



Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“EVALUACIÓN DE GLICEROL, ETILENGLICOL,
DIMETILSULFÓXIDO, DIMETILFORMAMIDA Y
DIMETILACETAMIDA COMO AGENTES CRIOPROTECTORES
DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE
ESPERMATOZOIDES DE ALPACA”

Tesis para optar el título profesional de:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

Autor:
RODOLFO AUGUSTO ZURITA BURMESTER

LIMA – PERÚ

2019

Acta de Sustentación de Tesis

Siendo las 19:00 horas del 11 de abril de 2019, en el Aula L 201 (Campus Villa II), bajo la presencia del jurado examinador nombrado por **Resolución Directoral Académica de Carrera N° 021-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2019**, presidido por el Mg. Siever Miguel Morales Cauti, Mg. Jorge Luis Vilela Velarde, Mg. Shirley Evangelista Vargas y el Dr. Alexei Santiani Acosta como Director – Observador. Se procedió en acto público a la sustentación de la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE GLICEROL, ETILENGLICOL, DIMETILSULFÓXIDO, DIMETILFORMAMIDA Y DIMETILACETAMIDA COMO AGENTES CRIOPROTECTORES DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA”**.

El presidente concedió el uso de la palabra al Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Zurita Burmester Rodolfo Augusto**, para la sustentación de su tesis. Luego de la exposición, el bachiller absolvió las preguntas del Jurado y del público asistente.

El Jurado acordó otorgarle la nota de:

..... Diecinueve (19)

El presidente del Jurado dio por culminado el acto de sustentación y levantó la sesión a las 20:00hrs.



.....
Mg. Siever Miguel Morales Cauti
Presidente



.....
Mg. Jorge Luis Vilela Velarde
Miembro



.....
Mg. Shirley Evangelista Vargas
Miembro



.....
Dr. Alexei Santiani Acosta
Director - Observador

004-2019

DEDICATORIA

A Rubén.

AGRADECIMIENTOS

- El desarrollo de la tesis no lo puedo catalogar como algo fácil, pero lo que sí puedo afirmar, es que durante todo este tiempo pude disfrutar de cada momento, cada proceso, cada investigación realizada a la par de esta, y todo esto gracias a que mis amigos siempre estuvieron ahí para apoyarme, y demostrarme que las cosas y actos que realice, serán los mismos que la vida hará conmigo. Gracias a mi director de tesis, que con dedicación y paciencia se esforzó por guiarme durante la realización del proyecto. Y finalmente, gracias a mis padres, que siempre han sido los principales promotores de mis sueños.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Características reproductivas de la alpaca macho	4
2.2. Métodos de colección de semen	5
2.3. Evaluación de la funcionalidad espermática	6
2.3.1. Motilidad	6
2.3.2. Viabilidad e integridad acrosomal	6
2.3.3. Actividad mitocondrial	8
2.4. Criopreservación de espermatozoides	9
2.4.1. Generalidades	9
2.4.2. Criopreservación de espermatozoides de alpaca	10
2.4.3. Agentes crioprotectores	14
2.4.3.1. Glicerol	15
2.4.3.2. Etilenglicol	17
2.4.3.3. Dimetilsulfóxido	18
2.4.3.4. Dimetilformamida	19
2.4.3.5. Dimetilacetamida	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Localización	22
3.2. Diseño experimental	22
3.3. Procedimiento metodológico	22
3.3.1. Obtención de la muestra	22
3.3.2. Recuperación de espermatozoides	22
3.3.3. Grupos experimentales	23
3.3.4. Criopreservación	24
3.3.5. Evaluación post descongelamiento	25
3.3.6. Evaluación mediante citometría de flujo	26
3.3.7. Lectura e interpretación de resultados	26
3.4. Análisis estadístico	29
4. RESULTADOS	30
5. DISCUSIÓN	32
6. CONCLUSIONES	36

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
8. ANEXOS	49

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Flujograma de procedimiento metodológico. (Pág.25)

FIGURA 2: Curva de enfriamiento utilizada para criopreservar espermatozoides de alpaca que corresponde al programa 7 de la crio cámara CL 5500 de Cryologic®. (Pág.26)

FIGURA 3: Histograma de canal de detección 05 que evidencia la IF de PI. (Pág.28)

FIGURA 4: Histograma del canal de detección 02 que evidencia la IF de FITC-PSA. (Pág.29)

FIGURA 5: Histograma del canal de detección 11 que evidencia la IF de MitoTracker Deep Red 633 FM. (Pág.30)

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1: Trabajos de investigación en criopreservación de espermatozoides de alpaca. (Pág.13)

CUADRO 2: Principales características de los agentes crioprotectores. (Pág.16)

CUADRO 3: Longitud, peso, concentración espermática y motilidad inicial promedio de los testículos de alpaca utilizados en el estudio. (Pág.31)

CUADRO 4: Evaluación de la motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y PMM mediante el estudio de ANOVA de un solo factor en espermatozoides epididimarios de alpaca descongelados. (Pág.32)

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Ejemplos de espermatozoides evaluados mediante citometría de flujo y el sistema analizador de imágenes. (Pág.50)

ANEXO 2: Cuadro donde se muestran los datos obtenidos de todas las muestras y variables halladas. (Pág.51)

RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto del glicerol (GLY), etilenglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA) como agentes crioprotectores durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca. Se obtuvieron 46 testículos de alpaca provenientes del Camal Municipal del distrito de Ninacaca, Pasco. Los espermatozoides fueron recuperados de la cola del epidídimo en 1 mL de dilutor a base de leche descremada, yema de huevo y fructosa. Se utilizaron las muestras que presentaron motilidad inicial $\geq 30\%$ y concentración espermática $\geq 50 \times 10^6$ esp/mL. Se dividieron en 5 alícuotas de 200 μL ; se agregó a cada alícuota un crioprotector distinto en concentración al 1 M. Las alícuotas se congelaron mediante un sistema automatizado de congelamiento Cryobath y se almacenaron en nitrógeno líquido para su posterior evaluación. Se tomaron 10 μL de cada muestra descongelada para evaluar la motilidad. Cada muestra recuperada fue lavada y reconstituida en 100 μL de PBS. A cada muestra se agregó 0.5 μL de yoduro de propidio (PI), 2.5 μL de FITC-PSA y 0.5 μL de MitoTracker Deep Red 633 FM para evaluar viabilidad (V), integridad acrosomal (IA) y potencial de membrana mitocondrial (PMM), respectivamente; se llevaron a incubación en oscuridad por 10 minutos a 37 °C. V, IA y PMM fueron evaluados utilizando un citómetro de flujo con analizador de imágenes. Se utilizó ANOVA de un solo factor para el análisis estadístico y el test de Tukey en los casos que existieron diferencias significativas. Los resultados mostraron que el GLY (15.8 ± 9.6

%), DMSO (17.3 ± 10 %) y DMF (13.6 ± 10.7 %) logran mejor motilidad que EG (10.3 ± 6.4 %), hallándose diferencias significativas ($p < 0.005$). No se encontraron diferencias significativas respecto a V, IA y PMM. En conclusión, GLY, DMSO y DMF conservaron mejor la motilidad que EG en concentración al 1 M.

Palabras clave: alpaca, espermatozoides, crioprotectores, criopreservación.

ABSTRACT

In this study was evaluated the effect of glycerol (GLY), ethylene glycol (EG), dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl formamide (DMF) and dimethyl acetamide (DMA) like cryoprotectants agents during the process of cryopreservation of alpaca spermatozoa. Forty six alpaca testicles were obtained from the Ninacaca municipal slaughterhouse, Pasco. The spermatozoa were recovered from the tail of the epididymis in 1 mL of dilutor based on skimmed milk, egg yolk and fructose. The samples that showed $\geq 30\%$ of initial motility and $\geq 50 \times 10^6$ esp/mL of sperm concentration were used. They were divided into 5 aliquots of 200 μ L adding a different cryoprotectant in each one. The aliquots were frozen by an automated Cryobath freezing system and stored in liquid nitrogen for further evaluation. Ten μ L of each thawed sample were taken to assess motility. Each one recovered was washed and reconstituted in 100 μ L of PBS; 0.5 μ L of propidium iodide (PI), 2.5 μ L of FITC-PSA and 0.5 μ L of MitoTracker Deep Red 633 FM were added to each sample to assess viability (V), acrosomal integrity (AI) and mitochondrial membrane potential (MMP), respectively. They were incubated in the dark for 10 minutes at 37 °C. V, AI and MMP were evaluated using a flow cytometer with image analyzer. One-Way ANOVA was used for statistical analysis and the Tukey test in cases where significant differences existed. The results showed that GLY ($15.8 \pm 9.6\%$), DMSO ($17.3 \pm 10\%$) and DMF ($13.6 \pm 10.7\%$) give better motility than EG ($10.3 \pm 6.4\%$), finding significant differences ($p < 0.005$). No significant differences were found with regarding to V, AI and

PMM. In conclusion, GLY, DMSO and DMF retained better motility than EG in 1 M concentration.

Key words: alpaca, spermatozoa, cryoprotectants, cryopreservation.

1. INTRODUCCIÓN

Según el INEI (2013), la mayor población de alpacas en el mundo (87 %) se encuentra en Perú con 3 millones de ejemplares. Ésta actividad, por ende, tiene un gran impacto a nivel social y económico en las poblaciones alto andinas (Freyre, 2006).

A pesar de ello, los intentos de criopreservar espermatozoides de camélidos sudamericanos (CAS) han sido hasta la fecha insatisfactorios, ya que aún no se ha logrado un porcentaje de motilidad post descongelamiento aceptable. Esto es debido a que siguen existiendo limitaciones en cuanto al método de colección de semen (Ferré y Werkmeister, 1996), siendo poco factible obtener siempre una muestra aceptable, debido a la falta de conocimiento sobre la composición del semen, características propias del semen como la viscosidad, y la falta de un protocolo estandarizado para la criopreservación (Bustinza, 2001). Los valores encontrados de motilidad post descongelamiento de espermatozoides de alpaca van desde el 0 % al 34 % (Aller et al., 2003; Santiani et al., 2005; Morton et al., 2007; Canorio et al., 2015). Sin embargo, también se han reportado porcentajes de motilidad post descongelamiento de 46.7 % en alpacas y 45 % en llamas (Bravo et al., 1996), pero no ha sido posible reproducir estos resultados.

Al criopreservar espermatozoides estos son sometidos a reducción de temperatura, deshidratación, congelación y descongelación; sin embargo los espermatozoides no están adaptados para soportar bajas temperaturas, lo que genera muerte celular y alteraciones funcionales. Por eso, es necesario un control de la velocidad de enfriamiento y la adición de diluyentes y compuestos protectores del semen (Medeiros et al., 2002). El verdadero desafío para la preservación de espermatozoides es lograr que estos sean viables luego de someterse a temperaturas de entre -15 y -60 °C. (Mazur, 1984). El daño que sufren las células después de este periodo se debe principalmente a la deshidratación excesiva y la formación de cristales de hielo en la zona intracelular (Watson, 1995). El uso de agentes crioprotectores (ACP) es muy importante ya que permiten que el espermatozoide soporte las bajas temperaturas a las que es sometido, evitando la formación de hielo intracelular (Gao et al., 1995; Medeiros et al., 2002). Entre los ACP más comunes podemos mencionar: glicerol (GLY), etilenglicol (EG), dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y dimetilacetamida (DMA).

El GLY es el agente crioprotector más usado para criopreservar espermatozoides (Medeiros et al., 2002), y el más empleado en estudios sobre criopreservación de espermatozoides de alpaca (Vaughan et al., 2003; Santiani et al., 2005). Medeiros *et al.* (2002) explicaron que “el GLY reemplaza el volumen de agua de la célula que sale al espacio extracelular durante la criopreservación, manteniendo el volumen celular y evitando el colapso de los espermatozoides por la deshidratación excesiva”. Fue empleado al 3% (0.41 M) dentro de la metodología de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca, dando resultados aceptables (21%) (Morton et al., 2007 y 2010). No obstante, el GLY podría ser potencialmente citotóxico a ciertas concentraciones (Watson, 2000).

El EG es un polialcohol crioprotector que posee menor peso molecular es inferior que el glicerol (Massip, 2001). Guthrie *et al.* (2002) sugieren que “la utilización de EG como crioprotector, en la congelación del semen de toro ha ejercido un menor efecto inhibitorio en la motilidad que el glicerol o el DMSO”. Santiani et al. (2005) concluyeron que el EG al 0.7 % (0.125 M) dio mejores resultados que el GLY al 7 % (0.96 M) obteniendo una tasa de motilidad post-descongelamiento de 20%. Por otro lado, Terreros et al. (2015)

concluyeron que el crioprotector DMSO a concentración de 0.9 M tuvo motilidades más altas (31%) al compararlo con glicerol (23.9%) y etilenglicol (8.3%).

Las amidas (DMF y DMA) penetran la membrana plasmática rápidamente debido a su bajo peso molecular, lo que reduce el daño celular (Carretero et al., 2013). Canorio et al., (2015) encontraron que el uso de DMA al 0.375 M daba mejores resultados en viabilidad (52%) e integridad de la membrana (57%) post descongelamiento. También, fue posible evaluar el efecto de DMF (al 4 y 7 %) en la motilidad en espermatozoides de alpacas criopreservados (Flores et al; 2015).

Debido a la variabilidad de resultados obtenidos en estudios sobre criopreservación de espermatozoides de alpaca, es necesario evaluar y comparar los crioprotectores sometidos bajo los mismos parámetros, utilizando técnicas de evaluación modernas y de mayor precisión. Por lo tanto el objetivo de este trabajo es comparar el efecto de glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y dimetilacetamida como agentes crioprotectores durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características reproductivas de la alpaca macho

El inicio de la producción espermática coincide con la evidencia del comportamiento sexual alrededor del año de vida; sin embargo, la madurez sexual en alpacas es determinada cuando desaparece la adhesión entre el pene y prepucio, momento en el cual ya pueden tener una erección completa (Bravo et al., 2000).

En la alpaca adulta se observan los testículos en un escroto no pendular. Sumar (2002) describe que “el pequeño epidídimo está firmemente conectado con los testículos y formado por cabeza, cuerpo y cola”; “la cabeza y el cuerpo son sitios para la maduración espermática, mientras que en la cola solo se almacenan los espermatozoides maduros para su posterior liberación en el eyaculado” (Elwishy, 1998, p.217). El peso promedio de un testículo de alpaca totalmente desarrollado es de cerca de 17 g (13-38 g), y mide entre 4 y 5 cm de longitud y 2.5 a 3.0 cm de grosor, según reporta Sumar (2002), aunque se sabe que el tamaño varía según la edad del animal (Tibary y Vaughan, 2006).

El semen de los camélidos sudamericanos presenta características particulares que los diferencia de otras especies. El color del eyaculado varía de blanco lechoso a blanco cristalino, siendo predominante el color blanquecino (Garnica et al., 1993). El pH del semen de alpaca es ligeramente alcalino, y no difiere entre los machos ni entre eyaculados del mismo macho (Bravo et al., 1997). Presentan un plasma seminal con alta viscosidad (Banda et al., 2010) y filancia, que es la capacidad de formación de hilo, siendo una característica física independiente de la viscosidad (Giuliano, 2012). La concentración de espermatozoides y la motilidad son muy variables entre los individuos y entre eyaculados recogidos del mismo animal (Raymundo et al., 2000; Bravo et al., 1997). El volumen obtenido es de 1 a 2 mL (Garnica et al., 1993; Sumar y Leyva, 1981). Estos valores

también están influenciados por el método de colección que se utiliza (Tibary y Memon, 1999). La concentración espermática del eyaculado de alpaca obtenido mediante vagina artificial es de 100×10^6 esp/mL aproximadamente (Sumar y Leyva, 1981).

Los espermatozoides de alpaca, de similar forma que los de otros mamíferos, son elongados con cabeza alargada donde se encuentra el núcleo y una cola o flagelo necesario para la motilidad, ambos rodeados por una membrana plasmática. El núcleo, que contiene el ADN y presenta cromatina muy compacta, está cubierto en su extremo anterior por el acrosoma, una membrana de doble capa que contiene enzimas hidrolíticas necesarias para la fecundación (Garner y Hafez, 2000). Los flagelos de los espermatozoides son los encargados de ejecutar la motilidad; el movimiento flagelar se da gracias al ATP producido por las mitocondrias que se encuentran en la pieza media del espermatozoide (Hallap et al., 2005).

2.2. Métodos de colección de espermatozoides

Una de las principales limitantes para la evaluación reproductiva en camélidos sudamericanos es el método de colección de semen. Esto debido a características como la posición y duración de la cópula, lugar donde se deposita el semen, el tipo de eyaculación y la elevada viscosidad, que dificultan la colecta del semen y el establecimiento de un protocolo óptimo (Pacheco, 2008). Se han probado distintos métodos de colección con el fin de llegar a obtener una muestra limpia y confiable, entre ellos están la colección mediante esponjas vaginales, una fístula uretral, aspiración post-coital, electro eyaculado y vagina artificial (Bravo et al., 2000).

La recuperación de espermatozoides epididimarios de alpaca provenientes de animales de descarte o que fueron enviados a camal, es una alternativa atractiva para la obtención de muestras con fines de investigación (Morton et al., 2007; Gonzales, 2008; Banda et al., 2010). Además, permitiría la recuperación de espermatozoides de animales de altos valores genéticos muertos súbitamente y de animales en peligro de extinción. La técnica consiste en la obtención de espermatozoides que se encuentran en la cola del epidídimo, lugar donde se almacenan hasta ser eyaculados, mediante cortes seriados y utilizando un diluyente (Morton et al., 2007; Banda et al., 2010; Abraham et al., 2016).

La viabilidad de los espermatozoides va decreciendo según el aumento de la temperatura y tiempo post beneficio, obteniéndose espermatozoides vivos a 5 °C por más

de 24 horas (Banda et al., 2010). Esta técnica evita inconvenientes como la contaminación de la muestra por polvo, entrenamiento de los animales, equipos y profesionales especializados; además, nos permite obtener muestras sin la alta viscosidad que hace tan difícil el manejo de la muestra debido a la ausencia del plasma seminal.

2.3. Evaluación de la funcionalidad espermática

2.3.1. Motilidad

La motilidad espermática puede ser evaluada por microscopía óptica y con ayuda de los sistemas de análisis de semen asistido por computadora (CASA). En bovinos, la motilidad es actualmente la definición más común para “calidad espermática”, actuando como una medida indirecta de la actividad metabólica y la viabilidad espermática (Hallap et al., 2005). La evaluación para esta y otras especies, como ovinos, porcinos y equinos, consta de la valoración del semen puro, que indica el comportamiento de los espermatozoides en el líquido de las glándulas accesorias, y de la valoración del semen diluido para estimar parámetros de motilidad espermática total y motilidad progresiva (Ax et al., 2002).

El semen de la alpaca es muy viscoso, lo que dificulta la valoración de la calidad espermática por medio de la motilidad. Debido a la alta viscosidad del plasma seminal, no hay motilidad masal, y la motilidad individual y progresiva es muy lenta y de forma oscilatoria (Sumar, 2002). Si bien se ha podido evaluar la motilidad progresiva en espermatozoides exentos de la secreción de la próstata y glándulas bulbo-uretrales (Pérez et al., 2006), la motilidad espermática total ha servido para evaluar la calidad espermática antes y después del congelamiento en espermatozoides de alpaca en diferentes estudios (Valdivia et al., 1999; Bravo et al., 2000; Morton et al., 2007, 2010; Banda et al., 2010; Santiani et al., 2005, 2013, 2016).

Es importante señalar que debido a que en camélidos sudamericanos existen inconvenientes mencionados anteriormente respecto a la evaluación de la motilidad, se deberían usar otros métodos de estimación de la calidad espermática y no basarse solo en la motilidad. Recientemente, se han realizado estudios utilizando citometría de flujo (Cheuqueman et al., 2013; Santiani et al., 2016; Ugarelli et al., 2017) para evaluar la calidad espermática utilizando parámetros novedosos y más objetivos.

2.3.2. Viabilidad e integridad acrosomal

Las membranas ejercen un papel fundamental en el mantenimiento de la fertilidad de los espermatozoides (Celeghini et al., 2007). La membrana plasmática es responsable de mantener el equilibrio osmótico celular; si es dañada, la homeostasis se pierde y puede conllevar a la muerte del espermatozoide (Flesh y Gadella, 2000). En consecuencia, una membrana plasmática íntegra es crucial para la supervivencia del espermatozoide, y evaluar su funcionalidad nos permite determinar la capacidad fecundante del espermatozoide. La prueba ampliamente usada para evaluar la integridad funcional de la membrana es el test hipoosmótico, que evalúa la capacidad de la membrana para transportar líquidos (Vázquez et al., 1997; Suarez, 2014).

Por otro lado la reacción acrosomal (RA) es un evento esencial para la fecundación, ya que consiste en la liberación de enzimas acrosomales que facilitarán la unión del espermatozoide con la zona pelúcida (ZP) y la posterior fusión de las membranas del espermatozoide y ovocito (Flesh y Gadella, 2000). En mamíferos la ZP aparece como la estructura implicada en la unión del espermatozoide e inducción de la RA (Villela et al., 2015); aunque los mecanismos de inducción de RA son más complejos y dependen de los receptores en la membrana y señales intracelulares (Patrat et al., 2000). Por lo tanto, la integridad del acrosoma, así como el mantenimiento enzimático es esencial para la fecundación. La integridad acrosomal puede evaluarse utilizando técnicas de doble tinción citoquímica (Santiani et al., 2005) y de fluorescencia (Morton et al., 2010; Villela et al., 2015).

Desde hace algunos años se ha empezado a emplear técnicas específicas que permiten evaluar la viabilidad y la integridad del acrosoma a través del uso de marcadores fluorescentes (Ugarelli, 2016). El yoduro de propidio (PI) es una sonda fluorescente que se une al ADN de células que poseen la membrana plasmática dañada (Graham et al., 1990) y es comúnmente empleada para evaluar la viabilidad de los espermatozoides.

Existen varios marcadores fluorescentes que sirven para evaluar la integridad de la membrana acrosomal. La técnica más comúnmente aplicada utiliza marcadores de glicoproteína como lectinas. Entre ellos están el PSA (aglutinina del guisante *Pisum sativum*) y PNA (aglutinina del maní *Arachis hypogaea*) conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Graham et al., 1990). Estas aglutininas permiten reconocer terminales de manosa, glucosa y glucosamina de glicoconjugados localizados en la matriz

acrosomal (Celeghini et al., 2007), y cuando está unida a FITC, marca el acrosoma de espermatozoides dañados en amarillo-verde (Graham et al., 1990; Ugarelli, 2016).

La posibilidad de asociar sondas fluorescentes y evaluar simultáneamente la membrana plasmática y el acrosoma facilitan y hacen más rápida la evaluación de dos importantes parámetros para evaluar la actividad fecundante del espermatozoide, ya que de no utilizar marcadores fluorescentes se tendrían que realizar dos procedimientos y técnicas distintas, anteriormente mencionadas. La asociación de PI y FITC-PSA para evaluar la membrana plasmática y acrosomal, respectivamente, se ha utilizado en bovinos (Graham et al., 1990; Celeghini et al., 2007), ovinos (Sukardi et al., 1997), humanos (Vilella et al., 2015), equinos (Arruda et al., 2002) y alpacas (Cheuqueman et al., 2012; Santiani et al., 2016; Ugarelli et al., 2017).

2.3.3. Actividad mitocondrial

La actividad mitocondrial espermática es un parámetro que se ha evaluado en diversas especies, como en humanos (Amaral y Ramalho-Santos, 2010), bovinos (Hallap et al., 2005), porcinos (De Mercado et al., 2010), ovinos (Pérez, 2009) y alpacas (Cheuqueman et al., 2013; Santiani et al., 2016).

El flagelo del espermatozoide es el encargado de ejecutar la motilidad. El movimiento flagelar se da gracias al ATP producido por las mitocondrias que se encuentran en la pieza media del espermatozoide (Hallap et al., 2005). Se cree que la mitocondria es la organela más importante para la evaluación de la calidad espermática debido a que contiene su propio ADN y potencial de membrana, que puede ser fácilmente examinada para determinar la integridad del ADN y motilidad del espermatozoide (Amaral y Ramalho-Santos, 2010). La evaluación de la actividad mitocondrial mediante la medición del potencial de membrana mitocondrial (PMM) es una alternativa más objetiva y útil para evaluar la calidad espermática, ya que una falla en el PMM estaría afectando directamente la funcionalidad del espermatozoide.

Existen diversos fluorocromos que sirven para marcar las mitocondrias y determinar el PMM, como el JC-1 y MitoSOX, que se han utilizado en diversas especies (Luo et al., 2013). El MitoTracker Deep Red 633 ha sido señalado como un fluorocromo confiable para la evaluación de la actividad mitocondrial de semen bovino luego del congelamiento (Hallap et al., 2005). Terrell et al. (2011) determinaron que bajos niveles

de actividad mitocondrial podrían estar directamente relacionados al tamaño de la pieza media del espermatozoide utilizando MitoTracker CMXRos en espermatozoide felinos.

En alpacas, el PMM ha podido ser evaluado utilizando JC-1 (Cheuqueman et al., 2013), MitoTracker Deep Red 633 FM y MitoTracker CMXRos (Santiani et al., 2016). El MitoTracker es un fluorocromo que tiene la capacidad de difundirse a través de la membrana plasmática, en definidos compartimentos intracelulares de la mitocondria activa, que al ser excitado con láser emite fluorescencia roja, permitiendo así la visualización de la mitocondria; la intensidad de dicha fluorescencia es proporcional a la presencia del PMM. Santiani et al. (2016) encontró una moderada correlación entre el PMM evaluado con MitoTracker CMXRos y la motilidad espermática, debido a que aparentemente, este podría marcar selectivamente las mitocondrias.

2.4. Criopreservación de espermatozoides

El fin de la criopreservación es mantener viables y funcionales a los espermatozoides durante un periodo de tiempo más largo. El hecho de que los espermatozoides sean sometidos a bajas temperaturas (menores a $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$) logra que se detengan los procesos metabólicos, prolongando su vida por varios años (Medeiros et al., 2002). Esto nos permite utilizar los espermatozoides congelados en biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial y la fecundación in vitro (Watson, 2000). No obstante, la criopreservación genera daño en las membranas celulares, lo que disminuye la viabilidad de espermatozoides debido a que los espermatozoides no están adaptados para soportar bajas temperaturas (Quinn *et al.*, 1969; Medeiros *et al.*, 2002).

2.4.1. Generalidades

Cuando los espermatozoides llegan a temperaturas entre -5 y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ocurre la formación de hielo en el medio extracelular, y gracias a la membrana plasmática se detiene la formación de hielo en el interior de la célula (Holt, 2000). La formación de cristales de hielo en el medio extracelular logra concentrar más los solutos en la fracción líquida. El punto eutéctico es la concentración máxima de solutos que se alcanza antes de que se termine de congelar la parte líquida y los solutos (Boiso, 2001). El mantenimiento de agua líquida intracelular y extracelular en equilibrio osmótico da lugar a la deshidratación celular (Medeiros et al., 2002). La deshidratación severa conduce a la lesión celular debido a la desnaturalización de macromoléculas y al encogimiento

extremo de la célula hasta el colapso irreversible de la membrana (Mazur, 1984). Por otro lado, la inadecuada deshidratación celular produce la formación de cristales de hielo intracelular, los cuales tienen un efecto letal (Mazur, 1984). El proceso de cristalización libera energía en forma de calor, lo que eleva por unos momentos la temperatura de la solución, siendo dañino para los espermatozoides (Boiso, 2001). La lesión celular crioinducida también se atribuye a la acción combinada de factores físicos, como el estrés osmótico que perjudica el funcionamiento de las membranas celulares debido a la formación de hielo y el estrés mecánico de la formación de hielo alrededor de la célula que estará sometida a un espacio muy limitado de solutos no congelados (Mazur, 1984).

De la velocidad de congelamiento también depende la supervivencia del espermatozoide a la criopreservación, influyendo en la deshidratación celular y la formación de hielo dentro de la célula si es muy rápida o muy lenta, respectivamente (Mazur, 1984; Holt, 2000; Medeiros et al., 2002). Kumar et al. (2003) encontraron que es entre el rango de -5 y -50 °C donde ocurren dichos fenómenos.

Los dilutores de semen de criopreservación cumplen , entre otras funciones, con brindar protección al espermatozoide durante el congelamiento (Háfez, 2002). La leche de vaca es utilizada para diluir el semen de diferentes especies (Salamon y Maxwell, 2000; Foote et al., 2002, Santiani, 2005). Las proteínas de la leche son las que proveen dichas propiedades a favor de los espermatozoides durante la congelación, y pueden funcionar como amortiguadores de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente, además de tener propiedades antioxidantes, como la caseína. La acción protectora de la yema de huevo de gallina se atribuye a las proteínas de baja intensidad (LDL), que forman una cubierta protectora en la superficie de la membrana espermática (Moussa et al., 2002).

2.4.2. Criopreservación de espermatozoides de alpaca

En los últimos años, los estudios sobre criopreservación de espermatozoides de alpaca se han incrementado. Si bien algunos resultados son favorables, la mayoría de estos siguen evidenciando lo mucho que falta por investigar al respecto, ya que aún no se tiene un protocolo estandarizado para criopreservar espermatozoides de alpaca que den

resultados aceptables y reproducibles para lograr la tan ansiada inseminación artificial. Así mismo, no se sabe que parámetros son los que afectan la eficiencia de la criopreservación. El método de colección, el tipo de diluyente, los crioprotectores y la concentración de estos, son interrogantes aún no esclarecidas del todo.

Bravo et al. (1996) reportaron como motilidad promedio en espermatozoides de alpacas y llamas 46.7 % y 45 %, respectivamente, utilizando glicerol (GLY) como crioprotector. Estudios posteriores han demostrado una reducción considerable de la motilidad luego del congelamiento (Valdivia et al., 1999; Vaughan et al., 2003; Santiani et al., 2013).

Se han evaluado parámetros distintos a la motilidad para estimar la actividad fecundante. Tal es el caso de la viabilidad y la integridad acrosomal. Santiani et al. (2005) concluyeron que el dilutor a base de Leche descremada, yema de huevo y fructosa y el crioprotector etilenglicol (EG) al 0.7 % (0.125 M) dieron los mejores resultados, obteniéndose 20 % de motilidad post descongelamiento y 18.7 % de espermatozoides viables con acrosoma intacto. Posteriormente, Santiani et al. (2013), esta vez utilizando Tempol al 1 mM y EG al 0.1 M, obtuvieron 22.08 % de motilidad y 32.71 % de espermatozoides viables con acrosoma intacto post descongelamiento.

En un intento por evadir el difícil manejo del semen de camélidos sudamericanos, se realizaron trabajos de investigación utilizando espermatozoides epididimarios. Morton et al. (2007) evaluaron la motilidad e integridad del acrosoma en espermatozoides epididimarios de alpaca utilizando dando como resultado 18.3 % de motilidad y 80 % de integridad acrosomal. Luego, el mismo grupo de investigadores utilizó la misma concentración de GLY adicionándole EquexSTM®, obteniendo resultados similares (Morton et al., 2010). Banda et al. (2010) por su parte también utilizaron espermatozoides epididimarios, obteniendo 17 %, 14 % y 8.6 % de motilidad y 27.2 %, 32.6 % y 26.3 % de integridad acrosomal post descongelamiento. Estos resultados demuestran que aunque la motilidad espermática se reduzca luego del congelamiento, los valores de viabilidad e integridad del acrosoma no son tan reducidos; lo que podría sugerir que el congelamiento de espermatozoides de alpaca está afectando en algún aspecto la motilidad espermática, más no la viabilidad en su totalidad.

CUADRO 1: Trabajos de investigación en criopreservación de espermatozoides de alpaca.

Autor	Agente Crioprotector	Dilutor	Motilidad post descongelamiento (%)	Muestra
Vaughan <i>et al.</i> , 2003	GLY (7 %)	Biladyl Buffer Green	21.3 ± 3.3 17.4 ± 1.7	Semen
Santiani <i>et al.</i> , 2005	GLY 0.96 M (7 %) EG 0.125 M (0.7 %)	TRIS, citrato, yema de huevo y glucosa Leche descremada, yema de huevo y fructosa	15.3 ± 4.1 20.0 ± 6.7	Semen (vagina artificial)
Canorio <i>et al.</i> , 2008	DMSO 0.125 M (0.9 %) DMSO 0.25 M (1.8 %)	NaCL DPBS	32.9 35.3	Espermatozoides de epidídimo
Morton <i>et al.</i> , 2007 y 2010	GLY 0.27 M (2 %) GLY 0.41 M (3 %) GLY 0.55 M (4 %)		16.1 ± 4.6 20.5 ± 5.9 18.5 ± 6.6	Espermatozoides de epidídimo
Banda <i>et al.</i> , 2010	GLY 0.82 M (6 %) EG 0.2 M (1 %) DMA 0.385 M	Tris, ácido cítrico, fructosa y yema de huevo. Tes Tris, citrato de sodio, de yema de huevo. Leche descremada, yema de huevo y fructosa.	14.0 ± 7.5 17.0 ± 4.3 8.6 ± 3.8	Espermatozoides de epidídimo
Terreros <i>et al.</i> , 2012	GLY 0.96 M (7 %) EG 1.25 M (7 %) DMSO 0.98 M (7 %)	Leche descremada, yema de huevo, fructosa.	23.9 ± 8.3 8.3 ± 6.9 31.1 ± 8.5	Espermatozoides de epidídimo
Santiani <i>et al.</i> , 2013	GLY 0.1 M	Leche descremada, yema de huevo, fructosa, Tempol.	22.08 ± 3.06	Semen (vagina artificial)

Choez <i>et al.</i> , 2013	GLY 0.25 M	Leche descremada, yema de huevo, fructosa.	22.0 ± 8.58	Espermatozoides de epidídimo
	GLY 0.5 M		23.0 ± 5.66	
	GLY 0.75 M		26.0 ± 11.07	
	GLY 1 M		34.0 ± 14.41	
	GLY 1.25 M		36.0 ± 11.70	
	GLY 1.5 M		26.0 ± 14.26	
	GLY 1.75 M		22.0 ± 11.11	
Flores <i>et al.</i> , 2015	DMF (4 %)	Tris, Fructosa, yema de huevo (25 %).	9.7 ± 1.8	Semen (electro eyaculado)
	DMF (7 %)		7.5 ± 3.2	
Canorio <i>et al.</i> , 2015	DMA 0.18 M	Tes, Tris, Yolk.	27.0 ± 1.8	Espermatozoides de epidídimo
	DMA 0.375 M		34.4 ± 1.4	
	DMA 0.75 M		28.6 ± 4.7	
	DMSO 0.125 M		22.2 ± 6.1	
	DMSO 0.25 M		33.3 ± 4.9	
	DMSO 0.5 M		27.9 ± 5.3	
GLY 0.6 M	17.6 ± 2.7			

2.4.3. Agentes crioprotectores

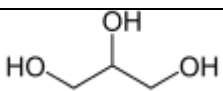
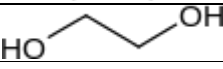
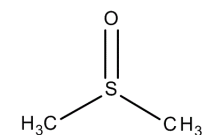
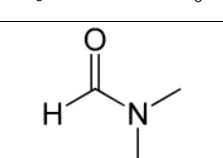
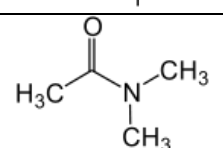
Los agentes crioprotectores (ACP) son sustancias hidrosolubles y de baja citotoxicidad que ayudan al espermatozoide a resistir la reducción de temperatura durante el proceso de criopreservación; al disminuir el punto eutéctico, la deshidratación celular se dará a una temperatura menor y el estrés osmótico será menor (García y Vila, 1984; Boiso, 2001). Los APC se han clasificado en permeantes (penetrantes) y en no permeantes (no penetrantes), de acuerdo a la permeabilidad a través de la membrana plasmática (Boiso, 2001).

Los ACP no permeantes no son crioprotectores propiamente dichos, ya que no ingresan a la célula por su alto peso molecular, pero promueven la deshidratación celular mediante la ósmosis, de esta manera disminuye el agua intracelular que podría formar cristales de hielo (Medeiros et al., 2002). Son muy efectivos a velocidades altas de congelación y suelen usarse en combinación con los agentes permeantes (Boiso, 2001). De Leeuw *et al.* (1993) describen que los ACP no permeantes “aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas, reduciendo la formación de cristales de hielo”; además, “pueden formar puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y grupos fosfato de los fosfolípidos de la membrana plasmática”; y “al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular”. Los más utilizados son azúcares como la sacarosa, trehalosa, lactosa y rafinosa (Boiso, 2001).

Los ACP permeantes sirven cuando la congelación es lenta, protegiendo al espermatozoide de los daños mencionados antes (García y Vila, 1984). Ingresan a la célula gracias a que poseen bajo peso molecular y reemplazan el volumen líquido en el medio intracelular, evitando así la formación de hielo y la deshidratación excesiva (Medeiros et al., 2002). Si bien el espermatozoide es permeable a estos agentes, su permeabilidad no es de la misma magnitud a la del agua debido a su peso molecular (Tabla N°2). Si la concentración de ACP es excesiva se puede generar toxicidad celular, produciendo alteraciones en la membrana plasmática y la motilidad (Medeiros et al., 2002). Se han utilizado distintos tipos de crioprotectores permeantes para preservar espermatozoides como el glicerol (GLY), etilenglicol (EG) y el dimetilsulfóxido (DMSO), siendo el GLY el más implementado, dando resultados variables entre especies (Boiso, 2001). Recientemente las amidas, dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida

(DMF), también vienen siendo usadas como crioprotectores en espermatozoides de alpaca y llama, respectivamente.

CUADRO 2: Principales características de los agentes crioprotectores.

	Fórmula Química	Estructura Química	Peso Molecular (g/M)	Densidad (g/mL)
Glicerol (GLY)	$C_3H_5(OH)_3$		92.09	1.250
Etilenglicol (EG)	$(CH_2OH)_2$		62.07	1.113
Dimetilsulfóxido (DMSO)	$(CH_3)_2SO$		78.13	1.100
Dimetilformamida (DMF)	C_3H_7NO		87.12	0.937
Dimetilacetamida (DMA)	$CH_3CON(CH_3)_2$		73.09	0.944

Fuente: Modificado de Sandoval, 2005.

2.4.3.1. Glicerol

El glicerol ha sido el ACP más utilizado para la criopreservación de espermatozoides (Medeiros et al., 2002), y el más utilizado en trabajos sobre criopreservación de espermatozoides de alpaca (Vaughan et al., 2003; Santiani et al., 2005).

Pertenece a la familia de los alcoholes y, por su bajo peso molecular (92.09), es capaz de atravesar la membrana plasmática del espermatozoide. Además, los canales aquaporin 7, que se encuentran en la membrana, facilitan el ingreso del GLY dentro de la célula (Ishibashi et al., 1997). De esta forma, el GLY reemplaza el agua intracelular que sale al medio extracelular, evitando el daño celular por la deshidratación excesiva

(Medeiros et al., 2002), y a su vez, reduce la formación de hielo intracelular (Salamon y Maxwell, 2000). También presenta un efecto en el medio extracelular cuando es agregado a la solución, aumentando el volumen del medio extracelular y, por lo tanto, el agua en estado de no congelamiento, disminuyendo los electrolitos, minimizando así los efectos de solución (Mazur, 1984). Amann y Pickett (1987) y Parks y Graham (1992) sugieren que este efecto extracelular es el más beneficioso.

Sin embargo, su principal función como crioprotector, puede ser también un problema para la supervivencia del espermatozoide. El glicerol, a concentraciones altas y dependiendo de en qué especie se utilice, puede ser tóxico, induciendo daño a la membrana plasmática y disminuyendo la motilidad (Medeiros et al., 2002).

En alpacas, se ha preferido realizar la adición del GLY en una o dos fracciones, siendo más común la adición del GLY a 5 °C (Banda et al., 2010; Santiani et al., 2013; Terreros et al., 2015) y 4 °C (Morton et al., 2010). Bravo et al. (2013) afirman que hasta ahora en los protocolos de criopreservación de espermatozoides de alpaca el crioprotector se adiciona al final del periodo de enfriamiento, lo que dura de 1 a 2 horas. No obstante, estas técnicas pueden llegar a ser contraproducente para la supervivencia del espermatozoide debido a la manipulación.

Hasta ahora no se han comparado los momentos de adición del GLY en espermatozoides de alpaca. Por otro lado, en espermatozoides de caninos, Silva et al. (2003) y Carlotto et al. (2011) encontraron que el momento de la adición del crioprotector no influye en los resultados obtenidos después de la criopreservación. Además, Segura (2016) realizó la recuperación de espermatozoides en un dilutor que ya contenía el crioprotector, evitando la manipulación excesiva de la muestra y desbalances de temperatura posiblemente perjudiciales.

La sensibilidad de los espermatozoides a los efectos tóxicos del GLY depende de la especie (Curry, 2000). El GLY en conejos, gallos y peces presenta principalmente efectos negativos sobre la fertilidad del espermatozoide (Alvarenga et al., 2005). Otro factor de gran importancia para la efectividad del GLY y los ACP en general es la concentración utilizada. Por ejemplo, los espermatozoides de bovinos son habitualmente criopreservados en concentraciones de 4 a 8 % de GLY, y estas concentraciones se han utilizado con éxito para criopreservar espermatozoides de rumiantes salvajes y primates

(Holt, 2000). En equinos, el semen se congela utilizando concentraciones de GLY entre 2 a 5 %, aunque el efecto tóxico del glicerol a estas concentraciones ha sido reportado por diversos autores (Macías et al., 2012). La especie porcina no tolera muy bien concentraciones superiores al 3 % (0.411 M); además, al compararla con especies resistentes como el toro, los espermatozoides de cerdo presentan menor fertilidad y mayor susceptibilidad a las lesiones acrosomales utilizando GLY (Curry, 2000). En alpacas el GLY ha sido utilizado al 7 % (0.96 M) (Santiani et al., 2005; Terreros et al., 2015), 6 % (0.82 M) (Banda et al., 2010) y 2, 3 y 4 % (0.27 M, 0.41 M y 0.55 M) (Morton et al., 2007, 2010) presentando resultados variables con respecto a la motilidad. Choez (2016) comparó varias concentraciones de GLY, concluyendo que la concentración óptima era de 1.16 M.

2.4.3.2. Etilenglicol

El etilenglicol (EG) es un crioprotector utilizado principalmente para la conservación de tejido ovárico (Rodrigues et al., 2004) y de embriones (Massip, 2001). Fue utilizado por primera vez por Miyamoto y Ishibashi, 1977. Pertenece a la familia de los alcoholes y su característica más importante es su bajo peso molecular (62.07), que supera a todos los demás crioprotectores (Tabla N°2); además, su baja toxicidad y su elevada permeabilidad justifica su amplio uso en embriones (Massip, 2001); es por ello que ha sido probado como crioprotector en espermatozoides de distintas especies.

Guthrie et al. (2002) compararon EG, glicerol (GLY) y dimetilsulfóxido (DMSO) en espermatozoides de toro, concluyendo que el EG tuvo menor efecto inhibitorio sobre la motilidad que los otros dos crioprotectores, presentándolo como potencial crioprotector alternativo al glicerol. Así mismo, en especies como humanos (Gilmore et al., 2000), equinos (Ball y Vo, 2001; Henry et al., 2002), ratones (Agca et al., 2002) y chinchillas (Carrascosa et al., 2001) el EG ha tenido mejores resultados en comparación con el GLY. En equinos se ha observado que el EG causa menor perjuicio para la motilidad y viabilidad post descongelamiento en los espermatozoides (Ball y Vo, 2001); por otro lado, Alvarenga et al. (2000) concluyeron que el EG presenta propiedades similares al GLY en cuanto a conservación de motilidad e integridad acrosomal.

En espermatozoides ovinos, si bien ha tenido buenos resultados post descongelamiento, no han sido mejores que los obtenidos con el GLY (Molinia et al.,

1994; Sandoval, 2005); estos resultados fueron similares en espermatozoides caprinos (Bittencourt et al., 2004). En caninos el EG ha presentado resultados comparables a los del GLY, y hasta podría sustituirlo (Soares et al., 2002); sin embargo, otro estudio muestra que la integridad de membrana y la motilidad han sido mejor preservadas por el GLY (Cavalcanti et al., 2002). Andrade (2005) concluyó que el EG al 5 % puede ser la concentración adecuada para la protección del espermatozoide de perro contra los daños de la criopreservación.

En alpacas, Santiani et al. (2005) concluyeron que el EG al 0.7 % (0.125 M) dio mejores resultados que el GLY al 7 % (0.96 M); también, Banda et al. (2010) utilizaron EG a concentración de 0.2 M, obteniendo resultados similares. Por otro lado, Terreros et al. (2005) concluyeron que el DMSO y el GLY tuvieron motilidades más altas que el EG a la misma concentración (0.9 M). Choez (2016) probó varias concentraciones de EG en espermatozoides de alpaca, concluyendo que la concentración que dio mejores resultados fue al 1.02 M. Estos resultados indican que aún se necesitan realizar más estudios para clasificar el rol de EG en la criopreservación de espermatozoides de alpaca.

2.4.3.3. Dimetilsulfóxido

El dimetilsulfóxido (DMSO) es conocido como buen disolvente y por su capacidad de penetrar fácilmente en los tejidos animales y vegetales. Además de tener propiedades antiinflamatorias y analgésicas, actúa como un crioprotector en ambientes acuáticos o marinos, protegiendo a organismos de temperaturas extremas. Por tal motivo, se ha optado por usar el DMSO como agente crioprotector en la criopreservación de espermatozoides de cabra (Kundu et al., 2000), lobo colorado (Jhonson et al., 2014), peces (Thirumala et al., 2005; Sánchez et al., 2013), cerdo (Hood et al., 1970), caballo (Devireddy et al., 2002), humanos (Serafini et al., 2013) y conejos (Iaffaldano et al., 2012).

En un estudio, el DMSO produjo menos estrés osmótico que el GLY, pero mayor que EG, sugiriendo que el DMSO y el EG podrían ser usados como crioprotectores de espermatozoides de equinos (Ball y Vo, 2001). De igual manera, Iaffaldano et al. (2012) proponen al DMSO y al DMA como agentes crioprotectores para espermatozoides de conejos por los buenos resultados que obtuvieron. En el estudio de El-Badry et al. (2012) realizado en espermatozoides de dromedarios, se demostró que los resultados obtenidos

con DMSO en motilidad, viabilidad, integridad de membrana e integridad acrosomal, fueron similares a los de GLY.

El DMSO ha sido utilizado en espermatozoides de alpaca, comparándose con GLY, EG y DMA. Canorio et al. (2003) concluyeron que el DMSO y el DMA son buenos candidatos para ser usados en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca debido a los mejores resultados obtenidos en comparación con el GLY. Morton et al. (2007) obtuvieron mayores resultados en motilidad post descongelamiento en espermatozoides epididimarios de alpaca utilizando DMSO (35.83 %) en comparación con GLY (30.83 %) y EG (17.42 %). De igual manera, Terreros et al. (2015) obtuvieron mayor motilidad post descongelamiento utilizando DMSO (31.11 %) como agente crioprotector que GLY (23.89 %) y EG (8.3 %). Recientemente, Choez (2016) concluyó que la concentración óptima de DMSO en ese trabajo fue de 0.9 M, donde obtuvieron 35.83 % de motilidad post descongelamiento; esta concentración fue similar a la utilizada en Terreros et al. (2015) con 0.98 M pero mayor a Canorio et al. (2003) con 0.25 M. Asimismo, en el mismo estudio concluyeron que el DMSO obtuvo mejores resultados en integridad de membrana plasmática, viabilidad e integridad de membrana acrosomal.

2.4.3.4. Dimetilformamida

Anteriormente se mencionó que el glicerol es potencialmente tóxico y las concentraciones de este están ligadas a su toxicidad. Debido a esto, las amidas están siendo usadas como crioprotectores alternativos en muchas especies, y los CSA no son la excepción. Las amidas son ACP que tienen menor peso molecular que el glicerol, penetrando la membrana plasmática con mayor rapidez, reduciendo el daño al espermatozoide (Alvarenga et al., 2005).

La dimetilformamida (DMF) se ha usado para criopreservar embriones (Giraldo et al., 2012) y recientemente para la criopreservación de espermatozoides de distintas especies. En espermatozoides de equinos, el uso de DMF como crioprotector ha proporcionado un aumento en la motilidad y en la integridad de membrana post descongelamiento (Miragaya et al, 2001; Alvarenga et al., 2005; Mesa y Henao, 2011). De igual manera en porcinos, un estudio concluyó que el DMF puede reemplazar al glicerol como crioprotector debido a que obtuvo mejores resultados (Caldevilla et al., 2016).

En un estudio reciente, utilizaron DMF, DMSO, EG y GLY para criopreservar espermatozoides de dromedarios, donde se obtuvieron mejores resultados con DMF (El-Badry et al., 2016). En llamas, DMF está siendo usada últimamente en la criopreservación de espermatozoides. Carretero et al. (2013) evaluaron 3 concentraciones del DMF (7, 4 y 2 %), obteniéndose mejores valores de motilidad que los tratados con GLY, aunque no hubo diferencias significativas entre las 3 concentraciones. En alpacas, fue posible evaluar la motilidad espermática post descongelamiento utilizando DMF como agente crioprotector en concentraciones de 4 y 7 %, dando como resultados 10.4 y 8 % de motilidad total respectivamente (Flores et al., 2015).

2.4.3.5. Dimetilacetamida

El efecto crioprotector de las amidas se atribuye a su bajo peso molecular y viscosidad, los cuales incrementan la permeabilidad de la membrana, lo que reduce el estrés osmótico y el daño celular (Ball y Vo, 2001). En tal medida, el crioprotector permeable intracelular dimetilacetamida (DMA) contiene un grupo amida que le confiere alta solubilidad, su peso molecular es de 87,12 g/mol y presenta dos grupos metil hidrofóbicos que crean enlaces de hidrógeno con el agua (Iaffaldano et al., 2012), proporcionándole su capacidad crioprotectora. Otro beneficio reportado sobre la utilización de DMA como ACP es que no es contraceptivo, por ello no requiere remoción del semen congelado/descongelado para la fecundación, de este modo se reduce el daño espermático causado por la remoción del GLY antes de la inseminación (Purdy et al., 2009).

El uso de DMA como ACP ha dado resultados favorables en distintas especies, como en conejos (Iaffaldano et al., 2012; Rosato y Iaffaldano, 2013), gallos (Mocé et al., 2010), peces (Baulny et al., 1999; Atencio et al., 2013; Pardo-Carrasco et al., 2015) y caballos (Medeiros et al., 2002; Alvarenga et al., 2003). En alpacas, viene siendo utilizado en distintos trabajos como parte del proceso de criopreservación en la metodología. Por ejemplo, Trelles (2015) y Muchotrigo (2017) utilizaron DMA en concentración de 1M en el proceso de criopreservación, no siendo un objetivo de la investigación la evaluación del crioprotector. No obstante, si existen trabajos que compararon de alguna manera el efecto del DMA con el de dos o más crioprotectores. Banda et al. (2010) utilizaron DMA a 0.385 M junto a leche descremada, yema de huevo y fructosa, aunque no fue el grupo con mejores resultados. Canorio et al. (2015) concluyeron que luego del proceso de

congelación y descongelación se obtuvieron mejores valores de viabilidad e integridad de membrana cuando se usó DMA al 0.375 M; además sugirieron que el DMA es un buen candidato para ser usado en los procedimientos de criopreservación de espermatozoides de alpaca.

Los crioprotectores evaluados han obtenido distintos resultados, evaluándose y comparándose unos a otros bajo concentraciones distintas y en diferentes parámetros; lamentablemente, aún no es posible decir que crioprotector es el más efectivo, ya que no existe un trabajo de investigación que compare el efecto de todos en espermatozoides de alpaca. Es por ello que con el fin de acercarnos más a responder la interrogante planteada, este estudio fue realizado para comparar el efecto de GLY, EG, DMSO, DMF y DMA, crioprotectores utilizados en la criopreservación de espermatozoides de alpaca, sobre la funcionalidad espermática durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

La obtención de espermatozoides epididimarios, evaluación preliminar y el proceso de criopreservación de las muestras se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva y Celular de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas de la Universidad Científica del Sur (UCSUR), Villa El Salvador, Lima, Perú. La evaluación y lectura de las muestras post descongelamiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de La Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), San Borja, Lima, Perú

3.2. Diseño experimental

El diseño del trabajo de investigación fue experimental, prospectivo, longitudinal y descriptivo. Se colectaron 46 testículos de alpaca con un peso de 10 gr y tamaño de 3 cm de longitud como mínimo. Los criterios de inclusión del estudio fueron aquellas muestras que luego de la evaluación inicial tuvieron concentración espermática mayor de 50×10^6 esp/mL y motilidad espermática mayor o igual a 30%.

3.3. Procedimiento metodológico

3.3.1. Obtención de la muestra

Se obtuvieron 46 testículos de alpaca provenientes del Camal Municipal del distrito de Ninacaca, en la Provincia de Pasco. El estudio se realizó en los meses de octubre a diciembre del año 2016. Luego del sacrificio, se separaron los testículos del escroto y fueron lavados con suero fisiológico a 5 °C. Estos fueron transportados a la ciudad de Lima en recipientes con suero fisiológico dentro de una caja de transporte con refrigerantes a 5 °C (Banda et al., 2010).

3.3.2. Recuperación de espermatozoides

Según la técnica utilizada por Ugarelli (2016), para visualizar el epidídimo se retiró la túnica vaginal, posteriormente se aisló la cola del epidídimo. Con pinzas de

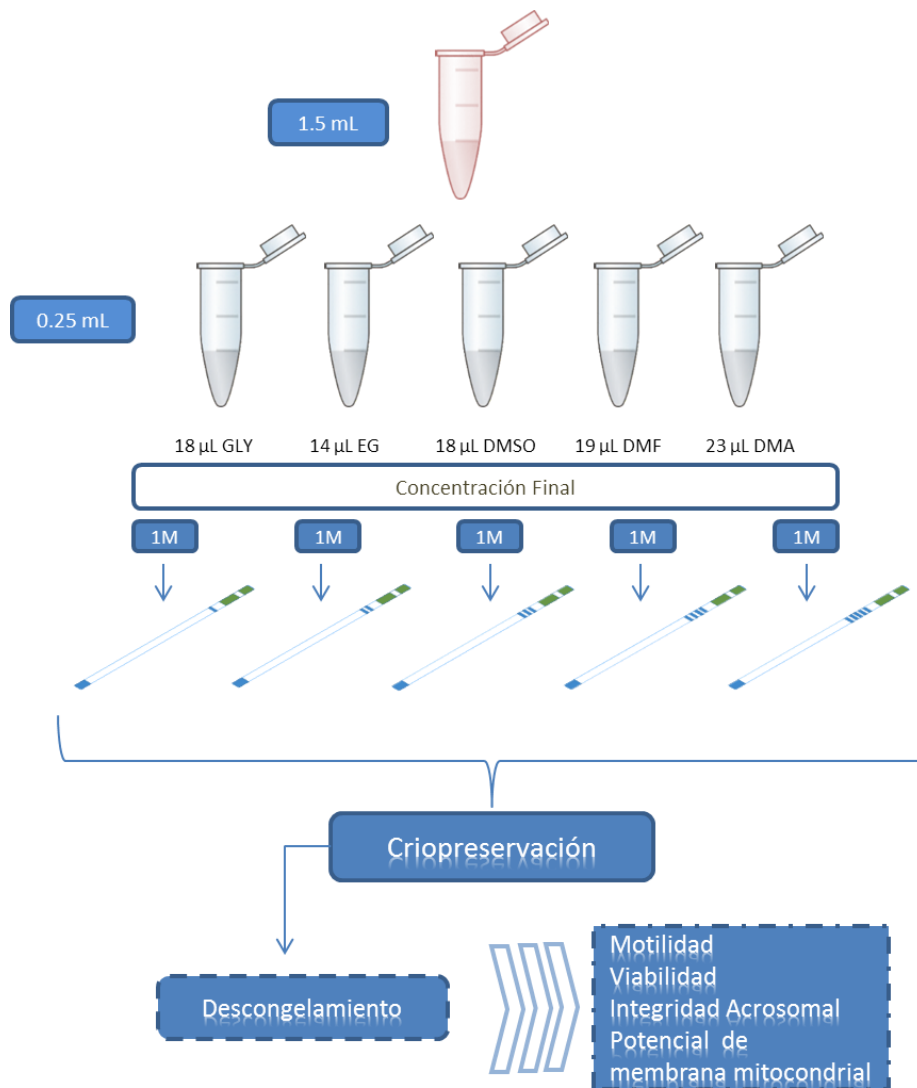
disección y tijeras de Mayo se retiró el tejido conectivo visible; con el bisel no cortante de una hoja de bisturí se corrió el contenido de los vasos sanguíneos para reducir la contaminación de la muestra. Los epidídimos fueron lavados con PBS temperado a 37.5 °C y colocados en placas Petri (30 mm) estériles y temperadas a 37.5 °C. Se agregó 1.5 mL de dilutor base (yema de huevo (1 mL), fructosa (0.96 gr) y leche descremada (c.s.p. 20 mL)) temperado a 37 °C. Se realizaron cortes seriados con la ayuda de una hoja de bisturí para la liberación de espermatozoides. Una vez terminada la liberación, se colectó la suspensión utilizando una micropipeta y se colocó en un tubo Falcón de 2 mL, los cuales se mantuvieron a 37.5 °C.

La evaluación de la calidad de la muestra consistió en la evaluación del porcentaje de motilidad total (%) y la concentración espermática ($\times 10^6$ esp/mL). Para evaluar la motilidad se retiraron 10 μ L de cada muestra y se colocaron en una lámina porta objeto temperado a 37.5 °C, las cuales fueron observadas utilizando un microscopio óptico a 40X. Para evaluar la concentración espermática se retiraron 10 μ L de cada muestra y se colocaron en una cámara de Neubauer, se observaron mediante un microscopio óptico a 40X, contando 5 cuadrantes (extremos y medio) para finalmente promediar las cantidades. Se seleccionaron 46 muestras que cumplieran con el mínimo de 30 % de motilidad espermática y 50×10^6 esp/mL de concentración espermática.

3.3.3. Grupos experimentales

Cada muestra fue dividida en 5 alícuotas de 250 μ L. Se agregó un crioprotector distinto a cada alícuota en las siguientes cantidades: GLY 18 μ L, EG 14 μ L, DMSO 18 μ L, DMF 19 μ L y DMA 23 μ L; para que cada uno de los tratamientos tenga una concentración final de 1 M. Posteriormente se prepararon pajillas de 0.25 μ L para cada tratamiento (Fig. 1).

FIGURA 1: Flujo de Procedimiento Metodológico

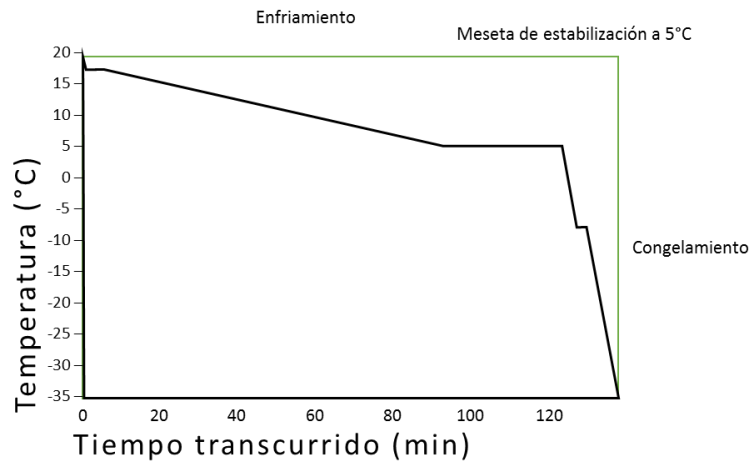


3.3.4. Criopreservación

El proceso de criopreservación se realizó utilizando una crio cámara CL 5500 de Cryologic®. Las pajillas fueron introducidas en la crio cámara, que siguió la curva de enfriamiento del programa 7 (Fig. 2), en el cual las pajillas llegaron a -35 °C en 120 min.

Las pajillas fueron llevadas a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento hasta el descongelamiento y posterior evaluación.

FIGURA 2: Curva de enfriamiento utilizada para criopreservar espermatozoides de alpaca que corresponde al programa 7 de la crio cámara CL 5500 de Cryologic®.



3.3.5. Evaluación post descongelamiento

El descongelamiento de las pajillas se realizó en baño maría a 37 °C por 1 min. Los parámetros evaluados fueron: motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y potencial de membrana mitocondrial.

Se tomaron 10 µL de cada muestra descongelada para evaluar la motilidad post descongelamiento. Cada muestra recuperada fue lavada con PBS dos veces mediante centrifugación a 600 g por 8 min y se reconstituyó en 100 µL de PBS temperado a 37.5 °C.

La evaluación de la viabilidad fue realizada integrando ioduro de propidio (PI), el cual es un fluorocromo que marca de rojo las células muertas. La solución stock de PI fue preparada diluyendo 10 mg de PI en 10 mL de PBS para llegar a una concentración final de 1 mg/mL.

Para evaluar la integridad acrosomal (IA) se utilizó el fluorocromo FITC-PSA, que marca los acrosomas dañados de verde. La solución stock se preparó diluyendo 2 mg de lectina (FITC-PSA) con 20 mL de PBS para llegar a una concentración de 100 µg/mL.

El potencial de membrana mitocondrial (PMM) se evaluó al integrar el fluorocromo MitoTracker Deep Red 633 FM. Se diluyeron 50 μL de MitoTracker en 92 μL de DMSO para llegar a una concentración final de 1 nM. Se homogenizaron y se prepararon alícuotas de 2 μL que fueron guardadas en congelación. Para la solución de trabajo se diluyeron 2 μL de solución stock MitoTracker Deep red 633 FM (1mM) en 100 μL de PBS para llegar a una concentración de 20 μM , tal como describe Allauca (2017).

A cada muestra se agregó 2.5 μL de solución stock FITC-PSA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para llegar a una concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego se agregó 0.5 μL de solución de trabajo de MitoTracker Deep Red 633 FM (20 μM) para llegar a una concentración de 100 nM. Adicionalmente se agregó 0.5 μL de solución stock de PI (1 mg/mL) para llegar a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se homogenizaron las alícuotas y se llevaron a incubación en oscuridad por 10 min a 37 °C (Allauca, 2017).

3.3.6. Evaluación mediante citometría de flujo

Para la evaluación se utilizó un equipo FlowSigh (Amnis, Seattle, WA, USA) equipado con sistema analizador de imágenes. El software de adquisición usado fue INSPIRE® versión 100.3.218.0 (Amnis, Seattle, WA, USA) y el software para analizar los datos fue IDEAS® versión 6.2 (Amnis, Seattle, WA, USA). Fueron tomados 10 mil eventos compatibles con espermatozoides en base a su tamaño y proporción largo/ancho. Los eventos fueron excitados con láseres de longitud de onda de 488 nm a 15 mW y 642 nm a 30 mW. La intensidad de fluorescencia de FITC-PSA se midió utilizando el canal de detección 02 (505 a 560 nm), mientras que la intensidad de fluorescencia de PI se midió utilizando el canal de detección 05 (642 a 740 nm). La intensidad de fluorescencia de MitoTracker Deep Red 633 FM se midió utilizando el canal de detección 11 (642 a 740 nm).

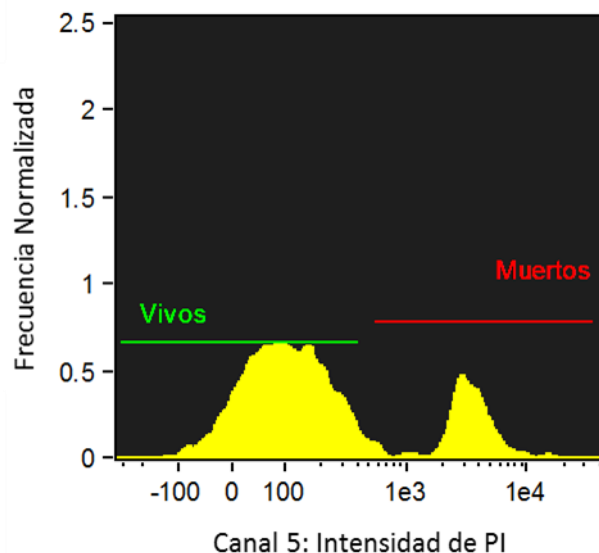
3.3.7. Lectura e interpretación de resultados

Los resultados fueron presentados mediante gráficos de histograma. En cada uno de ellos se muestran dos poblaciones, las cuales se forman y definen según la intensidad

de fluorescencia de cada evento (espermatozoides) evaluado. Asimismo, estos resultados se expresaron en porcentajes para cada población según la sonda fluorescente.

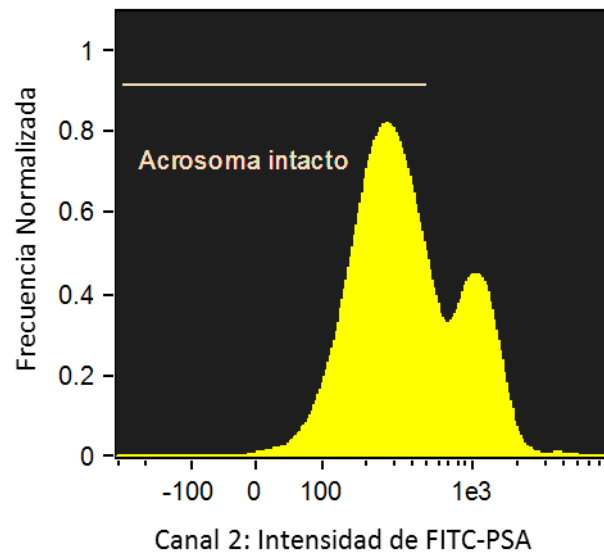
Para evaluar la viabilidad se observó la intensidad de fluorescencia (IF) de PI en el canal 05. En el histograma (Fig. 3) se observan dos poblaciones correspondientes a vivos (espermatozoides que no presentan fluorescencia roja) y muertos (espermatozoides que presentan fluorescencia roja) (Anexo 1). Los resultados fueron expresados en porcentaje (%) de espermatozoides vivos.

FIGURA 3: Histograma de canal de detección 05 que evidencia la IF de PI. Podemos observar dos poblaciones que corresponden a espermatozoides vivos y espermatozoides muertos.



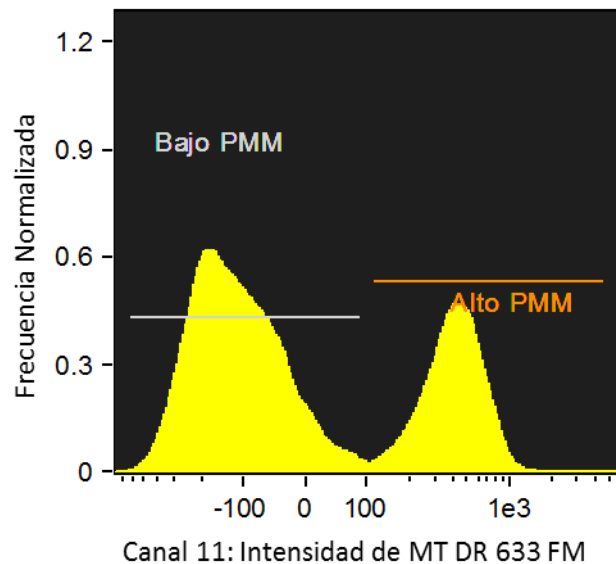
Para evaluar la integridad acrosomal se observó la IF de FITC-PSA en el canal 02. En el histograma (Fig. 4) se observan dos poblaciones, una de las cuales representa a los espermatozoides con acrosoma intacto (Espermatozoides que no presentan fluorescencia verde) (Anexo 1). Los resultados fueron expresados en porcentaje (%) de espermatozoides con integridad acrosomal.

FIGURA 4: Histograma del canal de detección 02 que evidencia la IF de FITC-PSA. Podemos diferenciar la población de espermatozoides con acrosoma intacto.



Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial (PMM) se observó la IF del MitoTracker Deep Red 633 FM en el canal 11. En el histograma (Fig. 5) se observan 2 poblaciones correspondientes a espermatozoides con alto PMM (espermatozoides que emitían alta fluorescencia en la pieza media) y espermatozoides con bajo PMM (espermatozoides que emitían poca fluorescencia en la pieza media) (Anexo 1). Los resultados fueron expresados en porcentaje (%) de espermatozoides con alto PMM.

FIGURA 5: Histograma del canal de detección 11 que evidencia la IF de MitoTracker Deep Red 633 FM. Es posible diferenciar dos poblaciones correspondientes a espermatozoides con bajo PMM y alto PMM.



3.4. Análisis estadístico

Los datos fueron transformados a valores angulares ($\text{ángulo} = \arcseno \sqrt{x}$) para acercarse a la distribución normal. Se utilizó la Prueba de Kolmogórov-Smirnov (K-S) para corroborar que los datos sigan la distribución normal. Se realizó el análisis de varianza ANOVA de un solo factor, para determinar el efecto de los crioprotectores sobre el porcentaje de motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y potencial de membrana mitocondrial. En caso de encontrar diferencias significativas ($p < 0.05$) se realizó el test de Tukey para determinar entre que grupos existieron tales diferencias.

4. RESULTADOS

En el Cuadro 3 podemos observar los valores promedio de los criterios de inclusión obtenidos al evaluar cada testículo que ingresó al estudio, donde la longitud testicular presenta 4.0 ± 0.5 cm (promedio \pm desviación estándar), el peso presenta 13.8 ± 3.7 g, la concentración espermática 151.9 ± 81.1 millones de espermatozoides/mL y la motilidad inicial presenta 62.5 ± 19.4 %.

CUADRO 3: Longitud, peso, concentración espermática y motilidad inicial promedio de los testículos de alpaca utilizados en el estudio.

Longitud (cm)	Peso (g)	Concentración (millones x 10^6 esp/mL)	Motilidad Inicial (%)
4.0 ± 0.5	13.8 ± 3.7	151.9 ± 81.1	62.5 ± 19.4

En el Cuadro 4 observamos los resultados de la evaluación post descongelamiento de motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y potencial de membrana mitocondrial promediados. Se observa que al evaluar la motilidad existen diferencia significativa ($p \leq 0.5$) entre los grupos de GLY, DMSO y DMF y el grupo de EG; siendo el grupo de DMA el que no presenta diferencia estadística con los demás grupos. Con respecto a la viabilidad, integridad acrosomal y potencial de membrana mitocondrial no se observan diferencias significativas entre los 5 grupos de crioprotectores.

CUADRO 4: Evaluación de la motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y PMM mediante el estudio de ANOVA de un solo factor en espermatozoides epididimarios de alpaca descongelados.

	GLY	EG	DMSO	DMF	DMA
Motilidad (%)	15.8 ± 9.6 ^a	10.3 ± 6.4 ^b	17.3 ± 8.5 ^a	17.9 ± 10 ^a	13.6 ± 10.7 ^{ab}
Viabilidad (%)	34.9 ± 20.8 ^a	33 ± 21.8 ^a	32.3 ± 21.6 ^a	34.2 ± 17.9 ^a	33.8 ± 18.2 ^a
IA (%)	58.6 ± 18.2 ^a	65 ± 12.7 ^a	63.3 ± 13.5 ^a	61.9 ± 12.7 ^a	61.3 ± 14.6 ^a
PMM (%)	36.1 ± 21.6 ^a	35.2 ± 23 ^a	33.5 ± 22.1 ^a	35.3 ± 18.5 ^a	34.4 ± 18.1 ^a

^{a,b} Letras diferentes en filas indican diferencias significativas (p<0.05).

5. DISCUSIÓN

Este es el primer trabajo que evalúa y compara al glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y dimetilacetamida como agentes crioprotectores bajo los mismos parámetros y utilizando técnicas sofisticadas de evaluación espermática mediante citometría de flujo y un analizador de imágenes.

En un inicio, la necesidad de buscar agentes crioprotectores alternativos al glicerol abrieron paso al uso del etilenglicol en el caso de Santiani *et al.* (2005) y al dimetilsulfóxido, como en Terreros *et al.* (2015) y Choez (2016), evaluando y comparando su efectividad. Por otro lado, las amidas han sido consideradas dentro de crioprotectores para estudiar la criopreservación de espermatozoides de camélidos sudamericanos. Carretero *et al.* (2013) evaluaron dimetilformamida en espermatozoides de llama, y obtuvieron mejores resultados comparándolo con glicerol; y Canorio *et al.* (2015) evaluó dimetilacetamida en espermatozoides de alpaca. La variedad de resultados nos dan una idea de la efectividad de los agentes crioprotectores, pero no aclara totalmente las dudas respecto a que crioprotector utilizar como base para posteriores evaluaciones. Por ello, al evaluar a todos bajo los mismos parámetros en este estudio damos la oportunidad de precisar las diferencias entre ellos y evaluar cuáles serían las mejores alternativas para suplantarse finalmente al glicerol en la criopreservación de espermatozoides de alpaca.

La motilidad inicial obtenida en este trabajo fue de 62.5 %, siendo mayor a lo reportado por Santiani et al. (2016) y menor a lo encontrado por Canorio et al. (2015) quienes obtuvieron 36 % y 77.3 %, respectivamente. En ambos trabajos también se utilizaron espermatozoides epididimarios; además, las muestras se obtuvieron en la misma época del año (primavera – verano). Las diferencias entre estudios pueden indicarnos que aun siendo muestras que provienen de machos de descarte, podemos observar que hay diferencias entre individuos y también dentro de ellos, tal y como mencionan Tibary y Vaughan (2006).

Con respecto a la motilidad espermática post descongelamiento evidenciamos que existe diferencia significativa entre el grupo de etilenglicol con 10.3 ± 6.4 % y los grupos de glicerol, dimetilsulfóxido y dimetilformamida con 15.8 ± 9.6 %, 17.3 ± 8.5 % y 17.9 ± 10 %, respectivamente. Por otro lado, el grupo de dimetilacetamida no presentó diferencia significativa con otros grupos respecto a la motilidad post descongelamiento. Estos resultados son mayores a los obtenidos por Terreros et al. (2015), quienes reportaron motilidades de 8% utilizando etilenglicol al 1.25 M como crioprotector. Por otro lado, Santiani et al. (2005) obtuvieron motilidades de 20 %. Esto puede ser debido a que la concentración del crioprotector fue menor (0.125 M) a la utilizada en este estudio (1 M). También se debe mencionar que el tipo de muestra obtenida en dicho estudio provino de machos entrenados y aceptados como buenos reproductores, a diferencia de este estudio en el cual las muestras enviadas del camal no eran de reproductores probados, sino de descarte. La motilidad obtenida por Banda et al. (2010) fue de 17 % utilizando etilenglicol al 0.2 M. Esto podría indicar que a una menor concentración de etilenglicol se obtienen resultados más altos de motilidad post descongelamiento. Caso muy distinto es el de Choez (2016), quien reportó que la concentración óptima de etilenglicol fue de 1.02 M en dicho estudio, con el cual se obtuvieron motilidades alrededor de 17 %. Tal diferencia en resultados puede deberse a que en dicho estudio se incluyeron solo muestras con motilidades iniciales iguales o mayores a 60 %, difiriendo de este estudio en el cual se incluyeron motilidades iguales o mayores a 30 %; por lo tanto se esperaría que los resultados sean diferentes a los encontrados por Choez (2016).

No se evidenciaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos respecto a viabilidad, integridad acrosomal y potencial de membrana mitocondrial. Pero comparando con otros estudios, se puede observar que los valores obtenidos en este son

similares. Se ha utilizado PI para evaluar viabilidad en espermatozoides de alpaca mediante citometría de flujo anteriormente. Cheuqueman *et al.* (2012) encontró 57 % de espermatozoides viables en muestras frescas obtenidas por vagina artificial utilizando la asociación SYBR-14/PI. Mientras que Juárez (2018) utilizando los mismo fluorocromos obtuvo 48.97 % de espermatozoides viables en muestras frescas y 32.3 % en muestras descongeladas. Este estudio se obtuvo 33.8 % de espermatozoides viables post descongelamiento, valores similares a los encontrados por Juárez (2018) utilizando dimetilacetamida como crioprotector. Cabe mencionar que a diferencia de dicho estudio que utilizó SYBR-14/PI, en este caso solo se utilizó PI como fluorocromo, siendo una prueba indirecta para evaluar la viabilidad.

Morton *et al.* (2010), Cheuqueman *et al.* (2012) y Ugarelli *et al.* (2017) evaluaron la integridad acrosomal (IA) en semen fresco obteniendo 92 %, 88 % y 95 %, respectivamente, utilizando la asociación FITC-PNA en el caso del primero y FITC-PSA en el segundo y tercer estudio. Respecto a evaluación de IA post descongelamiento, Morton *et al.* (2010) obtuvieron 77.2 % de espermatozoides con acrosoma intacto, utilizando glicerol como agente crioprotector. Los resultados obtenidos en este estudio son de 58.6 % de IA utilizando el mismo crioprotector. Es posible que la diferencia se deba a que la concentración de glicerol utilizada en el presente estudio fue de 1 M, mientras que Morton *et al.* (2010) utilizaron 0.55 M. Además, en dicho estudio se utilizó microscopía de fluorescencia para evaluar la IA, mientras que en este estudio se realizó por medio de un citómetro de flujo con analizador de imágenes. La microscopía de fluorescencia es una prueba más subjetiva, debido a que depende del ojo y la experiencia del evaluador, siendo entonces la citometría de flujo una prueba que entrega resultados más precisos y seguros. Siendo este el primer reporte sobre evaluación de IA post descongelamiento en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo utilizando cinco diferentes crioprotectores.

Respecto al potencial de membrana mitocondrial (PMM), Cheuqueman *et al.* (2013) utilizó el fluorocromo JC-1 en espermatozoides eyaculados de alpaca, mientras que Santiani *et al.* (2016) reportó el uso de Mitotracker Deep Red 633 FM en espermatozoides epididimarios frescos de alpaca. Los resultados obtenidos por Allauca (2017) utilizando también el fluorocromo Mitotracker Deep Red 633 FM fueron de 35 % de PMM post

descongelamiento, valor que es similar al 34.4 % de PMM encontrado en este estudio, en las muestras que presentaban el mismo crioprotector: dimetilacetamida.

Este estudio sirve como base para futuros experimentos, en los cuales será posible evaluar los crioprotectores a distintas concentraciones, teniendo como referencia estos resultados para disipar aún más las dudas que ejerce la criopreservación de espermatozoides de alpaca.

6. CONCLUSIÓN

- Los agentes crioprotectores glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida y dimetilformamida logran efectos significativos en cuanto a motilidad post descongelamiento en comparación con etilenglicol cuando son utilizados en concentraciones al 1M, para el congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 7.1. Abraham MC, Puhakka J, Ruete A, Al-Essawe EM, De Verdier K, Morrel JM, Bage R. Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta Vet Scand.* 2016; 58: 10.
- 7.2. Agca Y, Gilmore J, Byres M, Woods J, Liu J, Critser K. Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biol Reprod.* 2002; 67: 1493-1501.
- 7.3. Allauca P. Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2017.
- 7.4. Aller F, Rebulfi G, Cancino K, Alberio H. Influence of cryopreservation on the motility, viability and fertility of llama (*Lama glama*). *Arch Zootec.* 2003; 52: 15-23.
- 7.5. Alvarenga A, Landim-Alvarenga C, Moreira M, Cesarino M. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J.* 2000; 32: 541-545.
- 7.6. Alvarenga M, Leao K, Papa F, Landim-Alvarenga F, Medeiros A, Gomes G. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. *Havemeyer Foundation Monograph Series.* 2003; 12: 74-76.

- 7.7. Alvarenga M, Papa F, Landim-Alvarenga F, Medeiros A. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen. *Anim Reprod Sci.* 2005; 89: 105-113.
- 7.8. Amann R, Pickett B. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science.* 1987; 7: 145-176
- 7.9. Amaral A, Ramalho-Santos J. Assessment of mitochondrial potential: implications of the correct monitoring of human sperm function. *Int J Androl.* 2010; 33: 180-186.
- 7.10. Andrade A. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de crioprotectores para la conservación del semen canino. Memoria para optar el grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 2005.
- 7.11. Arruda R, Souza N, Marques A, Celeghini E, Gobesso A, Meirelles F, Binelli M, Blasques F. Evaluation of techniques using CFDA/PI. H258/FITCPSA and Trypan blue/Giemsa for assessment of the viability and acrosomal integrity of cryopreserved equine spermatozoa. *Theriogenology.* 2002; 57: 477.
- 7.12. Atencio V, Perez E, Espinoza J, Pardo S. Evaluación de dimetilacetamida como crioprotector para la crioconservación de semen de bocachico *Prochilodus magdalenae*. *Arch Med Vet.* 2013; 45: 151-158.
- 7.13. Ax R, Dally M, Didion B, Lenz R, Love C, Varner D, Hafexz B, Bellin M. Evaluación de semen. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. *Reproducción e inseminación artificial en animales.* 7ª ed. McGraw Hill Internacional. México, 2002: 375-386.
- 7.14. Ball B, Vo A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J Androl.* 2001; 22: 1061-1069.
- 7.15. Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. Efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la crioconservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista Investigación Veterinaria Perú.* 2010; 21(2): 145-153.
- 7.16. Baulny B, Labbé C, Maisse G. Membrane integrity, mitochondrial activity, ATP content, and motility of the european carfish (*Silurus glanis*) testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology.* 1999; 39: 177-184.

- 7.17. Bittencourt R, Ribeiro A, Santos A, Fürst R, Teixeira R, Chalhoub M. Freezing goat semen with glycerol and ethylene glycol as the cryoprotective agents. 15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil. 2004: 487.
- 7.18. Boiso I. Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 2001; 18(4): 20-22.
- 7.19. Bravo PW, Flores D, Ordoñez C. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. Biology of reprod. 1997; 57: 520-524.
- 7.20. Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. Anim. Reprod. Sci. 2000; 62: 173-193.
- 7.21. Bravo PW. The Reproductive process of South American Camelids. Seagull Printing, Salt Lake City, Utah, USA. 2002.
- 7.22. Bravo W, Alarcon V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, Tito F. Semen preservation and artificial insemination in domesticated south american camelids. Anim Reprod Sci. 2013; 136: 157-163.
- 7.23. Bravo W, Ordoñez, Alarcon V. Processing and freezing of semen of alpaca and llamas. 13th International Congress on Animal Reproduction. Sydney, Australia. 1996.
- 7.24. Bustinza V. La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. 1ª ed. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, 2221: 98-123.
- 7.25. Caldevilla M, Ferrante A, Pendola C, Miragaya M. Comparación del efecto de dos curvas de congelación de semen porcino. Resultados Preliminares. Spermova. 2016; 6(2): 112-118.
- 7.26. Canorio N, Paredes F, Valdivia M. Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (Vicugna pacos). Rev Inv Vet Perú. 2015; 26(3): 434-443.
- 7.27. Canorio N. Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (Vicugna pacos). Tesis para optar el grado de magister. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2008.
- 7.28. Carlotto G, Fernández V, Lira B, Santiani A. Momento de adición del glicerol sobre la calidad espermática en la criopreservación de semen canino. Rev Inv Vet Perú. 2011; 22: 183-189.

- 7.29. Carrascosa E, Martini C, Ponzio F, Busso M, Ponce A, Lacuara L. Storage of *Chinchilla lanígera* semen at 4 degrees C for 24 or 72 h with two different cryoprotectants. *Cryobiology*. 2001; 42: 301-306.
- 7.30. Carretero M, Santa-Cruz R, Neild D, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen en llama (*Lama glama*). *Spermova*. 2013; 3(2): 174-176.
- 7.31. Cavalcanti O, Moura S, Guerra P, Silva V. Cryoprotector action of the glycerol and ethylene glycol in the freezing of the dog semen. *Rev Bras Reprod Anim*. 2002; 26: 174-176.
- 7.32. Celeghini E, Arruda R, Andrade A, Nascimento J, Raphael C. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Dom Anim*. 2007; 42: 479-488.
- 7.33. Cheuqueman C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, Risopatrón J. Assessment of sperm function parameter and DNA fragmentation in ejaculated alpaca sperm (*Vicugna pacos*) by flow cytometry. *Reprod Dom Anim*. 2013; 48: 447-453.
- 7.34. Choez K. Determinación de la concentración óptima de distintos agentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Tesis para optar el grado de magister. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima; 2016.
- 7.35. Curry M. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction*. 2000; 5: 46-52.
- 7.36. De Leeuw E, De Leeuw M, Den Daas H, Colenbrander B, Werkleij J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*. 1993: 30-32-44.
- 7.37. De Mercado E, Rodriguez A, Gómez E, Sanz E. Cryopreservation of iberian pig spermatozoa. Comparison of different freezing extenders base don post-thaw sperm quality. *Anim Reprod Sci*. 2010; 118 (1): 54-61.
- 7.38. El-Badry D, Mohamed R, El-Metwally H, Abo Al-Naga T. The effect of some cryoprotectants on dromedary camel frozen-thawed semen. *Reprod Dam Anim*. 2017; 1-4.

- 7.39. Elwisy A. Reproduction in the male dromedary (*Camelus dromedaries*): a review. *Anim. Reprod. Sci.* 1998; 17: 217-241.
- 7.40. Ferré L, Werkmeister A. Desarrollo de una vagina artificial termoeléctrica para la colecta de semen. *Rev Agr Prod Anim.* 1996; 16: 363-365.
- 7.41. Flesh F, Gadella B. Dynamics of the mammalian sperm membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1469: 197-235.
- 7.42. Flores N, Cucho H, Carretero M, Ciprián R, Quispe H, Calderón N, Miragaya M, Giuliano S. Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la movilidad de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS ®. *Spermova.* 2015; 5(1): 47-50.
- 7.43. Foote R. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present and future. *J Androl.* 1982; 3: 85-100.
- 7.44. Freyre G. Experiencias de Transformación y Comercialización de la fibra de alpaca. Conferencia Internacional de Camélidos Sudamericanos. 30-31 de Marzo, Arequipa-Perú; 2006.
- 7.45. Gao Y, Liu J, McGann E, Watson F, Kleinhans W, Mazur P, Critser S, Critser K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod.* 1995; 10: 1109-1122.
- 7.46. García J, Vila L. Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol Clin Hematol.* 1984; 6: 219-225.
- 7.47. Garner D, Hafez E. Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª Ed. McGraw Hill Internacional. México, 2000: 33-53.
- 7.48. Garnica J, Achata R, Bravo PW. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod. Sci.* 1993; 32: 85-90.
- 7.49. Gilmore A, Liu J, Woods J, Peter T, Critser K. Cryoprotective agent and temperature effects on human sperm membrane permeabilities: convergence of theoretical and empirical approaches for optimal cryopreservation methods. *Human Reproduction.* 2000; 15: 335-343.
- 7.50. Giraldo J, Gómez J, Vásquez N. Efecto de la dimetilformamida sobre la viabilidad posvitricación de embriones bovinos producidos in vitro. *Revista Lasallista de Investigación.* 2012; 9: 13-20.

- 7.51. Giuliano SM. Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericanos. *Spermova*. 2012; 2 (1): 6-9.
- 7.52. Gonzales H. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia*. 2008; 10: 223-234.
- 7.53. Graham J, Kunze E, Hammerstedt R. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod*. 1990; 43: 55-64.
- 7.54. Guthrie HD, Liu J, Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod*. 2002; 67: 1811-1816.
- 7.55. Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by MitoTracker Deep Red 633. *Theriogenology*. 2005; 63: 2311-2322.
- 7.56. Henry M, Snoeck N, Cottorello P. Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology*. 2002; 58: 245-248.
- 7.57. Holt W. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 2000; 53: 47-58.
- 7.58. Hood R, Floey C, Martin T. Effects of cold shock, dilution, glycerol and dimethyl sulfoxide on cation concentrations in porcine spermatozoa. *J Amni Sci*. 1970; 30: 91-94.
- 7.59. Iaffaldano N, Di Iorio M, Pina M. The cryoprotectant used, its concentration, and the equilibration time are critical for the successful cryopreservation of rabbit sperm: Dimethylacetamine versus dimethylsulfoxide. *Theriogenology*. 2012; 78: 1381-1389.
- 7.60. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2013. Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012, P, 63.
- 7.61. Ishibashi K, Kuwanhara M, Gu Y, Kageyama Y, Tohsaka A, Suzuki F, Marumo F, Sasaki S. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 20782-20786.
- 7.62. Johnson A, Freeman E, Wildt D, Songsasen N. Spermatozoa from the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) display typical canid hypersensitivity to

- osmotic and freezing induced injury, but respond favorably to dimethyl sulfoxide. *Cryobiology*. 2014; 68: 361-370.
- 7.63. Juárez J. Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca. Tesis para optar el título profesional. Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima, 2018.
- 7.64. Kumar S, Millar J, Watson P. The effect of cooling rate on survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*. 2003; 46: 246-253.
- 7.65. Kundu C, Chakraborty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder G. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat cauda epididymal spermatozoa. *Cryobiology*. 2000; 40: 117-125.
- 7.66. Luo S, Ge Z, Wang Z, Jiang Z, Wang Z, Ouyang Y, Hou Y, Schatten H, Sun Q. Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2013; 110 (32): 13038-13043.
- 7.67. Macías B, Ortega C, Aparicio I, Miró-Morán A, Morillo A, Gallardo J. Toxicity of glycerol for the stallion spermatozoa: effects on membrane integrity and cytoskeleton, lipid peroxidation and mitochondrial membrane potential. *Theriogenology*. 2012; 77: 1280-1289.
- 7.68. Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim*. 2001; 36: 49-55.
- 7.69. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol*. 1984; 247: 125-142.
- 7.70. Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodrigues J. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? *Theriogenology*. 2002; 57: 327-344.
- 7.71. Mesa A, Henao G. Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre parámetros posdescongelación en espermatozoides de caballos criollos colombianos. *Rev. MVZ Córdoba*. 2012; 17(1): 2908-2815.
- 7.72. Miragaya M, Chaves M, Neild D, Berretta C, Agüero A. Artificial insemination using stallion semen cryopreserved with a simple manual method. In proceeding of 3rd International Symposium on Stallion Reproduction, Colorado State University, Fort Collins, USA: 56.

- 7.73. Miyamoto H, Ishibashi T. Survival of frozen-thawed mouse and rat embryos in the presence of ethylene glycol. *J Reprod Fertil.* 1977; 50: 373-375.
- 7.74. Mocé E, Grasseau I, Blesbois E. Cryoprotectant and freezing-process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Anim Reprod Sci.* 2010; 122: 359-366.
- 7.75. Molinia C, Evans G, Maxwell C. Incorporating of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology.* 1994; 42: 849-858.
- 7.76. Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate, tris and lactose based diluents, and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development.* 2007; 19: 792-796.
- 7.77. Morton K, Evans G, Maxwell W. Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology.* 2010; 74: 311-316.
- 7.78. Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.* 2002; 57: 1695-1706.
- 7.79. Muchotrigo L. Efecto de la adición de tempol y catalasa al dilutor para la criopreservación de semen de alpaca. Tesis para optar el título profesional. Universidad Científica del Sur. Lima, 2017.
- 7.80. Pacheco J. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *REDVET.* 2008; 9(4): 1-17.
- 7.81. Pardo-Carrasco S, Salas J, Reza L, Espinoza J, Atencio-García V. Criopreservación de semen de bagre blanco (*Sorubim cuspicaudus*) con dimetilacetamida como crioprotector. *Rev CES Med Zootec.* 2015; 10 (2): 122-131.
- 7.82. Parks E, Graham J. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 1992; 38: 209-222.
- 7.83. Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell.* 2000; 92: 255-266.

- 7.84. Perez E, Nichi M, Viana C, Silva R, Dalmazzo A, Góes P, Gurgel J, Barnabe V, Barnabe R. Effect of glutathione on the function and oxidative status of ovine cryopreserved sperm. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2012; 49 (4): 262-268.
- 7.85. Perez M, Apaza E, Deza H. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en el buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol. 11 simposio internacional de investigación sobre camélidos sudamericanos. Arequipa-Perú, 2006: 221.
- 7.86. Perez M. Perspectivas de la inseminación artificial en camélidos sudamericanos. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. 2005.
- 7.87. Purdy PH, Song Y, Silversides F, Blackburn HD. Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants, and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poult Sci.* 2009; 88(10): 2184-2191.
- 7.88. Quinn P, White I, Cleland R. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *J Reprod Fert.* 1969; 18: 209-220.
- 7.89. Raymundo F, Huanca W, Huertas S, gaully M. Influence of different extender son the motility in alpaca (*Lama pacos*) semen. 2nd Int. Camelid conference agro-economics of camel farming Almaty. Kazakhstan, 2000.
- 7.90. Raymundo F. Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpaca. Tesis Médico Veterinario. Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima; 2004.
- 7.91. Rodrigues P, Amorim A, Costa H, Matos H, Santos R, Lucci M, Bão N, Ohashi M, Figueiredo R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glicol. *Theriogenology.* 2004; 61: 1009-1024.
- 7.92. Rosato MP, Iaffaldano N. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology.* 2013; 79: 508-516.
- 7.93. Salamon S, Maxwell W. Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 2000; 62: 77-111.

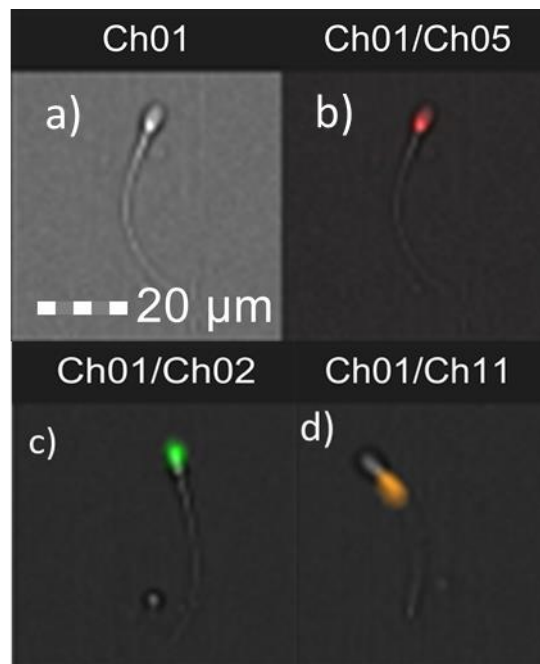
- 7.94. Sánchez E, Oliveira I, Serralheiro P, Cerqueira V. Cryopreservation of mutton snaper (*Lutjanus analis*) sperm. *An Acad Bras Cienc.* 2013; 85: 1083-1091.
- 7.95. Sandoval R. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Tesis para optar el título profesional. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, 2005.
- 7.96. Santiani A, Evangelista S, Valdivia M, Risopatrón J, Sánchez R. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology.* 2013; 79: 842-846.
- 7.97. Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. Effects on the quality of frozen thawed alpaca (*Vicugna pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl.* 2005; 7: 303-309.
- 7.98. Santiani A, Ugarelli A, Evangelista-Vargas S. Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.010>
- 7.99. Schneider U, Mazur P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology.* 1984; 21: 68-79.
- 7.100. Segura C. Efecto de cuatro tiempos de estabilización sobre el daño oxidativo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis para optar el título profesional. Universidad Científica del Sur. Lima; 2016.
- 7.101. Serafini P, Hauser D, Moyer D, Marrs R. Cryopreservation of human spermatozoa: correlations of ultrastructural sperm head configuration with sperm motility and ability to penetrate zona-free hamster ova. *Fertil Steril.* 1986; 46:691-695.
- 7.102. Silva A, Cardoso R, Silva L. Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod Dom Anim.* 2006; 41: 74-78.
- 7.103. Soares P, Rossi R, Mezzalira A, Cecim M. Ethylene glycol on canine semen cryopreservation. *Ciencia Rural.* 2002; 32: 649-655.

- 7.104. Suarez M. Efecto de la suplementación de L-cisteína en el dilutor TES-TRIS-YEMA, sobre la calidad espermática post-descongelamiento en alpaca (Lama pacos). Tesis para optar título profesional. Univ Nac Mayor de San Marcos. Lima; 2014.
- 7.105. Sukardi S, Curry M, Watson P. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim Reprod Sci.* 1997; 46: 89-96.
- 7.106. Sumar J, Leyva V. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (Lama pacos). IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Chile, 1981.
- 7.107. Sumar J. Llamas y alpacas. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. McGraw Hill Internacional. México, 2002: 224-242.
- 7.108. Terrell K, Wildt D, Anthony N, Bavister B, Leibo S, Penfold L, Marker L, Crosier A. Oxidative Phosphorylation is essential for felid sperm function, but is substantially lower in cheetah (*Acinonyx jubatus*) compared to domestic cat (*Felis catus*) ejaculate. *Biol Reprod.* 2011; 85: 473-481.
- 7.109. Terreros M, Huanca W, Arriaga I, Ampuero A. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Rev Inv Vet Perú.* 2015; 26(3): 420-426.
- 7.110. Thirumala S, Huang C, Dong Q, Tiersch T, Devireddy R. A theoretically estimated optimal cooling rate for the cryopreservation of sperm cells from a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. *Theriogenology.* 2005; 63: 2395-2415.
- 7.111. Tibary A, Memon MA. Reproduction in the male South American Camelidae. *Journal of Camel and Research.* 1999; 6(2): 235-248.
- 7.112. Tibary A, Vaughan J. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: a review and clinical observations. *Small Rumin. Res.* 2006; 61: 283-298.
- 7.113. Trelles M. Determinación de la producción intracelular de anión superóxido y peróxido de hidrógeno durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca. Tesis para optar el título profesional. Universidad Científica del Sur. Lima, 2015.

- 7.114. Ugarelli A, Evangelista-Vargas S, Santiani A. Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Rev Int Vet Perú*. 2017; 28(1): 130-140.
- 7.115. Ugarelli M. Determinación del porcentaje de integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca utilizando las lectinas *Arachis hypogaea* (PNA) y *Pisum sativum* (PSA). Tesis para optar título profesional. Universidad Científica del sur. Lima; 2016.
- 7.116. Valdivia M, Ruíz M, Bermudez L, Quinteros S, Gonzáles A, Manosalva I, Ponce C, Olazabal J, Dávalos R. Criopreservación de semen de alpacas. En: II Congreso Mundial Sobre Camélidos. Cusco, Perú. 1999.
- 7.117. Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial Insemination in alpacas (*Lama pacos*). Rural Industries Research and Development Corporation. Kington, Australia; 2003.
- 7.118. Vilella I, García E, Bernabeu R, Segovia Y, Gómez M. Efecto de la vitrificación de ovocitos humanos sobre la capacidad de unión y el estado acrosomal de espermatozoides humanos. *Int. J. Morphol*. 2015; 33(3): 835-841.
- 7.119. Watson P. The preservation of semen in mammals. En: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Finn, C.A. Oxford University Press. 1979; 1496.
- 7.120. Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 2000; 60:481 – 492.
- 7.121. Wessel M, Ball B. Step-wise dilution for removal of glycerol from fresh and cryopreserved equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2004; 84: 147-156.

8. ANEXOS

ANEXO 1: Ejemplos de espermatozoides evaluados mediante citometría de flujo y el sistema analizador de imágenes. a) Espermatozoide evaluado mediante Ch 01 el cual no capta fluorescencia. b) Espermatozoides muerto evaluado mediante el Ch 05, evidencia daño en la membrana plasmática al presentar fluorescencia roja emitida por el PI. c) Espermatozoide evaluado mediante Ch 02 que evidencia fluorescencia verde; indica un acrosoma dañado y marcado por FITC-PSA. d) Espermatozoide evaluado mediante el Ch 11, el cual presenta fluorescencia naranja en la pieza media evidenciando alto PMM dado por MitoTracker Deep Red 633 FM.



ANEXO 2. Cuadro donde se muestran los datos obtenidos de todas las muestras y variables halladas.

Fecha de congelamiento	#	Cod	Long (cm)	Peso (g)	Edad (dientes)	Concentracion x10 ⁶	Motilidad (%)					Viabilidad (%)					Integridad Acrosomal (%)					Potencial de Membrana Mitocondrial (%)					Viabilidad e integridad acrosomal (%)					
							PreCongelam	PostCongelam					Pi negativo					"FITC-PSA +"					Alto PMM					Vivos AI				
								GLY	EG	DMSO	DMF	DMA	GLY	EG	DMSO	DMF	DMA	GLY	EG	DMSO	DMF	DMA	GLY	EG	DMSO	DMF	DMA	GLY	EG	DMSO	DMF	DMA
25/10/2016	1	1A	3.5	12.8	4D	157	85.0	50.0	5.0	10.0	15.0	45.0	9.1	0.93	8.2	5.8	22.0	41.9	69.5	61.7	49.1	62.4	9.5	1.1	9.2	5.9	22.4	7.1	0.4	6.6	4.7	17.2
	2	1B	3.8	13.6	4D	204	85.0	15.0	5.0	25.0	60.0	50.0	6.8	4.24	8.8	26.3	13.9	52.4	56.9	54.9	58.5	46.1	7.5	5.5	9.6	27.1	15.1	5.8	3.4	7.5	24.2	11.5
	3	2A	4	16.2	4D	102	45.0	10.0	5.0	7.0	15.0	10.0	22.7	15.3	21.3	13.8	23.3	61.8	58.9	66.7	52.5	58.2	20.0	14.7	21.3	13.8	23.3	22.7	12.3	20.0	13.8	22.5
	4	2B	3.8	14.6	4D	154	35.0	10.0	20.0	25.0	25.0	15.0	8.7	28.2	20.2	20.3	16.2	32.6	60.4	53.7	34.1	50.7	8.7	27.8	20.2	19.6	17.6	6.5	26.4	18.7	18.5	14.0
	5	3A	3	9.2	2D	114	50.0	20.0	15.0	25.0	25.0	15.0	23.2	32	25.1	23.6	23.8	54.3	59.2	58.7	53.6	53.3	23.7	33.0	25.8	23.9	24.2	19.4	26.3	21.7	17.0	16.3
	6	3B	3.2	9.8	2D	246	40.0	10.0	15.0	20.0	20.0	15.0	23.0	32.3	25.9	0.0	41.5	53.0	51.2	43.9	0.0	55.7	23.5	35.1	28.4	0.0	45.2	19.3	9.3	1.5	0.0	28.2
	7	4A	3.5	9.1	2D	22	60.0	5.0	5.0	15.0	10.0	5.0	72.8	90.7	70.1	68.4	61.6	15.6	92.5	76.5	37.5	41.6	75.1	92.0	71.9	70.2	63.7	13.7	86.1	61.8	28.1	33.8
	8	4B	3.7	8.9	2D	28	30.0	10.0	5.0	0.0	0.0	5.0	38.0	39.3	0.0	58.0	61.6	19.3	70.4	52.1	69.1	23.3	39.0	39.4	0.0	61.0	64.0	12.2	32.8	0.0	47.7	15.9
26/10/2016	9	1A	3.5	11.2	4D	145	80.0	15.0	5.0	17.0	20.0	17.0	25.9	6.53	10.5	28.8	22.1	63.8	65.7	65.0	60.4	58.3	24.4	6.9	10.6	28.9	22.3	19.3	4.7	8.3	25.1	19.4
	10	1B	3.4	12.1	4D	142	75.0	10.0	10.0	15.0	25.0	15.0	31.6	19.4	29.2	29.1	18.2	69.5	67.8	71.6	66.2	57.0	31.8	19.6	29.4	29.2	18.3	26.5	16.4	23.6	25.1	14.8
	11	2A	4.3	26.6	6D	335	80.0	28.0	20.0	30.0	35.0	40.0	26.0	13.7	30.7	25.1	30.3	71.5	76.9	78.2	69.2	70.0	26.5	14.1	31.4	25.5	30.6	22.5	13.1	29.1	22.5	27.1
	12	2B	4.5	21.7	6D	318	75.0	15.0	20.0	30.0	25.0	20.0	45.4	36.1	37.2	38.7	27.5	58.5	74.0	72.5	68.6	62.6	45.7	36.6	37.4	39.2	27.7	27.0	31.9	33.3	34.4	21.7
	13	3A	3.8	14.5	4D	140	60.0	15.0	7.0	10.0	15.0	20.0	24.0	30.1	24.7	25.8	19.9	80.1	76.9	81.1	76.7	73.0	24.4	30.1	24.7	25.9	20.0	21.2	26.0	23.0	24.2	18.1
	14	3B	3.1	11	2D	133	65.0	15.0	5.0	5.0	10.0	5.0	41.2	28	25.2	25.8	22.4	65.8	79.7	67.3	75.6	60.0	43.6	28.2	25.7	26.3	22.7	29.4	23.8	17.8	22.8	9.2
	15	4A	4	15.3	2D	143	70.0	35.0	25.0	35.0	30.0	5.0	38.4	42.5	30.1	36.6	36.3	47.6	59.2	57.1	42.5	64.4	38.6	41.9	30.5	37.1	36.9	30.6	37.8	26.7	29.2	31.3
	16	4B	3.8	13.6	2D	112	50.0	20.0	15.0	20.0	10.0	5.0	34.6	39.7	33.6	41.2	37.3	65.0	71.2	66.1	64.9	50.1	34.9	39.9	33.8	41.7	37.5	31.6	35.4	30.0	36.1	32.3
08/11/2016	17	1A	4.4	16.3	4D	135	75.0	15.0	7.0	15.0	20.0	20.0	27.2	23.2	24.5	19.2	27.3	11.2	64.5	65.6	53.0	57.1	29.1	26.6	27.0	20.0	29.2	24.8	19.3	19.9	15.3	21.8
	18	1B	4.5	16	4D	142	70.0	10.0	7.0	10.0	15.0	5.0	28.0	31.8	24.9	21.6	29.3	68.5	67.2	69.3	62.4	66.8	29.7	35.2	27.1	23.4	32.6	24.7	27.2	19.9	17.2	24.0
	19	2A	4.8	15.1	4D	233	60.0	15.0	5.0	7.0	20.0	7.0	14.6	26.3	13.2	20.9	29.9	57.0	54.0	51.1	51.8	71.2	16.9	30.5	14.3	24.9	37.9	11.3	22.2	9.2	17.2	23.4
	20	2B	4.8	13.3	4D	146	80.0	5.0	7.0	5.0	15.0	7.0	65.5	56.3	40.9	64.8	40.2	72.1	76.5	66.1	68.6	52.2	70.2	63.6	47.2	70.7	47.6	54.5	48.8	32.8	53.7	28.9
	21	3A	3.5	12.5	2D	81	40.0	5.0	5.0	10.0	15.0	10.0	45.8	51.4	48.1	46.6	37.7	77.1	67.5	65.1	66.6	70.7	53.1	54.5	52.8	50.3	43.6	41.1	42.1	38.9	39.5	30.3
	22	3B	3.7	12.2	2D	143	60.0	5.0	10.0	15.0	7.0	5.0	45.2	33	57.0	45.2	49.5	77.5	70.3	75.6	66.2	72.4	42.8	34.2	57.1	42.3	53.1	38.9	26.3	45.3	36.8	41.9
	23	4A	4.3	11.8	2D	148	75.0	15.0	7.0	20.0	15.0	10.0	30.1	32.6	29.3	46.9	45.4	60.4	75.4	78.1	64.6	76.8	33.9	39.6	34.5	49.7	47.2	27.1	31.2	28.3	43.5	42.9
	24	4B	4.5	12.9	2D	253	80.0	35.0	20.0	30.0	20.0	25.0	41.0	43.4	47.8	37.5	41.9	66.8	70.7	49.7	50.7	63.1	49.8	48.8	53.4	38.7	44.7	37.8	39.7	24.5	30.5	39.2
23/11/2016	25	1A	4.5	20	4D	121	50.0	7.0	5.0	15.0	20.0	10.0	13.5	14.7	16.1	21.1	22.7	72.2	64.5	72.1	56.0	60.8	15.2	16.6	16.6	22.0	23.4	12.0	12.8	14.1	18.0	18.5
	26	1B	4.8	12.7	4D	133	30.0	10.0	15.0	20.0	15.0	10.0	17.5	27.5	28.5	35.0	39.3	68.5	67.4	71.9	73.0	65.4	19.7	29.3	29.9	36.0	40.3	14.7	20.1	25.2	32.0	33.3
	27	2A	4.3	18.5	2D	147	90.0	25.0	10.0	20.0	30.0	25.0	29.8	28.7	29.5	28.5	29.4	67.9	68.1	56.3	63.5	63.9	30.4	28.9	30.1	40.1	30.0	26.8	26.3	26.5	19.9	25.8
	28	2B	3.7	13.4	4D	87	30.0	10.0	10.0	25.0	15.0	20.0	43.3	32	42.1	41.4	64.4	73.0	70.7	74.3	65.4	60.3	43.3	34.3	41.8	44.7	66.4	36.1	25.6	34.6	32.0	44.3
	29	3A	3.7	13	2D	93	45.0	20.0	15.0	10.0	20.0	25.0	63.7	76.2	56.5	66.7	84.1	56.3	49.2	50.1	40.5	58.3	64.7	78.3	58.3	68.0	84.0	35.1	35.4	22.7	25.3	54.3
	30	3B	4.1	12.5	2D	78	35.0	0.0	0.0	10.0	10.0	5.0	49.7	56.9	62.6	73.5	82.9	59.5	60.4	40.6	69.0	72.4	53.1	61.0	65.3	76.1	85.9	34.7	37.4	26.7	57.0	63.4
	31	1A	5.3	20.4	NE	227	80.0	10.0	20.0	20.0	5.0	0.0	6.3	9.89	11.8	0.3	0.1	83.7	91.2	91.2	97.9	96.9	6.4	10.1	11.8	0.4	0.1	1.8	9.2	11.7	0.3	0.1
	32	1B	4.9	19.4	NE	366	85.0	15.0	15.0	20.0	20.0	0.0	14.1	11.4	16.0	7.3	12.2	87.4	80.0	84.6	86.5	81.0	14.3	11.5	16.1	7.4	12.3	11.1	9.6	13.1	6.9	9.9
33	2A	4.5	16.1	NE	164	50.0	20.0	15.0	17.0	20.0	15.0	47.1	49.6	37.7	48.5	38.4	67.2	31.9	44.1	67.6	69.2	47.3	49.6	38.0	48.5	38.3	40.7	7.3	21.3	38.2	29.7	
34	2B	4.1	12.3	NE	30	60.0	7.0	5.0	10.0	7.0	5.0	27.6	39.4	36.0	34.1	37.4	50.0	57.5	60.3	68.8	73.2	28.8	39.8	36.9	34.3	37.6	15.9	21.7	21.8	31.9	34.2	
35	3A	3.9	12.2	NE	78	30.0	10.0	5.0	15.0	5.0	10.0	62.9	76.7	86.2	23.6	23.9	68.3	74.6	60.6	73.5	74.0	68.0	80.8	90.3	25.3	24.1	46.1	61.0	60.0	18.8	20.5	
36	3B	3.8	11.4	NE	12	90.0	10.0	5.0	25.0	5.0	10.0	90.8	96.9	96.4	76.8	66.7	15.1	22.1	14.6	66.0	84.0	93.2	98.6	97.3	79.4	36.7	12.9	36.0	23.6	63.1	64.1	
37	4A	3.8	12.3	NE	291	90.0	20.0	25.0	30.0	10.0	5.0	52.1	28.1	20.1	21.7	75.4	77.4	76.7	73.4	78.8	55.5	29.0	21.7	26.6	21.8	41.5	21.8	16.9</				