

Tercer Alineamiento

Como resultado del alineamiento de las secuencias de nucleótidos de la proteína SMCP para *Sus scrofa* y *Bos taurus*, se pudo obtener la secuencia de los aminoácidos conservados de dicha proteína, la cual es: MCDQPKCN. Luego en forma manual se buscó realizar el alineamiento entre las secuencias de nucleótidos de los aminoácidos conservados con la secuencia de *Lama pacos* que se encuentra en el Genbank (Figura N°11). Con lo cual se logró visualizar la ubicación del dominio 2 del gen de SMCP. Y en base a esta información se diseñaron dos *primers* mediante el uso del programa perlprimer (Tabla N° 6)

Tabla N° 6: *Primers* diseñados por el programa perlprimer a partir del tercer alineamiento.

<u>PERLF</u>		
Forward <i>Primer</i>	Secuencia= CGTGCCTTAACAAGGAGAC	Tm= 60,66
<u>PERLR</u>		
Reverse <i>Primer</i>	Secuencia= GATGGTTCTAGCCTCTTCAG	Tm= 59,55

```

Sus_scrofa 1 -----GGRAACG-AICT 11
Bos_taurus 1 -----GAGAACTTTGACACAAGCAGGCTACAAAAGG-AITTT 36
pacosABRR01385616.1 1 AGCTAAGAGACCTTAGSCAAAATTCCTACACATCCGATCTTTCCCTTTCTA-TC-IGGAAA-AC--GGCTCCCTGGTGGAGAACCCCGCCT--TGACACGTGAAAGCACAGAAATGGG 113
Clustal Consensus 1 *****

Sus_scrofa 12 GCTTCTGATAGTCTGGACTCACTAGCTGC-TGAGGGAGATCTACCTGCTCCGGGCCGGGGGAGGTTTCTGAGBAAGCCAGCCCA-GAACCATGAC--TAAG--AAAG 125
Bos_taurus 37 GCTTCTGATAGTCACTAGCTAGCTGC-TGAGCGAGGAGATCTACCTGCTCCGGGCCGGGGGAGGTTTCTGAGBAAGCCAGCCCA-GAACCATGAC--TAAG--AAAG 138
pacosABRR01385616.1 113 -GACATGCTGTGCTTCTGAGCTCCAGCCTGTCTGTGTCATGATCTGAAGATGGATTTGGGGTCCAAAGAAG--GGGACATGAATGCAGGCGATAACTTTCCTTCGTGAGAA 231
Clustal Consensus 36 *****

Sus_scrofa 126 CACAGAGA-GAAG-TAGTCAGAGCAGGGGCTCCAAAACCTGTAAGATGTGTGACCAACCAAAATGCAACCAATGC-TGCCCCCAAAGCCGGAGT---GCTGCCCCCAA--GC--C 234
Bos_taurus 139 GACAAAAAGAG-TGACAGAGCAGACCCCAAAACTTGAGBAAGATGTGTGACCAACCAAAATGCAACCAATGC-TGCCCCCAAAGCCGGAGT---GCTGCCCCCAA--GC--C 234
pacosABRR01385616.1 232 TGTCTGTTTGTITTT-TGTCCTAG-GACCTCCAAAACCTCCAGAAATGTGTGACCAACCAAAATGCAACCAATGC-TGCCCCCAAAGCCGGAGT---GCTGCCCCCAA--GC--C 343
Clustal Consensus 79 ***** M C D Q P K C N

Sus_scrofa 235 CCAGTGC-TGCCCC-CAAAA--GC--CCAGTGTGCTCCGCCAAA--GC--CCAGTGTGCTGCCCCAGCAGAA~----- 317
Bos_taurus 256 CCAA-GC-TGCCCG-ACAAAATGCAACCCA-TGCTGCCCAACCAAAATGCAACCCCGTGTGCCAAATGCAACCCA-TGCTGC--CCATCAAAGC~----- 346
pacosABRR01385616.1 344 CCGTGTGCATTCAAACCA-- 362
Clustal Consensus 133 ***** ** * *

Sus_scrofa 317 317
Bos_taurus 346 ~~~~~ 346
pacosABRR01385616.1 362 362
Clustal Consensus 143 143

```

Fig.ura N° 11. Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos de los aminoácidos conservados de la proteína SMCP y la secuencia de *Lama pacos* gen Genbank.

5.3. Análisis *In Sílico*

A través del uso del programa FastPCR ©, se realizaron en forma *in sílico* las combinaciones de los *primers* obtenidos de los alineamientos. Como resultado de todas las posibles combinaciones se obtuvieron catorce posibles amplicones. A continuación se muestran las combinaciones de *primers* y el tamaño de los posibles amplicones resultantes (Tabla N°7).

Tabla N°7. Combinaciones de Primers y el tamaño de los posibles amplicones

	Primer	Secuencia	Tamaño del producto
Combinación 1	>fdom2	5'-gaagatgtgtgaccaaccaa	459bp
	>rdom6	5'-ccactaggagagatggttc	
Combinación 2	>fdom2	5'-gaagatgtgtgaccaaccaa	448bp
	>perlr	5'-gatggttctagcctcttcag	
Combinación 3	>rdom6	5'-ccactaggagagatggttc	361bp
	>fdom3	5'-gctgttggagcccaagc	
Combinación 4	>fdom3	5'-gctgttggagcccaagc	350bp
	>perlr	5'-gatggttctagcctcttcag	
Combinación 5	>rdom6	5'-ccactaggagagatggttc	334bp
	>perlf	5'-cgtgccttaacaaggagac	
Combinación 6	>perlf	5'-cgtgccttaacaaggagac	323bp
	>perlr	5'-gatggttctagcctcttcag	

Combinación 7	>fdom2	5'-gaagatgtgtgaccaaccaa	322bp
	>rdom5	5'-gtaggtctagcctgaccc	
Combinación 8	>rdom6	5'-ccactaggagagatggttc	237bp
	>fdom4	5'-ccaaagtccaaaactggagc	
Combinación 9	>fdom4	5'-ccaaagtccaaaactggagc	226bp
	>perlr	5'-gatggttctagcctcttcag	
Combinación 10	>fdom3	5'-gctgtttggagcccaagc	224bp
	>rdom5	5'-gtaggtctagcctgaccc	
Combinación 11	>rdom5	5'-gtaggtctagcctgaccc	197bp
	>perlf	5'-cgtgccttaacaaggagac	
Combinación 12	>rdom6	5'-ccactaggagagatggttc	155bp
	>fdom5	5'-gggtcaggctagacctac	
Combinación 13	>fdom5	5'-gggtcaggctagacctac	144bp
	>perlr	5'-gatggttctagcctcttcag	
Combinación 14	>fdom4	5'-ccaaagtccaaaactggagc	100bp
	>rdom5	5'-gtaggtctagcctgaccc	

5.4. Resultados de la técnica de PCR convencional.

El protocolo aplicado en la extracción de cDNA fue satisfactorio, obteniéndose concentraciones de aproximadamente de 18ng para cada muestra de testículo de 1cm³, con los cuales se realizó la técnica de PCR convencional.

De las combinaciones de *primers* seleccionados en forma *in silico*, fue la combinación de fdom 4 <5'-ccaaagtccaaaactggagc> y rdom5 <5'-gtaggcttagcctgaccc>, la que generó un transcripto con un tamaño de banda sumamente específico de 110bp durante la electroforesis (Figura N° 12).

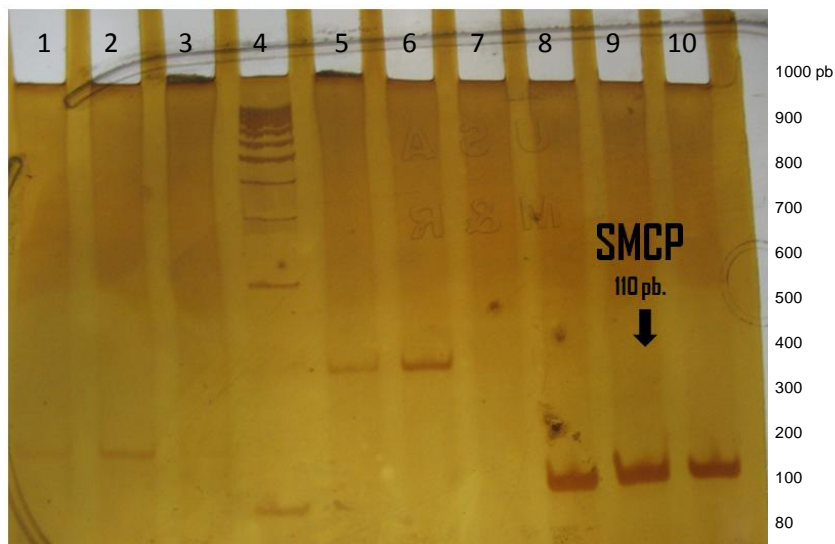


Figura.N°12: Gel de agarosa al 1% TBE 1X. Las bandas presentes, corresponden a DNA de un peso molecular de 110 pb. Las bandas en los carriles 8, 9 y 10 son claras.

Fueron estos *primers* (fdom 4 – rdom 5), los que posteriormente se usaron en la técnica de PCR real-time.

5.5. Resultados de la técnica de PCR en tiempo real.

Los resultados de los valores de expresión del gen de SMCP en alpaca para la técnica de PCR en tiempo real se muestran a continuación en la Tabla N°8.

Tabla N°8: Valores de expresión del gen homólogo de SMCP en alpaca.

	Grupo I (n=20)	Grupo II (n=14)	Valor p
Valores de expresión	1,598 ± 1,246 ^a	3,524 ± 2,730 ^b	p=0,0011

Los valores se expresan en promedio ± desviación estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencias significativas (p<0,05)

5.6. Resultados de la Correlación entre la motilidad espermática y la expresión génica de SMCP

Los resultados que se obtuvieron con respecto a la correlación existente entre los cuatro patrones de motilidad espermática (A, B, C y D) y la expresión génica de SMCP nos muestran una baja correlación positiva. Siendo los valores de dichas correlaciones los que se muestran a continuación en la Tabla N° 9.

Tabla N°9: Correlación entre los cuatro patrones de motilidad espermática y la expresión génica de SMCP.

Correlación	Valor r	Valor p
Motilidad A vs. Expresión génica	0,3403	p = 0,0489
Motilidad B vs. Expresión génica	0,4413	p = 0,0090
Motilidad C vs. Expresión génica	- 0,02433	p = 0,8913
Motilidad D vs. Expresión génica	- 0,3946	p = 0,0209

Valor de $P > 0,05$ indica correlación significativa

VI. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primer reporte de la identificación y determinación de los niveles de expresión del gen de Proteína rica en Cisteína asociada a la Mitocondria Espermática (SMCP) en tejido testicular de alpaca.

La importancia de la SMCP, la cual fue reportada por primera vez en la década del 70 en bovinos (Pallini y Bacci, 1979), radica en que se encuentra íntimamente relacionada con la estructura de la vaina mitocondrial del flagelo espermático (Cataldo *et al.*, 1981) y por ende con los porcentajes de motilidad espermática progresiva según lo demostrado por Nayernia *et al.* (2002). Es por ello que la identificación de un gen en alpaca con características de homología al gen SMCP que codifica dicha proteína en ratón (Kleene *et al.*, 1990), se hace sumamente necesaria como parte de un programa de selección de reproductores.

Para la evaluación de la motilidad espermática en alpaca, lo ideal sería poder trabajar con muestras procedentes de eyaculados de los animales escogidos para el estudio; sin embargo, hasta la actualidad no ha sido desarrollada una técnica sencilla y confiable para colectar semen en esta especie. Esta dificultad radica en el comportamiento sexual de los camélidos sudamericanos, el cual está marcado por la duración de la copula, la posición especial de la misma, el lugar de depósito del semen, el tipo de eyaculación e incluso el temperamento nervioso de los machos (Bustinza, 2001). Esto ha generado que la colección de semen en alpacas haya sido considerada por los investigadores, como uno de los más grandes obstáculos para la evaluación de la capacidad reproductiva de los machos. Es por ello que en la actualidad se vienen desarrollando diversos trabajos con muestras de espermatozoides procedentes de epidídimo, los mismos que generalmente son obtenidas post-beneficio o post-castración.

Trabajos previos realizados en ratones para determinar la expresión de SMCP (Nayernia *et al.*, 2002; Nayernia *et al.*, 2005) emplearon espermatozoides de epidídimo para determinar los parámetros espermáticos (motilidad, vitalidad, concentración, morfología, etc) en esta especie. Es por ello y por las dificultades

que se enfrenta al querer realizar la técnica de colección de semen en alpaca, que el presente trabajo se realizó utilizando espermatozoides epididimarios.

En la actualidad no se ha descrito si es que la motilidad y la vitalidad espermática, se ven afectadas por la técnica de recuperación de epidídimo, ya sea esta post- beneficio o post-castración del animal. Cabe resaltar que las muestras que manejamos en este estudio procedían de animales beneficiados en el camal municipal de Huancavelica y luego fueron trasladadas a Lima para su análisis.

Investigaciones anteriores (Banda *et al.*, 2010; Rodríguez, 2009; González, 2008; Morton *et al.*, 2007), realizaron la evaluación de las características espermáticas de muestras procedentes de epidídimo de alpacas beneficiadas, y el efecto del intervalo de tiempo entre el beneficio y la evaluación sobre las características espermáticas. Dichas investigaciones se realizaron entre 8 a 72 horas post-beneficio o castración, encontrándose que el tiempo idóneo para obtener una motilidad adecuada para trabajar dichas muestras es menor a 35 horas (Banda *et al.*, 2010). La evaluación de las características espermáticas de nuestras muestras se realizó alrededor de las 20 -24 horas post-beneficio, lo cual estaría contemplado dentro del tiempo adecuado de evaluación y explicaría el por qué los valores promedio de motilidad progresiva total (motilidad A + B) en ambos grupos (Grupo I = $5,54 \pm 1,08$ %; Grupo II = $38,54 \pm 4,18$ %) serían superiores a los encontrados por Banda *et al.* (2010) a las 35 horas post-beneficio ($3,8 \pm 4,8$ %).

Hemos observado que el Grupo I presentó una motilidad progresiva total promedio de 5.5 %, valor sumamente bajo y de alguna manera esperado para machos con baja calidad espermática en esta especie. Mientras que el Grupo II presentó una motilidad progresiva total promedio de 38.5%, lo cual supera el valor esperado para muestras de espermatozoides epididimarios la cual es de 31,3% (Banda *et al.*, 2010).

Sin embargo, trabajos previos realizados utilizando como metodología el uso de la vagina artificial arroja resultados que varían entre 20,18% (Sumar y Leiva,

1981) y un 80,0 % (Bravo *et al.*, 1997), esto se debería al hecho de que al momento de la eyaculación los espermatozoides entran en contacto con el plasma seminal, el mismo del cual reciben sustratos energéticos como glucosa y fructuosa. Además los factores que mantienen la quiescencia (inamovilidad) espermática en la cola del epidídimo, como la carnitina, son diluidos por el plasma seminal (Gagnon y Lamirande, 2006). Es por todas estas características fisiológicas generadas por el contacto con el plasma seminal durante la eyaculación que se observaría un mayor porcentaje de motilidad progresiva en los espermatozoides producto de un eyaculado en comparación con los extraídos de epidídimo.

El motivo por el cual el porcentaje de motilidad progresiva sería tan variable cuando se utiliza el método de vagina artificial podría estar relacionado a la metodología utilizada para la ruptura del gel del plasma seminal, ya que en camélidos el plasma seminal tiene una consistencia sumamente viscosa lo cual limita su manipulación. Para poder lisar ese “gel”, se utilizan métodos mecánicos y químicos. El método mecánico es el uso de una jeringa con la cual se aspira y se vota el gel hasta lograr licuarlo, al parecer este método sería el menos nocivo, El método químico es realizado mediante el uso de enzimas proteolíticas con el fin de lisar el coagulo, pero estas enzimas tienen efectos negativos sobre la viabilidad y motilidad de los espermatozoides, las cuatro que se utilizan son: fibrinolisisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina, las cuales generalmente se ocupan a una concentración de 1:1 con el semen (Pacheco, 2008).

Con respecto a los demás parámetros espermáticos evaluados (concentración, vitalidad e integridad de membrana), se puede observar que según la recopilación realizada por Pacheco (2008), los resultados obtenidos en investigaciones previas distan de los obtenidos en el presente trabajo. Esto se debería a que en dichos trabajos las muestras analizadas se obtuvieron por métodos diferentes a la extracción de espermatozoides epididimarios. Sin embargo, los valores obtenidos por Banda *et al.* (2010), Rodríguez (2009), González (2008) y Morton *et al.* (2007) los cuales trabajaron con espermatozoides epididimarios, presentan similitud, con los mostrados en nuestro trabajo, lo cual sería lo esperado y nos llevaría a pensar que los animales

con los que hemos trabajado se encuentran dentro del promedio de lo que es la población de camélidos machos.

Cuando analizamos los parámetros de calidad espermática evaluados y realizamos la comparación entre ambos grupos, observamos que existe diferencia estadística significativa en los parámetros de motilidad progresiva total ($p < 0.0001$) e integridad de membrana espermática ($p = 0.0009$). Pero por otro lado no existe diferencia estadística significativa entre los parámetros de concentración ($p = 0.3153$) y vitalidad ($p = 0.2638$). Además podemos observar que por más que el Grupo I posee un muy bajo porcentaje de motilidad progresiva total, este grupo también posee un muy buen porcentaje de espermatozoides con integridad de membrana, el cual inclusive, es mayor que el observado en el Grupo II el cual posee un muy buen porcentaje de motilidad progresiva total. Esto nos lleva a pensar que todos los parámetros de calidad espermática evaluados durante nuestra investigación no se encuentran correlacionados y por ende la expresión del gen SMCP no se encuentra correlacionada con todos los parámetros espermáticos.

Con respecto a la expresión génica de SMCP. Fue mediante el uso de herramientas bioinformáticas, que se demostró que el transcripto producido como parte de este estudio, es homólogo del gen de SMCP en alpacas. Para ello se realizaron alineamientos con las secuencias de nucleótidos de los genes homólogos de SMCP de dos especies filogenéticamente relacionadas a alpaca, siendo *Sus scrofa* (N° Acceso: NM_001008685) y *Bos taurus* (N° Acceso: NM_001008417), los seleccionados por pertenecer al orden artiodáctila.

También se realizó el alineamiento manual entre la secuencia de nucleótidos del genoma borrador de *Lama pacos* del GenBank (BLASTn/NCBI) con la secuencia de nucleótidos de los aminoácidos conservados de la proteína SMCP de *Sus scrofa* y *Bos taurus* mediante el uso del programa ClustalX2, metodología utilizada previamente por Aho *et al* (1996). Una vez realizados los alineamientos se pudo diseñar *primers* para el gen SMCP en alpaca. Siendo el *primer forward*: 5'-ccaaagtccaaaactggagc y el *primer reverse*: 5'-gtaggctctagcctgaccc, que generaron un producto de PCR de 110 pb. Lo cual nos lleva a concluir que dichos

primers son de utilidad para la detección de SMCP en tejido testicular de alpaca, por más que el producto de PCR es un mRNA parcial cds. que dista del tamaño encontrado para las secuencias de DNA de los homólogos de SMCP en perro (3829 nt), toro (4134 nt), ratón (4269 nt), rata (4147 nt) y humano (5956 nt) (Hawthorne *et al* 2006).

Al analizar la expresión génica de SMCP en ambos grupos, observamos que esta es significativamente mayor ($p < 0,01$) en el grupo Grupo 1 ($1,598 \pm 1,246$) en comparación al Grupo 2 ($3,524 \pm 2,730$), a pesar que aparentemente los desvíos estándares son muy altos. Asimismo, el intervalo de confianza al 95% en el Grupo 1 es $1,598 \pm 0,583$, mientras que en el grupo 2 es $3,524 \pm 1,343$. Es decir que el 95% de los valores de expresión génica en el Grupo 1 deben estar entre 1,015 a 1,947, mientras que en el Grupo 2 están entre 2,181 a 5,100. Es decir que si bien los desvíos estándares son aparentemente altos, al analizar el intervalo de confianza se deduce que la mayoría de valores en cada grupo se concentran en rangos diferentes, explicando así la diferencia estadística encontrada.

Los resultados hallados en nuestro trabajo con respecto a la correlación entre los patrones de motilidad espermática y la expresión génica nos indican que la expresión del gen SMCP en alpaca está correlacionada positivamente, aunque de forma débil pero significativa, tanto con la motilidad progresiva rápida (motilidad A) cuyo $r = 0,3403$, como con la motilidad progresiva lenta (motilidad B) cuyo $r = 0,4413$. De ello se infiere que a mayor expresión génica de SMCP mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva total (motilidad A + B), la cual es la encargada de la migración de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra. Cuando analizamos la correlación existente entre la expresión génica y la motilidad espermática no progresiva (motilidad C), obtuvimos como resultado que no existía correlación entre estas dos variables. Esto se explica por qué la motilidad no progresiva se presenta en aquellos espermatozoides que se mueven en forma circular u oscilatoria sin conseguir avanzar. En cambio, al analizar la motilidad espermática D (espermatozoides no motiles) y su correlación con la expresión génica de SMCP, se observó que existe una correlación negativa entre ellos ($r = -0,3946$). De lo cual se deduce que ha

mayor número de espermatozoides no motiles en la muestra existe una menor expresión de expresión génica. Es por ello que todos los valores de correlación obtenidos nos llevan inferir que la expresión del gen SMCP en alpacas esta correlacionado positivamente, con la motilidad progresiva total.

Con respecto a la información de la secuencia de nucleótidos del producto de PCR de 110 pb que se generó a partir del presente trabajo, esta se encuentra depositada en el Genbank con código de accesoión HQ412591.

VII. CONCLUSIONES

- Existe un gen homólogo del gen SMCP en alpacas..
- Existe una baja correlación positiva entre motilidad espermática y la expresión génica de SMCP a nivel de tejido testicular.
- El gen de SMCP en alpaca propondría servir como un marcador molecular de motilidad espermática, y con ello implementar una nueva metodología para los sistemas de selección de machos reproductores.

VIII. RECOMENDACIONES.

- Se recomienda realizar otros trabajos relacionados a determinar los niveles de expresión del gen SMCP de alpaca, en otro tipo de tejidos que faciliten el manejo y sean menos invasivos con los animales.
- También es recomendable determinar los niveles de expresión del gen SMCP en alpacas hembras para determinar si la hembra hereda esta característica genética a su progenie.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1) Adham, I.M.; Tessmann, D.; Soliman, K.A.; Murphy, D.; Kremling, H.; Szpirer, C.; Engel, W. 1996. Cloning, expression, and chromosomal localization of the rat mitochondrial capsule selenoprotein gene (MCS): the reading frame does not contain potential UGA selenocysteine codons. *DNA Cell Biol.* 15:159– 166.
- 2) Aho, H.M.; Schwemmer, D.; Tessmann, D.; Murphy, G.; Mattei, W.; Engel, W.; Adham, I.M. 1996. Isolation, expression and chromosomal localization of the human mitochondrial capsule selenoprotein gene (MSCP), *Genomics* 32:84– 190.
- 3) Ax, R.L.; Dally, B.A.; Didion, R.W.; Lenz, C.C.; Love, D.D.; Hafez, B.; Bellini, M.E. 2000. Semen evaluation. En: Hafez, E.S.E., Hafez, B. (Eds.), *Reproduction in Farm Animals. Séptima Edición.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 218–236.
- 4) Banda, J.; Evangelista, S.; Ruiz, L.; Sandoval, R.; Rodríguez, C.; Valdivia, M.; Santiani, A. 2010. Efecto de dilutores en base a TRIS, TES y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev. Inv. Vet.* 21: 145-153.
- 5) Bravo, P.; Flores, U.; Garnica, J.; Ordoñez, C. 1997. Collection of semen and insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626.
- 6) Brown, B.W. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 169–195.
- 7) Bustinza, V. 2001. *La Alpaca.* 1era edición. Tomo I. Editorial Universitaria. Puno. Perú.
- 8) Calvin, H. I. y Bedford, J. M. 1971. Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 13: 65–75.
- 9) Calvin, H. I.; Cooper, G. W.; Wallace, E. W. 1981. Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteine-rich structural protein of the mitochondrial capsule. *Gamete Res.* 4: 139–149.

- 10) Calvin, H. I.; Grosshans, K.; Musicant-Shikora, S. R.; Turner, S. I. 1987. A developmental study of rat sperm and testis selenoproteins. *J. Reprod. Fertil.* 81: 1–11.
- 11) Cataldo, L.; Baig, K.; Oko, R.; Mastrangelo, M.-A.; Kleene, K.C. 1996. Developmental expression, intracellular localization and selenium content of the cysteine-rich protein associated with the mitochondrial capsules of mouse sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 45:320–331.
- 12) Eddy, E.M.; Toshimori, K.; O'Brien D.A. 2003. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc. Res. Tech.* 61:103– 115.
- 13) Eddy, E.M. 2006. The spermatozoon. En: Knobil, E. y Neill, J. *Physiology of reproduction*. Tercera Edición. Elsevier. Estados Unidos de Norteamérica. pp. 3 – 54.
- 14) Eisenbach, M. 1999. Mammalian sperm chemotaxis and its association with capacitation. *Dev. Genet.* 25:87–94
- 15) Escalier, D. 2006. Knockout mouse models of sperm flagellum anomalies. *Hum. Reprod.Update.* 12(4): 449–461
- 16) Esponda, R.; Avalos, P.; Huanco, C.; Huaco, Y. 2004. Situación de los camélidos sudamericanos en el Perú. En: *Bases para un Programa Macro regional de Ciencia, Tecnología e Innovación*. CONCYTEC-CONACS. Lima (Perú).
- 17) F.A.O. 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú. p. 62.
- 18) Fernández-Baca S. y Calderon, V. M. 1963. Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev. Fac.Med.Vet UNMSM.* 18:13-26.
- 19) Fernández-Baca, S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 307–323.
- 20) Gagnon, C. y Lamirande, E. 2006. Controls of sperm motility. En: De Jonge, y C. Barrant, C. (Eds.). *The Sperm Cell. Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*. Cambridge University Press. U.K. pp. 198 – 133.
- 21) Gonzales, H. 2008. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia* 10: 223-234

- 22) Hawthorne, S.K.; Goodarzi, G.; Bargarova, J.; Gallant, K.E.; Busanelli, R.R.; Olend, W.J.; Kleene, K.C. 2006. Comparative genomics of the sperm mitochondria-associated cysteine-rich protein gene. *Genomics* 87: 382 – 391
- 23) Kleene, K.C.; Smith, J.; Bozorgzadeh, A.; Harris, M.; Hahn, L.; Karimpour, I.; Gerstel, J. 1990. Sequence and developmental expression of the mRNA encoding the seleno-protein of the sperm mitochondrial capsule in the mouse. *Dev. Biol.* 137: 395-402.
- 24) Jeyendran, R.; Van Der Ven, H.; Perez-Pelaes, M.; Crabo, B.; Zaneveld, L. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert.* 70:219-228.
- 25) Morton, K.M.; Bathgate, R.; Evans, G.; Maxwe, W.M.C. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-based, Tris-based and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fert Dev.* 19: 792-796
- 26) Mukai, C. y Okuno, M. 2004. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod.* 71, 540–547.
- 27) Mullis, K.B. y Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50
- 28) Nayernia, K.; Adham, I.M.; Burkhardt-Goote, E.; Neesen, J.; Rieche, M.; Wolf, S.; Sancken, U.; Kleene, K.; Engel, W. 2002. Asthenozoospermia in mice with a targeted deletion of the sperm mitochondria associated cysteine-rich protein (Smcp) gene. *Mol. Cell. Biol.* 22: 3046– 3052.
- 29) Nayernia, K.; Drabent, B.; Meinhardt, A.; Adham, I.M.; Schwandt, I.; Müller, C.; Sancken, U.; Kleene, K.C.; Engel, W. 2005. Triple Knockouts Reveal Gene Interactions Affecting Fertility of Male Mice. *Mol. Reprod. Dev.* 70:406–416
- 30) Pacheco, J. 2008. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *Redvet.* 9(5):1-15.
- 31) Pallini, V. y Bacci, E. 1979. Bull sperm selenium is bound to a structural protein of mitochondria. *J. Submicr. Cytol.* 11:165–170.

- 32) Radonic, A.; Thulke, S.; Mackay, I.M.; Landt, O.; Siegert, W.; Nitsche, A. 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 313:856–62.
- 33) Rikmenspoel, R. 1984. Movements and active moments of bull sperm flagella as a function of temperature and viscosity. *J. Exp. Biol.* 108: 205–230.
- 34) Rodríguez, C. 2009. Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Mag. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 72 p
- 35) Serres, C.; Feneux, D.; Jouannet, P.; David, G. 1984. Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res.* 9: 183–195.
- 36) Shih, D. M. y Kleene, K. C. 1992. A study by in situ hybridization of stage of appearance and disappearance of the transition protein 2 and mitochondrial capsule selenoprotein mRNA during spermatogenesis in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 33:222–227.
- 37) Sumar, J. y Leyva, V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificialen alpacas. Mem. IV Convencion internacional sobre camelidos sudamericanos. Corp.-nac.for e Inst de la Patagonia. Punta arenas Chile
- 38) Ward, J.O.; Reinholdt, L.G.; Hartford, S.A.; Wilson, L.A.; Munroe, R.J.; Schimenti, K.J.; Libby, B.J.; O'Brien, M.; Pendola, J.K.; Eppig, J.; Schimenti, J.C. 2003. Toward the genetics of mammalian reproduction; induction and mapping of gametogenesis mutants in mice. *Biol. Reprod.* 69: 1615-1625.
- 39) WHO. 2010. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5ta Edición. Suiza.

X. ANEXOS

Análisis Estadísticos

I. Datos completos de parámetros seminales de los Grupos A y B, con sus respectivos promedio y desviación estándar.

Tabla N°10: Valores de Motilidad Espermática.

Grupo I (n=20)		Grupo II (n=14)	
Individuo	Motilidad A + B (%)	Individuo	Motilidad A + B (%)
10-27	0,00	10-05	26,20
10-40	0,00	10-46	26,76
10-49	0,00	10-51	27,08
10-33	0,93	10-12	30,00
10-31	1,16	10-28	30,77
10-13	1,97	10-04	32,00
10-29	3,00	10-30	32,31
10-35	3,20	10-08	33,85
10-34	3,70	10-11	36,79
10-17	3,93	10-02	39,87
10-43	5,00	10-21	40,00
10-39	5,47	10-03	47,22
10-50	6,92	10-24	50,00
10-22	7,00	10-10	86,61
10-36	7,89		
10-09	8,47		
10-42	9,15		
10-23	11,00		
10-44	15,96		
10-01	16,00		
Promedio	5.545	Promedio	38.54
Desviación Estándar	4.832	Desviación Estándar	15.64

Tabla N° 11: Valores de Vitalidad Espermática.

Grupo I (n=20)		Grupo II (n=14)	
Individuo	Vitalidad (%)	Individuo	Vitalidad (%)
10-27	85,60	10-05	80,65
10-40	76,00	10-46	86,00
10-49	92,00	10-51	85,00
10-33	80,00	10-12	85,95
10-31	85,00	10-28	80,00
10-13	82,90	10-04	91,33
10-29	80,00	10-30	90,00
10-35	89,00	10-08	89,57
10-34	86,00	10-11	85,00
10-17	74,30	10-02	69,17
10-43	91,00	10-21	80,00
10-39	75,00	10-03	71,68
10-50	91,00	10-24	90,00
10-22	65,00	10-10	60,71
10-36	90,00		
10-09	70,59		
10-42	86,00		
10-23	90,00		
10-44	76,00		
10-01	88,52		
Promedio	82,70	Promedio	81,79
Desviación Estándar	7,726	Desviación Estándar	9,011

Tabla N° 12: Valores de Concentración Espermática

Grupo I (n=18)		Grupo II (n=14)	
Individuo	Concentración (1 x 10⁶ sperm/ml)	Individuo	Concentración (1 x 10⁶ sperm/ml)
10-27	S.D.	10-05	10,80
10-40	9,60	10-46	31,00
10-49	8,90	10-51	32,80
10-33	18,00	10-12	4,50
10-31	10,80	10-28	330,00
10-13	3,40	10-04	40,00
10-29	55,00	10-30	45,0
10-35	S.D.	10-08	85,60
10-34	166,30	10-11	0,50
10-17	30,20	10-02	58,00
10-43	284,00	10-21	43,70
10-39	303,00	10-03	41,00
10-50	168,00	10-24	276,1
10-22	65,80	10-10	1,20
10-36	72,50		
10-09	75,20		
10-42	96,00		
10-23	99,60		
10-44	35,00		
10-01	48,90		
Promedio	86,12	Promedio	71,44
Desviación Estándar	89,90	Desviación Estándar	101,4

Tabla N° 13: Valores de Integridad de Membrana

Grupo I (n=19)		Grupo II (n=14)	
Individuo	Integridad de membrana (% HOS +)	Individuo	Integridad de membrana (% HOS +)
10-27	31,90	10-05	54,20
10-40	43,70	10-46	41,34
10-49	S.D.	10-51	43,70
10-33	90,30	10-12	51,30
10-31	39,90	10-28	45,30
10-13	49,40	10-04	63,60
10-29	65,30	10-30	63,90
10-35	94,60	10-08	39,50
10-34	90,70	10-11	48,10
10-17	45,60	10-02	58,40
10-43	34,60	10-21	46,50
10-39	56,50	10-03	35,90
10-50	39,80	10-24	38,30
10-22	48,80	10-10	47,60
10-36	91,60		
10-09	52,20		
10-42	89,80		
10-23	39,50		
10-44	39,70		
10-01	60,50		
Promedio	58,13	Promedio	48,37
Desviación Estándar	22,07	Desviación Estándar	8,939

II. Análisis Estadísticos mediante el uso de la prueba de T-student entre los Grupos A y B.

Figura N° 13: Motilidad Espermática

X	Y
Table Analyzed	Grupos Motilidad Columns A and B
Unpaired t test	
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=8.899 df=32
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0.05545 ± 0.01080 N=20
Mean ± SEM of column B	0.3854 ± 0.04180 N=14
Difference between means	-0.3300 ± 0.03708
95% confidence interval	0.2544 to 0.4055
R squared	0.7122
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	10.48, 13, 19
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Figura N° 14: Vitalidad Espermática

X	Y
Table Analyzed	Grupos Vitalidad Columns A and B
Unpaired t test	
P value	0.7555
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.3141 df=32
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	82.70 ± 1.728 N=20
Mean ± SEM of column B	81.79 ± 2.408 N=14
Difference between means	0.9055 ± 2.883
95% confidence interval	-6.779 to 4.968
R squared	0.003074
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.360, 13, 19
P value	0.2638
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Figura N° 15: Concentración Espermática.

X	Y
Table Analyzed	Grupos Concentración Columns A and B
Unpaired t test	
P value	0.6679
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.4333 df=30
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	86.12 ± 21.19 N=18
Mean ± SEM of column B	71.44 ± 27.11 N=14
Difference between means	14.68 ± 33.88
95% confidence interval	-83.86 to 54.50
R squared	0.006219
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.273, 13, 17
P value	0.3153
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Figura N° 16: Integridad de Membrana

X	Y
Table Analyzed	Grupos Integridad Columns A and B
Unpaired t test	
P value	0.1295
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=1.558 df=31
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	58.13 ± 5.064 N=19
Mean ± SEM of column B	48.37 ± 2.389 N=14
Difference between means	9.759 ± 6.265
95% confidence interval	-22.54 to 3.021
R squared	0.07259
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	6.097, 18, 13
P value	0.0009
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

III. Datos Completos de expresión génica del total de individuos.

Tabla N° 14: Datos de expresión de los individuos muestreados en ambos grupos

Individuo	Expresión génica
10-01	2,3548
10-02	5,5798
10-03	5,7422
10-04	5,0609
10-05	1,8752
10-08	4,5457
10-09	3,1821
10-10	3,5103
10-11	0,0279
10-12	3,0282
10-13	1,8607
10-17	0,1713
10-21	2,1335
10-22	1,5648
10-23	5,3102
10-24	0,7548
10-27	0,0059
10-28	5,8894
10-29	1,7447
10-30	0,0616
10-31	2,0997
10-33	2,6878
10-34	1,0012
10-35	1,3718
10-36	1,4066
10-39	0,4196
10-40	0,0755
10-42	2,0842
10-43	0,8410
10-44	1,4112
10-46	9,6657
10-49	0,4095
10-50	1,9547
10-51	1,4587

IV. Análisis Estadístico de Correlación de Spearman entre los valores de expresión génica y los valores de motilidad espermática

Figura N° 17: Motilidad A vs. Expresión génica.

X	Y
Number of XY Pairs	34
Spearman r	0.3403
95% confidence interval	-0.008060 to 0.6150
P value (two-tailed)	0.0489
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes

Figura N° 18: Motilidad B vs. Expresión génica.

X	Y
Number of XY Pairs	34
Spearman r	0.4413
95% confidence interval	0.1109 to 0.6839
P value (two-tailed)	0.0090
P value summary	**
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes

Figura N° 19: Motilidad C vs. Expresión génica.

X	Y
Number of XY Pairs	34
Spearman r	-0.02433
95% confidence interval	-0.3686 to 0.3258
P value (two-tailed)	0.8913
P value summary	ns
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No

Figura N° 20: Motilidad D vs. Expresión génica.

X	Y
Number of XY Pairs	34
Spearman r	-0.3946
95% confidence interval	-0.6525 to -0.05462
P value (two-tailed)	0.0209
P value summary	*
Exact or approximate P value?	Gaussian Approximation
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	Yes

V. Evaluaciones estadísticas de la expresión génica de SMCP de los Grupos I y II

Figura N° 21: Evaluaciones estadísticas de la expresión génica de SMCP

X	Y	Y
Number of values	20	14
Minimum	0.0059	0.0279
25% Percentile	0.6303	1.107
Median	1.488	3.269
75% Percentile	2.092	5.661
Maximum	5.310	9.666
Mean	1.598	3.524
Std. Deviation	1.246	2.730
Std. Error	0.2786	0.7297
Lower 95% CI	1.015	1.947
Upper 95% CI	2.181	5.100

Figuras estadísticas

Figura N° 22: Comparación de los porcentajes de motilidad espermática en los Grupos I y II.

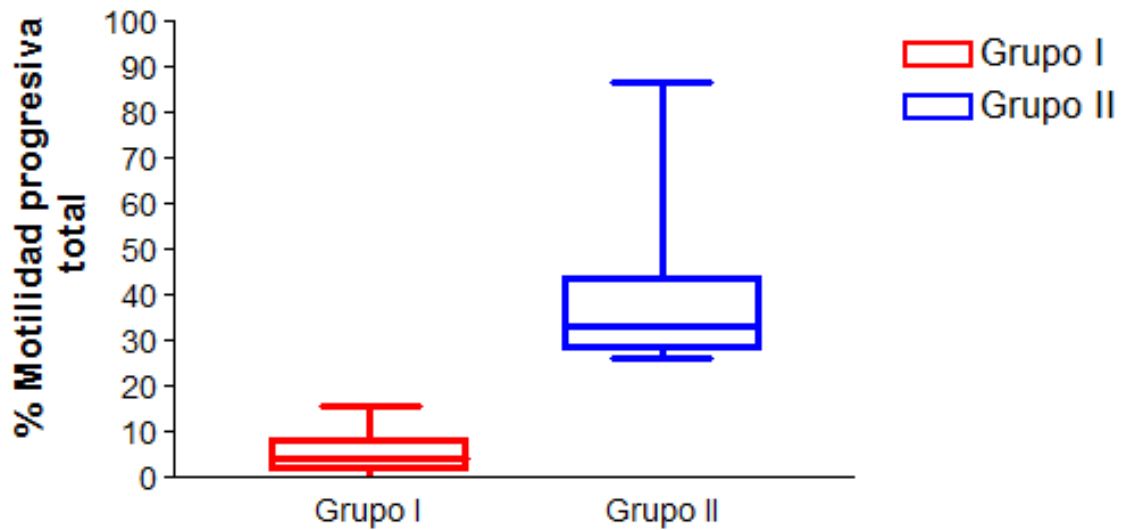


Figura N° 23: Comparación de los porcentajes de vitalidad espermática en los Grupos I y II.

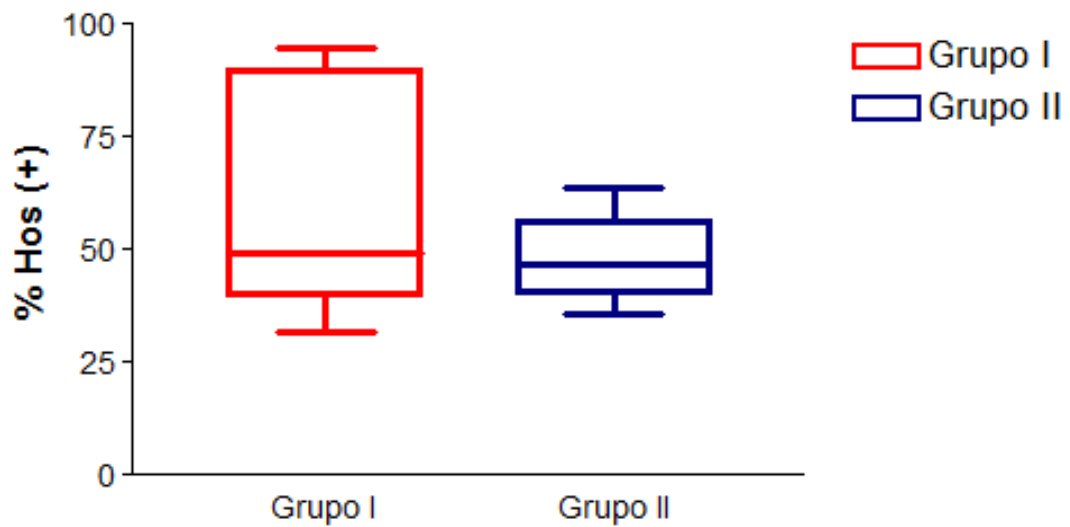


Figura N° 24: Comparación de los porcentajes de concentración espermática en los Grupos I y II.

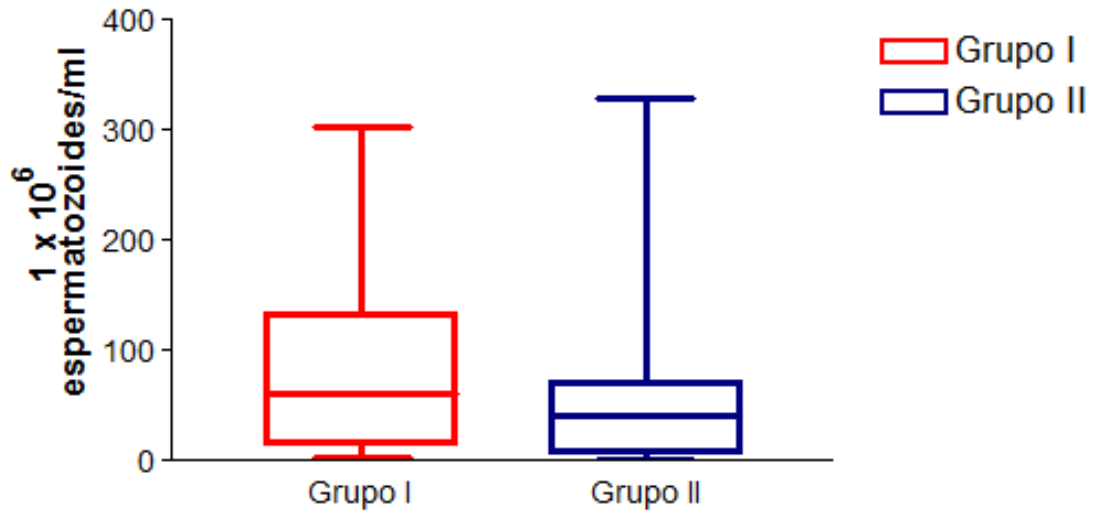


Figura N° 25: Comparación de los porcentajes de integridad de membrana en los Grupos I y II.

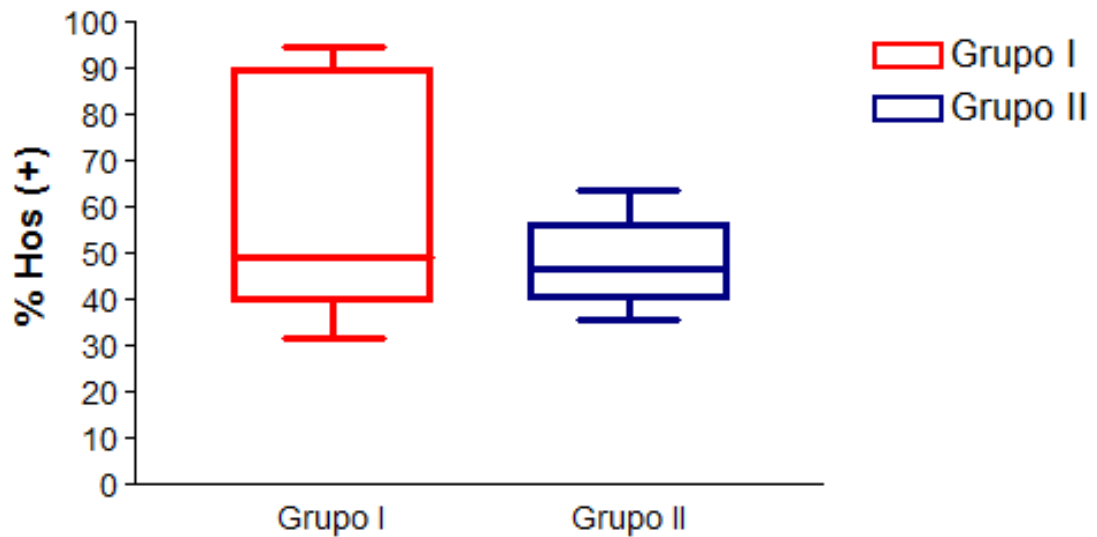


Figura N° 26: Comparación de los niveles de expresión génica observados en los Grupos I y II.

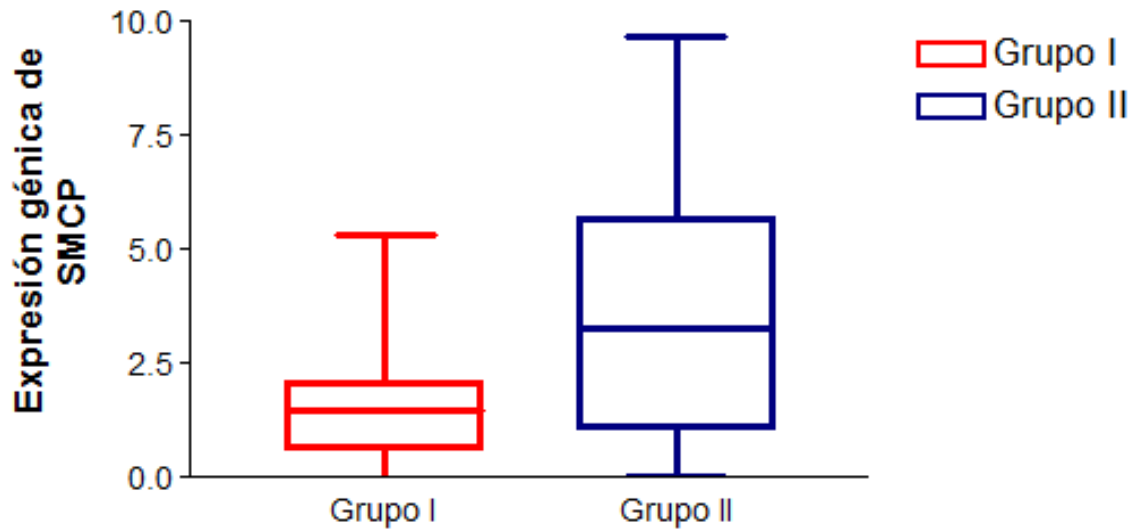


Figura N° 27: Correlación entre la expresión génica y el porcentaje de motilidad espermática A.

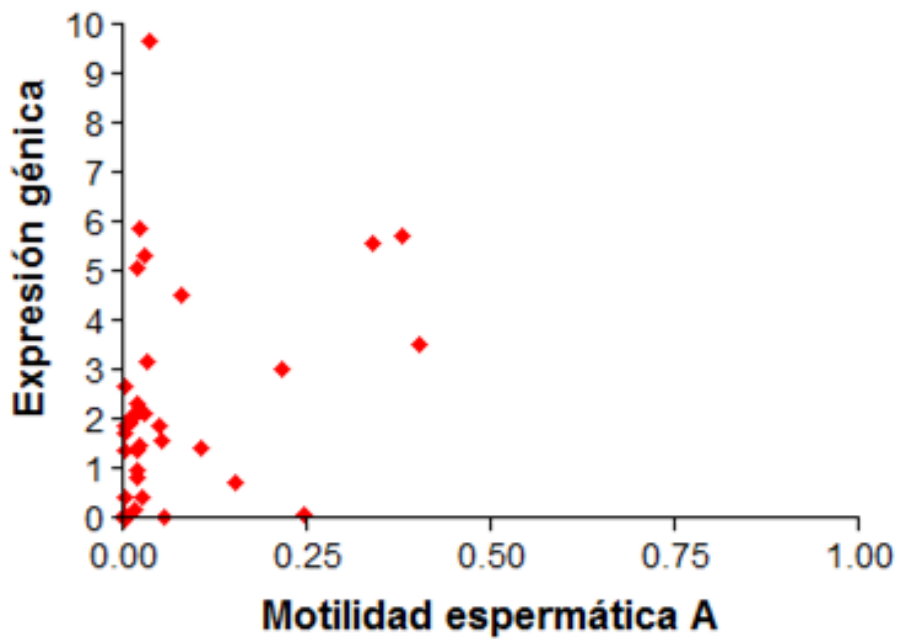


Figura N° 28: Correlación entre la expresión génica y el porcentaje de motilidad espermática B.

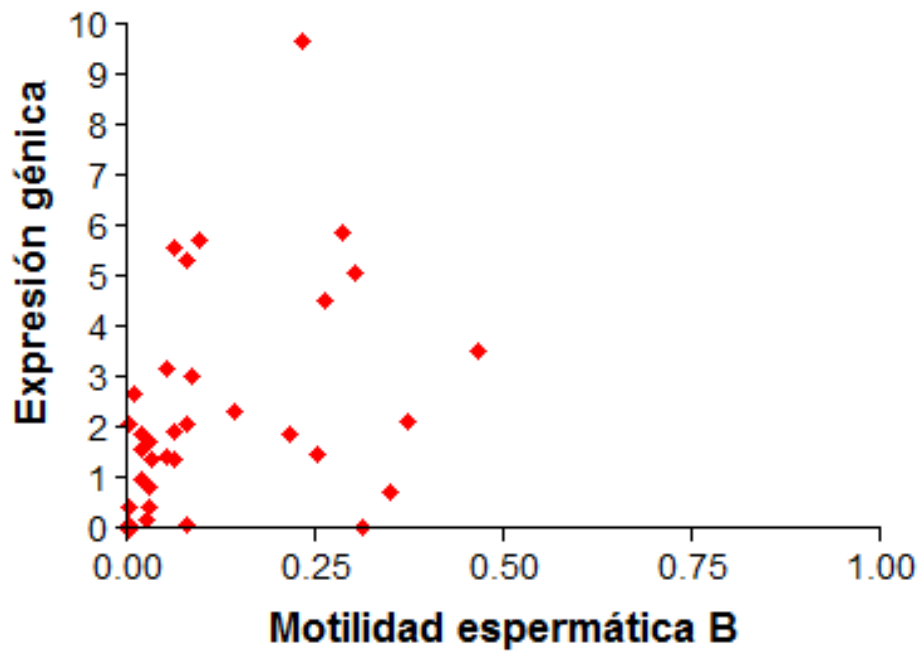


Figura N° 29: Correlación entre la expresión génica y el porcentaje de motilidad espermática C.

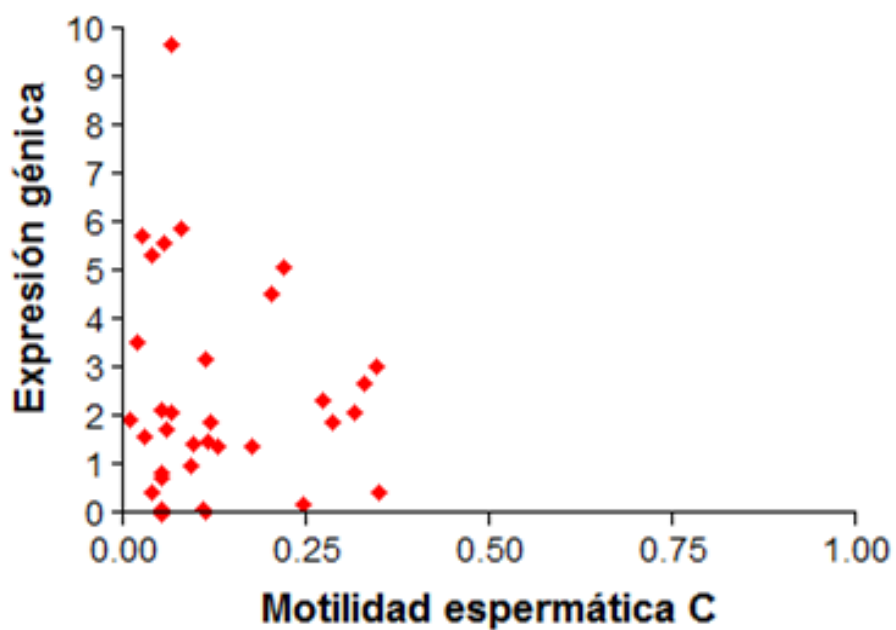


Figura N° 30: Correlación entre la expresión génica y el porcentaje de motilidad espermática D.

