

**UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE
MENDOZA DE AMAZONAS**



**FACULTAD DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA, AGRONEGOCIOS
Y BIOTECNOLOGÍA**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA ZOOTECNISTA

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**COMPARACIÓN ENTRE DILUTOR COMERCIAL Y
DILUTOR NATURAL PARA LA CRIOPRESERVACIÓN
DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE *Cavia
porcellus L.***

AUTOR: Bach. Josefát Carlos Valdivia Gallardo.

ASESORA: Ph.D. Ilse Silvia Cayo Colca.

ASESOR: M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama.

Registro: (.....)

CHACHAPOYAS – PERÚ

2023

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-H

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Valdivia Gallardo Josepat Carlos
DNI N°: 72806554
Correo electrónico: josepatcarlosv@gmail.com
Facultad: Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología
Escuela Profesional: Ingeniería Zootecnista

Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): _____
DNI N°: _____
Correo electrónico: _____
Facultad: _____
Escuela Profesional: _____

2. Título de la tesis para obtener el Título Profesional

Comparación entre Dilutor Comercial y Dilutor Natural para la
Conservación de Espermatozoides Epididimarios de Cavia Porcellus L.

3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Cayo Calca Ilse Silvia
DNI, Pasaporte, C.E N°: 09820879
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) 0000-0001-6518-0979

Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Murga Valdeprama Milton Luis
DNI, Pasaporte, C.E N°: 33430926
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) 0000-0002-1473-9055

4. Campo del conocimiento según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Inmunología)

https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html
Ciencias Agrícolas

5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el(la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación-RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 13 / diciembre / 2023

Firma del autor 1

Firma del Asesor 1

Firma del autor 2

Firma del Asesor 2



DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza, las bendiciones diarias y por darme todos los días la oportunidad de ser una mejor persona. A mis padres y mis hermanos, los cuales me apoyaron en todo lo que necesite.

Josefat Carlos Valdivia Gallardo

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la vida, la salud y la oportunidad para cumplir mis metas.

A mis padres y hermanos por su apoyo en los momentos que más los necesite en momentos más difíciles.

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), en especial a la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología (FIZAB).

A PROCENCIA (antes FONDECYT) perteneciente al CONCYTEC, por haber financiado esta investigación en el marco del Proyecto de Investigación Básica 2019-01 “Validación de biotecnologías reproductivas para la colección, análisis, procesamiento y criopreservación de semen de cuyes (*Cavia porcellus* L.), para la difusión de material genético de alta calidad, en el proceso del mejoramiento genético para la crianza de cuyes en la provincia de Chachapoyas, región Amazonas” con Contrato N° 357-2019-FONDECYT.

A mis asesores Ph.D. Ilse Silvia Cayo Colca y M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama por su contribución para la elaboración y ejecución de este Proyecto de Investigación.

Al M.Cs. Hurley Abel Quispe Ccasa por su apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Finalmente agradecer a los docentes de la FIZAB, quienes desde el primer ciclo me enseñaron y compartieron sus conocimientos adquiridos así como las experiencias que ganaron en sus vidas para el desarrollo de mi formación profesional.

Josefat Carlos Valdivia Gallardo

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Ley de creación N° 27347

Ph. D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA

Rector

Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES

Vicerrector Académico

Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOSA

Vicerrector De Investigación

Dr. HÉCTOR VLADIMIR VÁSQUEZ PÉREZ

Decano de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (x)/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Comparación entre Dilutor Comercial y Dilutor Natural para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de *Cavia porcellus* L. del egresado Josepat Carlos Valdivia Gallardo de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 02 de diciembre de 2022


Firma y nombre completo del Asesor

Ph.D. Ilse Silvia Cayo Colca

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS



UNTRM

REGLAMENTO GENERAL
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

ANEXO 3-L

VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM ()/Profesional externo (), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada Comparación entre Dilutor Comercial y Dilutor Natural para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Cavia porcellus L.; del egresado Josepat Carlos Valdivia Gallardo de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista de esta Casa Superior de Estudios.



El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 02 de diciembre de 2022


Firma y nombre completo del Asesor

M. Sc. Nilton Luis Murga Valderrama

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS



Dr. Hugo Frías Torres

PRESIDENTE



Dr. Jonathan Alberto Campos Trigos

SECRETARIO



M.Sc. César Augusto Maraví Carmen

VOCAL

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



ANEXO 3-Q

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

Comparación entre Dilutor Comercial y Dilutor Natural para la
Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Canis Porcellus L.

presentada por el estudiante ()/egresado (x) Josepat Carlos Valdivia Gallardo
de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista

con correo electrónico institucional 7280655451@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- La citada Tesis tiene 17 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual () al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- La citada Tesis tiene _____ % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 23 de febrero del 2023


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....
.....

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



ANEXO 3-5

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 14 de Marzo del año 2023, siendo las 10 horas, el aspirante: Josefat Carlos Valdivia Gallardo, asesorado por Ph.D. Ilse Silvia Cayo Coka y Dr. Milton Luis Huga Valderrama defiende en sesión pública presencial () / a distancia () la Tesis titulada: Comparación entre dilutor comercial y dilutor natural para criopreservación de espermatozoides epididimarios de cavia porcellus, para obtener el Título Profesional de Ingeniero Zootecnista a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente: Dr. Hugo Frías Torres
Secretario: Dr. Jonathan Alberto Campos Triguero
Vocal: M.Sc. César Augusto Maraví Carmen

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y métodos, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado () por Unanimidad () / Mayoría () Desaprobado ()

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 11:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.


SECRETARIO


VOCAL


PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

	Pág.
ÍNDICE	
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS	vi
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS	vii
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS	viii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS	ix
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS	x
ÍNDICE	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	17
II. MATERIAL Y MÉTODOS	20
2.1. Materiales y equipos	20
2.2. Metodología	20
2.2.1. Población, muestra y muestreo	20
2.2.2. Variables de estudio	21
2.2.3. Ubicación del estudio	21
2.2.4. Diseño experimental	22
2.2.5. Alimentación y manejo de animales	23
2.2.6. Recuperación de espermatozoides epididimarios	23
2.2.7. Evaluación macroscópica y microscópica	23
a) Concentración	23
b) Motilidad	24
c) Vitalidad	24
d) Funcionalidad de la membrana espermática (HOST)	24
e) Integridad Acrosomal	25
f) Morfología	25
g) Fragmentación del ADN	25
2.2.8. Dilución de semen	27
2.2.9. Refrigeración de semen	27
2.2.10. Equilibrado	27

2.2.11. Congelación, descongelación y análisis.....	27
2.2.12. Análisis estadístico	27
III. RESULTADOS	29
IV. DISCUSIÓN	40
V. CONCLUSIONES	46
VI. RECOMENDACIONES	47
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	48
VIII. ANEXOS.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Motilidad de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.....	28
Tabla 2. Integridad estructural y funcional de la membrana celular de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.....	29
Tabla 3. Integridad acrosomal de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.....	30
Tabla 4. Fragmentación del ADN de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a congelación.....	31
Tabla 5. Coeficientes de correlación de características de espermatozoides de cuy sometidos a refrigeración.....	32
Tabla 6. Coeficientes de correlación de características de espermatozoides de cuy sometidos a refrigeración y congelación.....	33
Tabla 7. Coeficientes de correlación de características de espermatozoides de cuy sometidos a congelación.....	34
Tabla 8. Morfometría del núcleo de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.....	35
Tabla 9. Parámetros morfométricos adimensionales del núcleo de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.....	36
Tabla 10. Morfometría del acrosoma de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.....	37
Tabla 11. Morfometría de la pieza intermedia y cola de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS	<u>Pág.</u>
Figura N° 1. Ciudad de Chachapoyas.....	20
Figura N° 2. Ubicación del Galpón de cuyes.....	21
Figura N° 3. Ubicación del laboratorio de Andrología.....	21

RESUMEN

En el laboratorio de andrología de la estación experimental de Chachapoyas de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, se evaluó las características macroscópicas y microscópicas del semen de cuy (*Cavia porcellus L.*) en fresco, refrigerado y descongelado, con el uso de dilutores comerciales y dilutores a base de yema de huevo y glicerol. El experimento constó de 7 meses donde se realizó la crianza de los machos a evaluar, se realizó su sacrificio y se extrajo sus epidídimos para evaluar su semen. Se evaluó 5 tratamientos de dilutores, 3 preparados a base de dilutor Tris, yema de huevo en concentraciones de 15%, 20% y 25% y glicerol al 8% y; 2 dilutores comerciales AndroMed® y OptiXcell®. Se evaluó las características macroscópicas y microscópicas en fresco, se refrigeró a 5° C por 3 horas, luego se procedió a evaluar las características ya antes mencionadas, se congeló-descongeló y se volvió a evaluar todas las características y posteriormente compararlas entre tratamientos y entre estados (fresco, refrigerado y descongelado). Se encontró que la motilidad total fue ligeramente mayor en Tris-huevo 15% y 20%, respecto a los otros tratamientos, pero sin diferencias significativas ($p>0.05$), la tasa de vitalidad se mantuvo en los tratamientos Tris-huevo 15%, 20% y 25%, siendo significativamente menores en AndroMed® y OptiXcell®, en espermatozoides descongelados no se encontraron diferencias significativas en las tasas de vitalidad y funcionalidad de membrana, entre todos los tratamientos ($p>0.05$).

Palabras claves: dilutor Tris, yema de huevo, AndroMed®, OptiXcell®, criopreservación.

ABSTRACT

In the andrology laboratory of the Chachapoyas experimental station of the Toribio Rodríguez de Mendoza National University of Amazonas, the macroscopic and microscopic characteristics of fresh, refrigerated and thawed guinea pig semen (*Cavia porcellus L.*) were evaluated, using commercial thinners and thinners based on egg yolk and glycerol. The experiment consisted of 7 months where the breeding of the males to be evaluated was carried out, their sacrifice was carried out and their epididymis was extracted to evaluate their semen. 5 treatments of diluters were evaluated, 3 preparations based on Tris diluter, egg yolk in concentrations of 15%, 20% and 25% and 8% glycerol and; 2 commercial AndroMed® and OptiXcell® diluters. The macroscopic and microscopic characteristics were evaluated fresh, it was refrigerated at 5 ° C for 3 hours, then the aforementioned characteristics were evaluated, it was frozen-thawed and all the characteristics were re-evaluated and later compared between treatments and between states (fresh, refrigerated and thawed). It was found that the total motility was slightly higher in Tris-egg 15% and 20%, compared to the other treatments, but without significant differences ($p>0.05$), the vitality rate was maintained in the Tris-egg 15%, 20% and 25%, being significantly lower in AndroMed® and OptiXcell®, in thawed spermatozoa no significant differences were found in the vitality rates and membrane functionality, among all the treatments ($p>0.05$).

Keywords: Tris diluter, egg yolk, AndroMed®, OptiXcell®, cryopreservation.

I. INTRODUCCIÓN

En Latinoamérica la población de cuyes se estima en 35 millones de individuos, ocupando el primer puesto el Perú con aproximadamente 27 millones en los lugares de bajos recursos económicos y baja alimentación. En el Perú las líneas locales han sido reemplazadas por líneas definidas de cuyes siendo las más conocidas la Perú, Andina y la Inti, con el propósito de mayor explotación y que de cierto modo tienen repercusiones en crías tradicionales en la sierra del Perú (Chauca, 1997).

Este crecimiento de 17 380 175; lo cual es un incremento de 37% a nivel nacional, demostrando así el crecimiento en la producción de cuy (ENA, 2017).

Los principales departamentos donde se produce son: Cajamarca, Cusco, Ancash, Apurímac y de acuerdo al piso altitudinal, se divide en (46.0%) en la zona quechua, después la zona Suni o Jalca de 20.0% y la zona Yunga Fluvial de 11.0% (INEI, 2017).

Las características de un cuy mejorado, en respuesta son más prolíferos, fuertes y con baja mortandad antes del destete. Un cuy mejorado tiende ser más producción y con esta característica podemos satisfacer la demanda. Por eso la producción es una característica muy importante en la crianza y el mejoramiento del cuy. No debemos confundir el mejoramiento genético con la manipulación genética (Kajjak, 2007).

El Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA), ha desarrollado investigaciones en mejoramiento genético, nutrición, y manejo, con resultados muy buenos, tanto dentro y fuera del país. Los resultados de estas investigaciones, se ponen a disponibilidad de los que producen la raza de cuyes PERÚ, gran productividad, precocidad y buena calidad, representando una gran serie de opciones para seguir mejorando genéticamente, en zonas de producción familiares y comerciales (INIEA, 2007).

Un semen de calidad, depende de la edad, su nutrición, enfermedades, temperatura del ambiente y el periodo de extracción, por ello es que debemos realizar algunos análisis que permitirán saber si están en los parámetros adecuados. Determinar el número preciso de espermatozoides por mililitro, es importante y es una característica variable respecto a la especie (Hafez, 1989).

Loor (2015), en su trabajo nos muestra que la concentración espermática de cuyes, colectados por el método de extirpación de epidídimo es igual a 256 millones/ml, en tanto Tapia y Tello (2016), obtiene con el mismo método de extirpación de epidídimo una concentración de 78.90 millones/ml, el cual demuestra que hay una marcada diferencia entre ellos. Por otro lado, con el método de electroeyaculación que obtuvo Pinduisaca (2018), fue de 11.02 millones/ml.

La motilidad de un espermatozoide de cuy, es curvilíneo e irregular, estando muchos de ellos pegados por su cabeza (Sumar et al., 1968).

Yucra (2013) realizó en cuyes, la extracción de espermatozoides del epidídimo, el cual reporta la motilidad progresiva del 6.16 % y la motilidad no progresiva de 20.45 %. Loor (2015), en sus estudios obtuvo el mayor porcentaje de motilidad progresiva de 73.50% siendo mayor a la de Tapia y Tello (2016) de 46.00%, siendo estas obtenidas con la técnica de colecta por extirpación de epidídimo.

La vitalidad se afecta con otros aspectos como la morfología, la motilidad, el metabolismo activo, integridad de la estructura y el funcionamiento de la membrana, así como las enzimas que intervienen en la fecundación y paso del material genético (Mellisho, 2010).

La estimación de la viabilidad del espermatozoide, se conforma del estudio de la integridad de la membrana, utilizando fluorocromos combinados: uno atraviesa la membrana plasmática que fueron dañadas o están degeneradas, por tanto, esta es la manera de identificar las células muertas. En cambio, el otro fluorocromo atraviesa membranas de las células intactas y vivas (Muiño, 2008).

Tapia y Tello (2016), obtuvo una vitalidad del espermatozoide de 35.90%, contra los 86.70% obtenido por Loor (2015); con el método por extirpación de epidídimo.

Yucra (2013), señala una vitalidad del espermatozoide de 58.28% y Mise (2014), indica una vitalidad de 93.00%, por el método de colecta post mortem.

La integridad y el funcionamiento de la membrana espermática está relacionada con intercambio de moléculas y ajuste metabólico, para determinar esto se emplean pruebas de resistencia osmótica (ORT), resistencia hiperosmótica (HRT) o el test de endósmosis o hiposmótico (HOST) (Rubio y Quintero, 2000).

Tapia y Tello (2016), enseña que la entereza de la membrana plasmática, en cuyes mejorados es de $18.0 \pm 2.82\%$, colectados del epidídimo.

Aragón (2019), señala que la funcionalidad de la membrana (reacción moderada) máxima fue de 42.22% y la mínima fue de 3.33%.

La reacción de acrosoma incluye fusión y vesiculación de la membrana acrosomal externa y la que envuelve. Es importante esta reacción en la fertilización adecuada, el cual permite la liberación de las enzimas que están tanto en el acrosoma y las mismas membranas (Meizel, 1984).

Tener una reacción acrosomal "verdadera" es la fusión de la membrana acrosomal remanente con la membrana plasmática en la zona ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, conservando la continuación de las membranas espermáticas (Meizel, 1978) (Friend et al., 1977).

Existe reacción acrosomal "falsa" estos son notables en los espermatozoides en degeneración o muertos (Meizel, 1978). Chavarría (1984), establece una reacción acrosomal en cuyes es de $13.8 \pm 5.4\%$, colectados del epidídimo.

En 2019, Aragón, señala que la integridad acrosomal máxima obtenida es 99.51% y mínima es 90.24%, los porcentajes conseguidos anteriormente son mayores a los que reporto Chavarría (1984), el cual obtuvo 13.8%, en semen colectado post mortem.

Okuyama en 1990, publico el peletizado de la esperma técnica utilizada en la esperma de ratón sobre hielo seco, consecutivamente luego insemino mediante la inseminación artificial. Aquí se utilizaron los primeros crioprotectores no permeables como el uso de la leche descremada y la rafinosa.

En cuestión el uso de soluciones crioprotectoras en la esperma de ratón genero mucho éxito, más en aquellas que contenían glicerol, DMSO y rafinosa; siendo la rafinosa en combinación con leche en polvo uno de los más eficientes en la criopreservación de la esperma de ratón (Tada et al., 1990).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Materiales y equipos

Los materiales que se utilizaron fueron los siguientes:

- Calentador de agua.
- Cuchillos.
- Termo.
- Balde de 10 L.
- Balanza de 10 kg.
- Guantes quirúrgicos.
- Bisturí N° 10.
- Kit de tijeras quirúrgicas.
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml.
- Pajillas de 0.5 ml.
- Placas Petri de 30 a 140 mm.
- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Micropipetas de 2.5 μ l, 5 μ l, 100 μ l, 200 μ l y 1000 μ l.
- TIPS (puntas) para micropipetas de 2.5 μ l, 5 μ l, 100 μ l, 200 μ l y 1000 μ l.
- Tubos de 15 ml. y 50 ml.
- Rotulador.
- Baño María.
- Termocupla.
- Platina térmica.
- Microscopio de contraste OLYMPUS CX-31.
- Microscopio de contraste OLYMPUS CX-31 con software SCA CASA.
- Microscopio de contraste OLYMPUS BX-53 con software CellSens.

2.2. Metodología

2.2.1. Población, muestra y muestreo

Estuvo compuesta por una población de 16 cuyes machos de la raza Perú, con peso aproximado de 1 kilogramo y una edad media de 3 meses. Para el trabajo se usó el 100% de la totalidad de la población de machos.

2.2.2. Variables de estudio

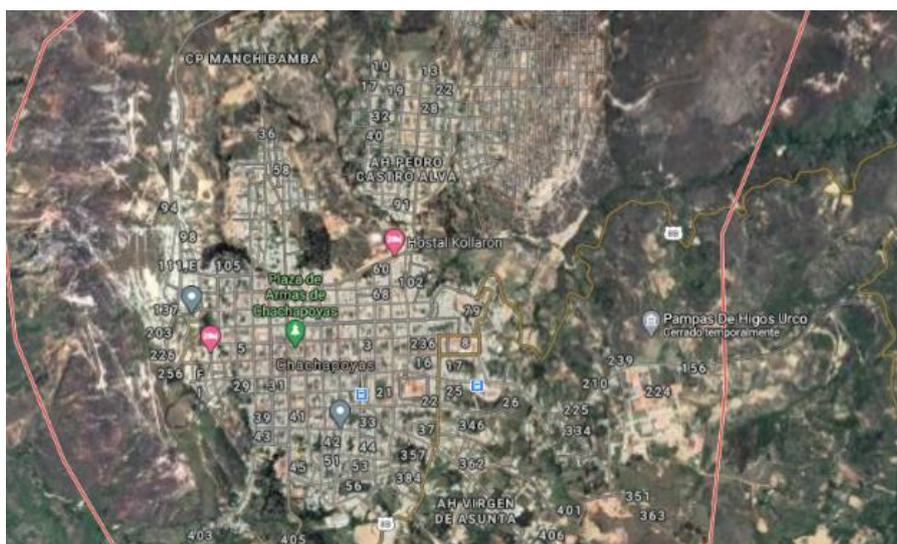
Se emplearon un dilutor en base a tres concentraciones por separado de yema de huevo (15%, 20%, 25%) y dos dilutores comerciales (AndroMed® y OptiXcell®); con el objetivo de evaluar características microscópicas en **semén fresco** (volumen, color, concentración espermática, motilidad total, vitalidad, morfología, funcionalidad de la membrana plasmática, integridad del acrosoma, fragmentación de ADN, **semén refrigerado** (motilidad, vitalidad, funcionalidad de la membrana plasmática, integridad del acrosoma) y **semén descongelado** (motilidad, vitalidad, morfología, funcionalidad de membrana, integridad acrosomal, fragmentación de ADN).

2.2.3. Ubicación del estudio

El estudio se desarrolló en la ciudad de Chachapoyas; el trabajo de manejo y cuidado de los animales se desarrolló en un galpón construido a espaldas de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza. La recolección de los datos se desarrolló en el laboratorio de la Estación Experimental Chachapoyas del Instituto de Investigación en Andrología, Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología, de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (**Figura N° 1, 2 y 3**).

Figura 1

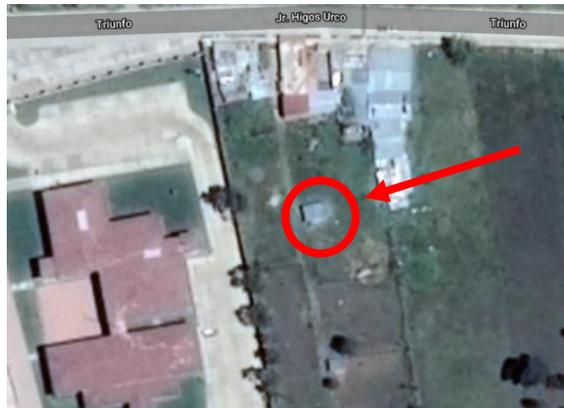
Ciudad de Chachapoyas



Nota. Google Maps

Figura 2

Ubicación del Galpón de cuyes



Nota. Google Maps

Figura 3

Ubicación del laboratorio de la Facultad de Zootecnia



Nota. Google Maps

2.2.4. Diseño experimental

El estudio se desarrolló bajo un Diseño Completo al Azar. Se evaluaron cinco tratamientos (dilutores) con 16 réplicas cada uno, haciendo un total de ochenta observaciones por cada variable. Se realizó una selección aleatoria de cuyes machos destetados a los 21 días que fueron criados durante 3 meses en condiciones ambientales homogéneas. Los cuyes pertenecían a la generación F1 del cruzamiento de cuatro machos emparentados, con tres hembras cada uno, todos provenientes de una granja en el distrito de Jazán, Amazonas. Las muestras de semen fueron colectadas pos mortem del epidídimo. Se realizó la evaluación microscópica de semen fresco, refrigerado y pos descongelado.

2.2.5. Alimentación y manejo de animales

Se utilizó machos de *Cavia porcellus L.* de tres meses de edad aproximadamente, previamente seleccionados desde el destete. Se le proporcionó una ración mixta de forraje verde (alfalfa) y concentrado dos veces al día a la misma hora, una entre las 8:00 a 9:00 a.m. y por la tarde entre las 4:00 a 5:00 p.m. y agua *ad libitum* fue por medio de chupones.

2.2.6. Recuperación de espermatozoides epididimarios

Para la recuperación de los espermatozoides epididimarios de los cuyes, se sacrificó siguiendo las normas establecidas por el código de ética, para evitar el estrés y que este influya en los datos a tomar. Luego del sacrificio, se extrajo los testículos y se colocó en un termo con agua a 37° C para su transporte al laboratorio (Huanca, 2016).

El epidídimo se colocó en una placa Petri conteniendo solución Tris (3.028 g de Base Tris molecular, 1.7 g de ácido cítrico, 1.25 g de D-fructosa, y 100 ml de agua bidestilada) previamente temperada a 37° C en una platina térmica (Souza, 2009). Luego, se hizo cortes longitudinales suaves en el epidídimo, se lavó y extrajo con una micropipeta el esperma, para ser depositado en un tubo eppendorf de 1.5ml y colocados en baño maría (Quispe et al., 2020).

2.2.7. Evaluación macroscópica y microscópica

Para la evaluación macroscópica del semen fresco, se realizó las pruebas de motilidad, concentración, vitalidad, HOST, integridad acrosomal, morfología y fragmentación del ADN.

a) Concentración

La concentración espermática se determinó en módulo de motilidad con el software SCA CASA. El semen colectado se diluyó y homogenizó en medio Tris a 37 °C. Luego, se colocó 5 µl de semen en una cámara Makler y se cubrió con la laminilla evitando la formación de burbujas con aire. La lamina fue observada en un microscopio de contraste y objetivo 10x y se capturó de 4 a 5 imágenes para calcular la concentración. Se contabilizó el número de espermatozoides en 10 cuadrantes contiguos, hasta tres veces, para sacar un promedio, y el resultado se expresó en millones por mililitro. Al resultado

final se le multiplicó por un factor de acuerdo al volumen de dilutor, para obtener la concentración inicial de la muestra (Aragon, 2019).

b) Motilidad

Se puso 5 μ l de muestra en una lámina portaobjetos previamente temperada con una platina térmica a 37 °C. Luego se cubrió con la lámina cubre objetos y la motilidad se midió en el sistema CASA acoplado a un microscopio de contraste de fases con lente de 10x en el módulo de motilidad. Se determinó los porcentajes de Motilidad Progresiva (MP), Motilidad no Progresiva (MNP) y Motilidad Total (MT) (Aragon, 2019).

c) Vitalidad

Para su análisis se utilizó las tinciones nigrosina y la eosina (1:1) previamente temperada a 37 °C. Luego, en una lámina porta objeto se colocó 5 μ l de semen (a una concentración de 50×10^6 /ml), 5 μ l de reactivo A (eosina) y 5 μ l de reactivo B (nigrosina), se homogenizó y realizó un frotis para luego dejarlo secar. Seguidamente, se contabilizaron 300 espermatozoides en objetivo 40x. Los espermatozoides rojos se clasificaron como muertos y los de color blanco como vivos (Aragon, 2019)

d) Funcionalidad de la membrana espermática (HOST)

Para el examen HOST se utilizó una solución hipoosmótica (50 mOsm/l) preparado con 0.0245 g/ml de citrato de sodio y 0.9 g/ml de d-fructuosa. Luego, 100 μ l de la solución hipoosmótica y 25 μ l de semen fueron colocados en un tubo eppendorf de 2 ml e incubados a 37°C por 5 min. Pasada la incubación, se agregó 31 μ l de solución formolada para detener la reacción al test hipoosmótico. La solución formolada, se preparó con 1 ml de solución hipoosmótica más 3 μ l de formaldehído 40% (Aragon, 2019)

Se colocó 5 μ l de la mezcla sobre la lámina portaobjetos y se realizó el conteo de 300 células espermáticas con objetivo 40x. Se consideró como endosmosis (+) a los espermatozoides con membrana íntegra cola torcida en forma helicoidal, flagelo enrollado, y como endosmosis (-) a los espermatozoides con membrana dañada y flagelo sin cambios o recto (Aragon, 2019).

e) Integridad Acrosomal

Se utilizó la tinción de Coomassie blue, y se empleó los reactivos según protocolo de Fumuso et al., (2014). Se colocó 5 μ l de muestra en una lámina portaobjetos, y se realizó un frotis para dejarlo secar. Luego, se fijó en formaldehído al 4% por unos 15 minutos. Se lavó con PBS y se aplicó la tinción de Coomassie Blue (0.22%) por 5 minutos. Posteriormente, se lavó con agua destilada y dejó secar. La evaluación se realizó en objetivo 100x, contabilizando 300 espermatozoides. Se los clasificó en 3 categorías: con acrosoma presente (acrosoma azul intenso o CB ++), acrosoma a medio teñir (azul débil o CB +), sin acrosoma (zona acrosomal sin teñir o CB -) y total de reacción (CB total = CB fuerte + y CB -).

f) Morfología

Luego de obtener los espermatozoides del epidídimo, se realizaron frótices con las muestras y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la tinción siguiendo el protocolo del kit para diferenciación celular Hemacolor®, el cual constó de 5 inmersiones de 1 segundo en solución I de fijación, 3 inmersiones de 1 segundo en solución II (eosina), 6 inmersiones de 1 segundo en solución III (azur/azul de metileno) y 2 inmersiones de 10 segundos en solución tampón para el lavado (Huanca, 2016). Se dejó escurrir y secar al ambiente para luego ser almacenadas hasta su análisis. En microscopio con objetivo 100x, cámara incorporada y el software CellSens de OLYMPUS, se midieron manualmente las variables: largo L, ancho W, área A y perímetro P, área y perímetro de acrosoma, largo de cabeza, largo y ancho de pieza intermedia, y largo de cola. Además, se calcularon los parámetros adimensionales del núcleo como elipticidad (L/W), rugosidad ($4\pi A/P^2$), elongación ($[L-W]/[L+W]$) y regularidad ($\pi LW/4A$).

g) Fragmentación del ADN

Para la reconstitución de la solución de lisis (LS) final, se colocó el BLS (solución lisis base) (Kit Halomax®) a temperatura ambiente (22 °C). Luego para reconstituir el LS final, agregamos 7 μ l del agente reductor (RA) por cada ml de BSL que se requiere para procesar un cierto número de portaobjetos. Se mezcló para homogeneizar. Debido a que la solución de LS final una vez reconstituida es inestable, se utilizó inmediatamente. Se necesitó

aproximadamente 10 ml del LS final para procesar un portaobjetos en una pequeña bandeja de incubación.

Para la inclusión de la muestra de espermatozoides en microgel de agarosa, se diluyó la muestra de espermatozoides a una concentración de 50 millones/ml. Se derritió agar en un tubo eppendorf (500 µl) a 95 – 100 °C. Luego se transfirió el tubo de agarosa eppendorf, a 37 °C y lo dejamos por 5 minutos hasta su equilibrio. Posteriormente, se colocó 25 µl de cada muestra de espermatozoides en un tubo eppendorf vacío, y transferimos 50 µl de agarosa al tubo con la muestra de semen y mezclamos suavemente, manteniendo los tubos a 37 °C. Colocamos una gota de 1,5 - 2 µl de la suspensión celular en los pocillos marcados y cubrimos 4 pocillos con un cubreobjetos de vidrio de 24 x 24 mm. Presionamos suavemente, evitando la formación de burbujas. Cada portaobjetos se mantuvo en una posición horizontal durante todo el proceso. Colocamos el portaobjetos sobre una superficie fría (de metal o vidrio preenfriado a 4 °C) y transferimos a la nevera a 4 °C durante 5 minutos para solidificar la agarosa.

Para el procesamiento de la muestra de espermatozoides, se sacó el portaobjetos del frigorífico y retiró el cubreobjetos deslizándolo suavemente. Todo el procesamiento se realizó a temperatura ambiente (22 °C). Colocamos el portaobjetos horizontalmente sobre el flotador en una placa de Petri. Luego, aplicamos LS sobre los pozos asegurándose de que estén completamente sumergidos. Se incubó durante 5 minutos, escurrimos y lavamos cubriendo el portaobjetos durante 5 minutos con abundante agua destilada utilizando una pipeta desechable. Deshidratamos por inmersión en etanol al 70%, utilizando una pipeta desechable e incubamos durante 2 minutos. Escurrimos y aplicamos etanol al 99% durante 2 minutos. Escurrimos y dejamos secar. Después del secado, los portaobjetos procesados se guardaron a temperatura ambiente en un lugar seco y oscuro. Se realizó la tinción con Diff-Quick I por 6 minutos, Diff-Quick II por 6 minutos y Wright por 15 minutos, y luego se lavó la muestra con agua de grifo por inmersión. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en plano horizontal por inmersión en placas Petri. Los espermatozoides sin ADN fragmentado mostraban núcleos con un halo grande y con manchas de dispersión de cromatina alrededor; pero los

espermatozoides con ADN fragmentado no presentaban un halo alrededor del núcleo, cuyo porcentaje era el índice de fragmentación del ADN espermático.

2.2.8. Dilución de semen

Se prepararon tres concentraciones por separado del dilutor con Tris-yema de huevo (15%, 20% y 25%) y dos dilutores comerciales (AndroMed® y OptiXcell®), que se mantuvieron en refrigeración hasta su uso. La concentración final de semen con cada uno de los dilutores por separado fue de 50×10^6 /ml.

2.2.9. Refrigeración de semen

Cada una de las diluciones fueron refrigeradas por 3 horas, a una temperatura de 5° C. Transcurrido las 3 horas de refrigeración, se volvió a realizar las pruebas que se hicieron en fresco (motilidad, vitalidad, HOST, integridad acrosomal, morfología y fragmentación del ADN).

2.2.10. Equilibrado

El equilibrado consistió en agregar el crioprotector a las muestras para que el glicerol penetre en el citoplasma de los espermatozoides. El dilutor con glicerol (8%), fue agregado luego de 2 horas de refrigeración para lograr el equilibrado.

2.2.11. Congelación, descongelación y análisis

Para la congelación, se colocó cada uno de los tratamientos en unas pajillas de 0.5 ml. Luego, se puso las pajillas en una caja de tecnopor conteniendo nitrógeno líquido para poder realizar el proceso de congelación. El registro de la bajada de temperatura se realizó con ayuda de una termocupla, tomando la disminución de la temperatura por 12 minutos llegando a -140° C. Posteriormente, las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido y transferidas a las canastillas del tanque de nitrógeno líquido hasta su evaluación. La descongelación se realizó a 37 °C por 30 segundos. Luego se cortó la pajilla y se volvió a realizar todos los procedimientos de análisis mencionados previamente (motilidad, vitalidad, HOST, integridad del acrosoma, morfología y fragmentación del ADN).

2.2.12. Análisis estadístico

Los datos fueron ordenados en una tabla de Excel y fueron sometidos a los análisis exploratorios de normalidad (prueba Kolmogorov-Smirnov $p > 0.05$) y homogeneidad de varianzas (prueba Levene $p > 0.05$). Se utilizó el siguiente modelo aditivo lineal:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde: Y_{ij} es la variable respuesta, μ es el efecto de la media de todas las observaciones, T_i es el efecto del i -ésimo tratamiento, y E_{ij} es el error experimental.

Las variables MNP en refrigerado y descongelado, MT en descongelado, vitalidad en refrigerado, CB débil en refrigerado y descongelado, CB total descongelado, Sin halo (%) y Halo medio (%) descongelado, fueron sometidos a ANOVA y la prueba de Duncan ($p < 0.05$). Por otra parte, las variables MP y MT en refrigerado, vitalidad en descongelado, HOST en refrigerado y descongelado, CB fuerte y CB negativo en refrigerado y descongelado, CB total en refrigerado, Halo grande (%) en descongelado, y todas las variables de morfometría espermática fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$). Se analizaron los coeficientes de correlación bilateral mediante la prueba no paramétrica Rho de Spearman, debido a que la mayoría de variables no se ajustaron a la normalidad y homogeneidad de varianzas. Se utilizó el programa SPSS v.15.0.

III. RESULTADOS

Se evaluaron 16 cuyes machos adultos sexualmente maduros. La concentración espermática fue de $2327.95 \pm 675.3 \times 10^6$ espermatozoides/ml, con un límite inferior de 1668.11×10^6 y límite superior 2687.8×10^6 , con un límite de confianza del 95%. En la Tabla 4 se observa los parámetros de motilidad, donde muestras frescas alcanzaron 50.09 % de motilidad progresiva y 86.02 % de motilidad total.

El proceso de refrigeración a 5° C durante 3 horas redujo significativamente las tasas de motilidad progresiva, no progresiva y total ($p < 0.01$) en todos los tratamientos. Los medios AndroMed® y OptiXcell® mostraron los valores más bajos de motilidad progresiva y motilidad total, respecto a Tris-huevo 15%, 20% y 25%, aunque no de manera significativa ($p > 0.05$).

Tabla 1

Motilidad de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.

Tratamiento	Motilidad Progresiva (%)		Motilidad No Progresiva (%)		Motilidad Total (%)	
	Prom.	±DE	Prom.	±DE	Prom.	±DE
Fresco	50.09 ^a	16.65	35.93 ^a	12.33	86.02 ^a	8.69
Tris-huevo 15%	22.11 ^b	32.73	17.88 ^b	9.96	39.99 ^b	32.26
Tris-huevo 20%	22.20 ^b	31.75	15.69 ^b	6.93	37.89 ^b	32.64
Refrigerado	21.68 ^b	31.22	16.21 ^b	7.95	37.89 ^b	32.36
AndroMed®	8.91 ^b	17.24	23.77 ^b	22.44	32.68 ^b	33.40
OptiXcell®	5.14 ^b	10.32	19.65 ^b	17.22	24.79 ^b	24.09
p-valor	<0.01*		<0.01		<0.01*	
Congelado	-	-	1.12	0.78	1.12	0.78
Tris-huevo 15%	-	-	1.44	0.77	1.44	0.77
Tris-huevo 20%	-	-	0.64	0.88	0.64	0.88
Tris-huevo 25%	-	-	0.85	0.87	0.85	0.87
AndroMed®	-	-	1.00	0.92	1.00	0.92
OptiXcell®	-	-	-	-	-	-
p-valor	-		0.83		0.83	

Nota Letras diferentes en superíndice ^(a, b) en columnas representan diferencias estadísticas al nivel $p < 0.01$. *Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis SPSS v.15.0.

Luego de la descongelación, la tasa de motilidad progresiva disminuyó drásticamente, así como la motilidad no progresiva, en todos los tratamientos.

La motilidad total fue ligeramente mayor en Tris-huevo 15% y 20%, respecto a los otros tratamientos, pero sin diferencias significativas ($p>0.05$) (Tabla 1).

El estado de la membrana celular puede evaluarse estructural y funcionalmente, luego de someter a estas células a procesos fisicoquímicos. La prueba de vitalidad de eosina-nigrosina determinó 68.50% de integridad estructural en la membrana de espermatozoides frescos, y la prueba hipoosmótica, 84.10% de integridad funcional.

Luego de la refrigeración, la tasa de vitalidad de mantuvieron en los tratamientos Tris-huevo 15%, 20% y 25%, pero fueron significativamente menores en AndroMed® y OptiXcell®. Por otro lado, la funcionalidad de membrana descendió en todos los tratamientos con tris y yema de huevo, pero descendió aún más en AndroMed® y OptiXcell® (Tabla 2).

Tabla 2

Integridad estructural y funcional de la membrana celular de espermatozoides de cuy ($n=16$) sometidos a refrigeración y congelación.

Tratamiento	Prueba Eosina-Nigrosina o VIT+ (%)		Prueba Hipoosmótica o HOST+ (%)		
	Prom.	±DE	Prom.	±DE	
Fresco	68.50 ^a	10.97	84.10 ^a	4.60	
Tris-huevo 15%	60.60 ^a	10.62	74.93 ^b	4.65	
Tris-huevo 20%	64.21 ^a	12.46	75.30 ^b	5.53	
Refrigerado	Tris-huevo 25%	64.24 ^a	12.74	74.97 ^b	5.18
	AndroMed®	34.25 ^b	13.33	50.01 ^c	9.53
	OptiXcell®	35.88 ^b	10.18	48.88 ^c	12.27
	p-valor	<0.01		<0.01*	
	Tris-huevo 15%	4.86	3.60	6.04	1.72
	Tris-huevo 20%	5.72	4.55	6.80	2.03
Congelado	Tris-huevo 25%	3.05	2.60	6.01	5.79
	AndroMed®	3.67	2.81	7.17	3.95
	OptiXcell®	3.64	3.33	6.07	2.38
	p-valor	0.09*		0.49*	

Nota. Letras diferentes en superíndice (^a, ^b) en columnas representan diferencias estadísticas al nivel $p<0.01$. *Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis SPSSv.15.0.

En espermatozoides descongelados no se encontraron diferencias significativas en las tasas de vitalidad y funcionalidad de membrana, entre todos los tratamientos ($p>0.05$). En todos los casos, el proceso de congelación redujo la integridad estructural y funcional

de los espermatozoides de cuy. El acrosoma de los espermatozoides de cuy es un organelo de gran proporción, respecto a la célula, a diferencia de otras especies de mamíferos. La integridad acrosomal determina el proceso de fecundación, pero su gran volumen puede hacerlo especialmente frágil.

Mediante una tinción aniónica con Coomassie Blue 0.22% (CB), se determinó la integridad acrosomal en espermatozoides frescos, en las categorías: tinción CB fuerte (84.05%), tinción CB débil (7.28%), tinción CB negativa (8.67%) y tinción CB total (CB fuerte + CB débil) (91.33%). La refrigeración no influyó significativamente en la tasa de CB fuerte, CB negativa ni CB total ($p>0.05$); sin embargo, en CB débil se observa un incremento del porcentaje en todos los tratamientos ($p<0.01$). Los mayores porcentajes corresponden a AndroMed® y OptiXcell®, aunque el proceso de descomposición acrosomal se observó en todos los tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3

Integridad acrosomal de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.

Tratamiento	CB Fuerte		CB Débil		CB Negativa		CB Total		
	Prom.	±DE	Prom.	±DE	Prom.	±DE	Prom.	±DE	
Fresco	84.05 ^a	8.53	7.28 ^a	3.74	8.67 ^a	5.13	91.33 ^a	5.14	
Refrigerado	Tris-huevo 15%	80.06 ^a	5.91	10.54 ^b	4.93	9.40 ^a	2.74	90.59 ^a	2.74
	Tris-huevo 20%	75.40 ^b	7.84	11.93 ^{bc}	4.00	12.67 ^{ab}	5.05	87.33 ^{ab}	5.05
	Tris-huevo 25%	74.40 ^b	6.71	13.96 ^{bc}	6.37	11.63 ^{ab}	3.36	88.37 ^{ab}	3.36
	AndroMed®	62.27 ^c	20.44	15.04 ^c	6.01	22.69 ^b	16.46	77.31 ^b	16.46
	OptiXcell®	61.48 ^c	18.64	16.54 ^c	6.39	21.97 ^b	14.89	78.03 ^b	14.89
	p-valor	<0.01*		<0.01		<0.01*		<0.01*	
Congelado	Tris-huevo 15%	4.67	3.72	5.60	3.46	89.72	7.05	10.28	7.05
	Tris-huevo 20%	5.21	5.24	5.86	3.77	88.93	8.73	11.07	8.73
	Tris-huevo 25%	5.27	4.28	6.07	3.97	88.66	8.01	11.34	8.01
	AndroMed®	4.35	4.10	7.40	9.79	88.24	10.81	11.75	10.80
	OptiXcell®	4.52	3.74	6.64	4.89	88.84	6.68	11.16	6.68
	p-valor	0.85*		0.99		0.99*		0.98	

Nota. Letras diferentes en superíndice (a, b) en columnas representan diferencias estadísticas al nivel $p<0.01$. *Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis SPSSv.15.0.

No hubo diferencia en CB fuerte, DB débil ni CB total, en todos los tratamientos en evaluación ($p<0.05$) (Tabla 6). Sin embargo, los bajos porcentajes demostraron un gran daño pudiendo impactar negativamente la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Se evaluó la tasa de fragmentación de ADN de espermatozoides frescos y descongelados de cuy, debido a las bajas tasas de viabilidad encontradas. La prueba de dispersión de la cromatina o SCD (Sperm Chromatin Dispersion) demostró un porcentaje de 83.50% de espermatozoides con halo grande, 12.99% con halo medio y 3.52% sin halo alrededor del núcleo, lo que correspondería a la tasa de fragmentación del ADN, en muestras frescas de cuy.

El porcentaje de espermatozoides con halo grande disminuyó, pero no varió entre tratamientos luego de la congelación ($p < 0.01$); por el contrario, el porcentaje de espermatozoides con halo medio se incrementó en todos los tratamientos luego de la congelación ($p < 0.05$). Sin embargo, la tasa de espermatozoides sin halo no varió luego de la congelación (Tabla 4), por lo que el núcleo y la cromatina espermática pudieron haber sufrido un daño mínimo durante la congelación, a diferencia de otras estructuras como la membrana celular o el acrosoma.

Tabla 4

Fragmentación del ADN de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a congelación.

Tratamiento	Sin Halo		Halo Medio		Halo Grande	
	Prom.	±DE	Prom.	±DE	Prom.	±DE
Fresco	3.52	4.08	12.99 ^a	5.77	83.50 ^a	8.34
Tris-huevo 15%	6.26	6.37	25.68 ^b	14.03	68.06 ^b	15.22
Tris-huevo 20%	4.78	4.93	35.89 ^b	23.55	59.33 ^b	23.19
Congelado Tris-huevo 25%	6.95	8.51	29.92 ^b	18.62	63.13 ^b	21.06
AndroMed®	6.01	6.15	29.97 ^b	23.13	64.02 ^b	20.80
OptiXcell®	5.94	6.56	22.84 ^{ab}	15.52	65.57 ^b	21.57
p-valor	0.17		0.04		0.01*	

Nota. Letras diferentes en superíndice (^a, ^b) en columnas representan diferencias estadísticas al nivel $p < 0.01$ y $p < 0.05$. *Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis SPSSv.15.0.

Según los coeficientes de Spearman, se observaron correlaciones altamente significativas entre la motilidad progresiva, no progresiva y total, con las otras características de los espermatozoides de cuy luego del proceso de refrigeración. Fueron positivas en el caso de vitalidad, HOST+, CB fuerte y CB total, y negativas con CB débil y CB negativa ($p < 0.01$), evidenciando su condición no deseable para una adecuada viabilidad del espermatozoide.

De igual modo, el porcentaje de vitalidad se correlacionó adecuadamente con HOST+, CB fuerte y CB total ($p<0.05$ y $p<0.01$) (Tabla 5). Se observaron correlaciones positivas y altamente significativas entre las variables de motilidad de espermatozoides refrigerados, con CB fuerte, CB débil y CB total de espermatozoides descongelados de cuy ($p<0.01$). Las correlaciones con HOST fueron negativas pero significativas, sugiriendo que, a mayor motilidad en refrigeración, habría menor porcentaje de funcionalidad de membrana luego de la descongelación.

La motilidad también se correlacionó negativamente con el porcentaje de fragmentación del ADN (Sin Halo), donde a mayor motilidad corresponde una menor tasa de fragmentación de daño de ADN ($p<0.05$ y $p<0.01$). La integridad estructural de la membrana o vitalidad luego de la refrigeración se correlacionó adecuadamente con la tasa de espermatozoides con cromatina intacta luego de la descongelación (Halo Grande) ($p<0.01$). Además, el estado de integridad acrosomal en refrigeración guarda correlación con los porcentajes de CB fuerte y CB total de los espermatozoides de cuy descongelados ($p<0.05$ y $p<0.01$) (Tabla 6).

Tabla 5

Coefficientes de correlación de características de espermatozoides de cuy sometidos a refrigeración.

	Mot. No Prog	Mot. Tot.	Vit.	HOST	CB Fuerte	CB Débil	CB Neg.	CB Tot.
Mot. Prog	0.499**	0.918**	0.491**	0.557**	0.468**	-0.421**	-0.424**	0.424**
	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Mot. No Prog		0.706**	0.086	0.192	0.426**	-0.396**	-0.361**	0.362**
		0.000	0.407	0.061	0.000	0.000	0.000	0.000
Mot. Tot.			0.455**	0.521**	0.471**	-0.454**	-0.389**	0.390**
			0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Vit.				0.642**	0.257*	-0.206*	-0.303**	0.303**
				0.000	0.011	0.044	0.003	0.003
HOST					0.451**	-0.443**	-0.349**	0.349**
					0.000	0.000	0.000	0.001
CB Fuerte						-0.874**	-0.844**	0.844**
						0.000	0.000	0.000
CB Débil							0.533**	-0.533**
							0.000	0.000
CB Neg.								-1.000**
								0.000

Nota. Mot. Prog.: Motilidad progresiva, Mot. No. Prog.: Motilidad no progresiva, Mot. Tot.: Motilidad total, Vit.: Vitalidad, HOST: Reacción positiva a la prueba hipoosmótica; CB fuerte: tinción intensa Coomassie Blue, CB débil: tinción débil Coomassie Blue, CB Neg.: sin tinción y acrosoma, CB Total: tinción fuerte + débil Coomassie Blue **: Correlación significativa a nivel $p<0,01$ (bilateral); *: Correlación significativa a nivel $p<0,05$ (bilateral). SPSSv.15.0.

Luego de la descongelación, la motilidad total se correlacionó negativamente con la integridad acrosomal (CB fuerte, CB débil y CB total) ($p < 0.01$) y fue positiva con la tasa de fragmentación de ADN espermático (Sin Halo) ($p < 0.05$). De igual forma, el porcentaje de reacción positiva a HOST fue correlacionado negativamente al porcentaje de espermatozoides con cromatina intacta ($p < 0.01$), sugiriendo que el proceso de congelación podría no impactar en la calidad de compactación de la cromatina, sino que el principal daño es a nivel de membrana espermática, evidenciado en las bajas tasas de motilidad, vitalidad y reacción positiva a HOST (Tabla 7).

Tabla 6

Coefficientes de correlación de características de espermatozoides de cuy sometidos a refrigeración y congelación.

Características pos-descongelación											
	Mot. No Prog	Mot. Tot.	Vit.	HOST	CB Fuerte	CB Débil	CB Neg.	CB Tot.	Sin Halo	Halo Medio	Halo Grande
Mot. Prog.	-0.177	-0.177	0.013	-0.221*	0.741**	0.592**	-0.671**	0.671**	-0.261*	-0.031	0.143
Ref.	0.117	0.117	0.909	0.048	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.761	0.164
Mot. No Prog.	0.012	0.012	-0.123	-0.435**	0.430**	0.237*	-0.340**	0.340**	-0.232*	-0.221*	0.340**
Ref.	0.914	0.914	0.277	0.000	0.000	0.034	0.002	0.002	0.023	0.031	0.001
Mot. Tot.	-0.129	-0.129	-0.086	-0.356**	0.721**	0.562**	-0.643**	0.643**	-0.278**	-0.082	0.225*
Ref.	0.255	0.255	0.448	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006	0.426	0.027
Vit. Ref.	0.031	0.031	0.197	-0.169	0.190	0.130	-0.123	0.123	-0.157	-0.161	0.269**
	0.787	0.787	0.081	0.134	0.091	0.249	0.277	0.277	0.128	0.116	0.008
HOST Ref.	-0.020	-0.020	0.134	-0.042	0.229*	0.085	-0.100	0.100	-0.078	-0.076	0.118
	0.863	0.863	0.237	0.713	0.041	0.455	0.379	0.379	0.452	0.463	0.252
CB Fuerte	-0.125	-0.125	-0.077	-0.103	0.351**	0.194	-0.260*	0.260*	-0.170	0.024	0.092
Ref.	0.271	0.271	0.500	0.362	0.001	0.085	0.020	0.020	0.098	0.820	0.374
CB Débil	0.113	0.113	0.008	0.097	-0.217	-0.082	0.109	-0.109	0.160	-0.036	-0.095
Ref.	0.319	0.319	0.947	0.391	0.053	0.468	0.335	0.335	0.120	0.727	0.358
CB Neg.	0.069	0.069	0.145	0.108	-0.375**	-0.213	0.296*	-0.296*	0.158	0.037	-0.117
Ref.	0.544	0.544	0.200	0.339	0.001	0.058	0.008	0.008	0.124	0.723	0.257
CB Tot.	-0.068	-0.068	-0.144	-0.109	0.375**	0.213	-0.296*	0.296*	-0.159	-0.037	0.117
Ref.	0.547	0.547	0.202	0.338	0.001	0.057	0.008	0.008	0.122	0.722	0.256

Nota. Mot. Prog.: Motilidad progresiva, Mot. No. Prog.: Motilidad no progresiva, Mot. Tot.: Motilidad total, Vit.: Vitalidad, HOST: Reacción positiva a la prueba hipoosmótica; CB fuerte: tinción intensa con Coomassie Blue, CB débil: tinción débil con Coomassie Blue, CB Neg.: ausencia de tinción y acrosoma, CB Total: tinción fuerte + débil a Coomassie Blue, Sin Halo: ausencia de halo de cromatina alrededor del núcleo, Halo Medio: presencia de halo medio de cromatina alrededor del núcleo, Halo Grande: presencia de halo grande alrededor del núcleo del espermatozoide. **: Correlación significativa al nivel $p < 0,01$ (bilateral); *: Correlación significativa al nivel $p < 0,05$ (bilateral). SPSSv.15.0.

Del análisis morfométrico de los espermatozoides frescos de cuy se obtuvo núcleos con medias de 8.47 μm de largo, 7.54 μm de ancho, 27.08 μm de perímetro y 54.06 μm^2 de área. Se encontró efecto significativo de los procesos de refrigeración y congelación sobre la mayoría de los parámetros morfométricos ($p < 0.01$) (Tabla 8). En el núcleo del espermatozoide, el largo fue mayor en los medios con Tris-huevo 15% y OptiXcell®, y fue menor en Tris-huevo 25%, en el que también el ancho del núcleo fue menor ($p < 0.01$). El perímetro y área nuclear disminuyeron luego de la refrigeración, siendo menores en los medios AndroMed® y OptiXcell®, probablemente por mayor deshidratación ocasionada por los componentes de los medios.

Tabla 7

Coefficientes de correlación de características de espermatozoides de cuy sometidos a congelación.

	Mot. Tot.	Vit.	HOST	CB Fuerte	CB Débil	CB Neg.	CB Tot.	Sin Halo	Halo Medio	Halo Grande
Mot. No	1.000	0.181	0.060	-0.322**	-0.224*	0.302**	-0.302**	0.26*	-0.247*	0.233*
Prog D.		0.108	0.598	0.004	0.046	0.006	0.006	0.018	0.027	0.038
Mot. Tot. D.		0.181	0.060	-0.322**	-0.224*	0.302**	-0.302**	0.263*	-0.247*	0.233*
		0.108	0.598	0.004	0.046	0.006	0.006	0.018	0.027	0.038
Vit. D.			0.169	-0.100	-0.053	0.123	-0.123	-0.164	-0.061	0.190
			0.135	0.377	0.642	0.276	0.276	0.145	0.592	0.092
HOST D.				-0.210	-0.161	0.200	-0.200	0.074	0.293**	-0.303**
				0.061	0.155	0.075	0.075	0.514	0.008	0.006
CB Fuerte D.					0.608**	-0.798**	0.798**	-0.171	0.053	0.019
					0.000	0.000	0.000	0.130	0.638	0.866
CB Débil D.						-0.938**	0.938**	-0.221*	0.156	-0.025
						0.000	0.000	0.049	0.167	0.826
CB Neg. D.							-1.000	0.200	-0.121	0.003
								0.075	0.287	0.976
CB Tot.								-0.200	0.121	-0.003
								0.075	0.287	0.976
Sin Halo D.									0.026	-0.195
									0.800	0.057
Halo Medio I										-0.901**
										0.000

Nota. Mot. Prog.: Motilidad progresiva, Mot. No. Prog.: Motilidad no progresiva, Mot. Tot.: Motilidad total, Vit.: Vitalidad, HOST: Reacción positiva a la prueba hipoosmótica; CB fuerte: tinción intensa con Coomassie Blue, CB débil: tinción débil con Coomassie Blue, CB Neg.: ausencia de tinción y acrosoma, CB Total: tinción fuerte + débil a Coomassie Blue, Sin Halo: ausencia de halo de cromatina alrededor del núcleo, Halo Medio: presencia de halo medio de cromatina alrededor del núcleo, Halo Grande: presencia de halo grande alrededor del núcleo del espermatozoide. **: Correlación significativa al nivel $p < 0,01$ (bilateral); *: Correlación significativa al nivel $p < 0,05$ (bilateral). SPSSv.15.0.

Luego de la congelación el largo del núcleo se incrementó, y fue mayor en Tris-yema 20% y OptiXcell® ($p < 0.01$), incluso mayor que en fresco. No se encontró efecto en el ancho de núcleo ($p > 0.05$), pero si en el perímetro y área, donde fueron mayores en el medio Tris-huevo 20%, y menores en los medios AndroMed® y OptiXcell®.

Los parámetros adimensionales de forma se calculan en función al largo, ancho, perímetro y área del núcleo. Los valores en fresco fueron menores a los encontrados luego de la refrigeración ($p < 0.01$). Los valores de elipticidad, elongación y regularidad del núcleo fueron mayores en OptiXcell®, seguido de los medios con Tris-huevo. Luego de la congelación, los parámetros también fueron mayores a los encontrados en espermatozoides frescos. No se encontró efecto en la elipticidad ni elongación de núcleo ($p > 0.05$), pero en Tris-huevo 20% se obtuvo mayor rugosidad y en OptiXcell® mayor regularidad ($p < 0.01$) (Tabla 9).

Tabla 8

Morfometría del núcleo de espermatozoides de cuy ($n=16$) sometidos a refrigeración y congelación.

Tratamiento	N	Largo núcleo (μm)		Ancho núcleo (μm)		Perímetro núcleo (μm)		Área núcleo (μm^2)	
		Prom.	DE	Prom.	DE	Prom.	DE	Prom.	DE
Fresco	800	8.469 ^b	0.409	7.545 ^a	0.366	27.083 ^a	2.071	54.061 ^a	5.068
Refrigerado									
Tris-huevo 15%	480	8.511 ^a	0.274	7.502 ^a	0.246	25.856 ^b	0.911	52.442 ^b	4.099
Tris-huevo 20%	480	8.490 ^{ab}	0.262	7.486 ^a	0.254	25.874 ^b	0.902	50.885 ^c	2.699
Tris-huevo 25%	480	8.380 ^c	0.383	7.406 ^b	0.324	25.682 ^c	0.962	50.521 ^d	5.328
AndroMed®	480	8.429 ^{bc}	0.313	7.492 ^a	0.283	25.416 ^d	0.944	49.453 ^d	2.667
OptiXcell®	480	8.513 ^a	0.257	7.466 ^{ab}	0.278	25.579 ^c	0.898	49.999 ^d	2.976
p-valor		<0.01*		<0.01*		<0.01*		<0.01*	
Congelado									
Tris-huevo 15%	480	8.497 ^{ab}	0.259	7.510	0.265	25.974 ^{ab}	0.835	52.178 ^b	3.112
Tris-huevo 20%	480	8.519 ^a	0.262	7.498	0.250	25.998 ^a	0.885	52.914 ^a	2.986
Tris-huevo 25%	480	8.460 ^b	0.308	7.474	0.250	25.947 ^{ab}	1.034	52.222 ^b	4.513
AndroMed®	480	8.427 ^b	0.355	7.435	0.355	25.886 ^b	0.739	51.485 ^c	2.771
OptiXcell®	480	8.516 ^a	0.260	7.477	0.286	25.811 ^b	0.903	51.376 ^c	3.133
p-valor		<0.01*		0.10*		<0.01*		<0.01*	

Nota. Letras diferentes en superíndice (a, b, c, d) en columnas representan diferencias estadísticas al nivel $p < 0.01$. *Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis SPSSv.15.0.

Tabla 9

Parámetros morfométricos adimensionales del núcleo de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.

Tratamiento	N	Elipticidad		Rugosidad		Elongación		Regularidad	
		Prom.	±DE	Prom.	±DE	Prom.	±DE	Prom.	±DE
Fresco	800	1.124 ^c	0.055	0.932 ^c	0.095	0.057 ^c	0.025	0.935 ^d	0.092
Refrigerado									
Tris-huevo 15%	480	1.136 ^b	0.051	0.987 ^a	0.077	0.063 ^b	0.023	0.962 ^c	0.089
Tris-huevo 20%	480	1.135 ^b	0.052	0.957 ^b	0.069	0.063 ^b	0.023	0.984 ^b	0.068
Tris-huevo 25%	480	1.133 ^b	0.054	0.964 ^b	0.102	0.062 ^b	0.024	0.974 ^{bc}	0.109
AndroMed®	480	1.126 ^{bc}	0.054	0.965 ^b	0.076	0.059 ^{bc}	0.024	1.005 ^a	0.071
OptiXcell®	480	1.142 ^a	0.055	0.962 ^b	0.069	0.066 ^a	0.024	1.002 ^a	0.073
p-valor		<0.01*		<0.01*		<0.01*		<0.01*	
Congelado									
Tris-huevo 15%	480	1.133	0.053	0.973 ^b	0.070	0.062	0.023	0.964 ^b	0.074
Tris-huevo 20%	480	1.137	0.050	0.986 ^a	0.073	0.064	0.022	0.951 ^b	0.067
Tris-huevo 25%	480	1.133	0.054	0.976 ^b	0.078	0.062	0.024	0.958 ^b	0.095
AndroMed®	480	1.135	0.053	0.967 ^b	0.069	0.063	0.023	0.958 ^b	0.073
OptiXcell®	480	1.141	0.057	0.972 ^b	0.079	0.065	0.025	0.977 ^a	0.074
p-valor		0.36*		<0.01*		0.39*		<0.01*	

Nota. Letras diferentes en superíndice (a, b, c, d) en columnas representan diferencias estadísticas al nivel $p < 0.01$. *Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis SPSSv.15.0.

El acrosoma es una estructura determinante para la adecuada función espermática. En espermatozoides frescos se encontró un perímetro acrosomal de 32.64 μm , área acrosomal de 78.46 μm^2 y un largo de cabeza (núcleo + acrosoma) de 12.57 μm . Luego de la refrigeración se observó reducción del perímetro y área acrosomal en los medios Tris-huevo ($p < 0.01$) y la pérdida de capuchón acrosomal en AndroMed® y OptiXcell®; por consiguiente, el largo de cabeza disminuyó en estos tratamientos ($p < 0.01$). Luego de la congelación, la pérdida de capuchón acrosomal fue alta en todos los tratamientos, por lo que el acrosoma podría ser especialmente frágil a los cambios fisicoquímicos de la criopreservación. La incorporación de moléculas que brinden protección a esta estructura podría ser útiles para la preparación de medios de congelación de espermatozoides de cuy (Tabla 10).

Tabla 10

Morfometría del acrosoma de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.

Tratamiento	N	Perímetro acrosoma (μm)		Área Acrosoma (μm^2)		Largo de cabeza (μm)	
		Prom.	$\pm\text{DE}$	Prom.	$\pm\text{DE}$	Prom.	$\pm\text{DE}$
Fresco	800	32.639 ^a	2.674	78.460 ^a	11.200	12.565 ^a	0.531
Refrigerado							
Tris-huevo 15%	480	29.544 ^b	2.400	65.852 ^b	10.685	11.996 ^b	0.563
Tris-huevo 20%	480	28.613 ^b	2.521	60.098 ^c	9.765	11.755 ^c	0.579
Tris-huevo 25%	480	27.709 ^c	7.425	59.363 ^c	16.963	11.996 ^b	1.055
AndroMed®	480	-	-	-	-	8.429 ^e	0.313
OptiXcell®	480	-	-	-	-	8.513 ^d	0.257
p-valor		<0.01*		<0.01*		<0.01*	
Descongelado							
Tris-huevo 15%	480	-	-	-	-	8.497 ^{ab}	0.259
Tris-huevo 20%	480	-	-	-	-	8.519 ^a	0.262
Tris-huevo 25%	480	-	-	-	-	8.460 ^b	0.308
AndroMed®	480	-	-	-	-	8.427 ^b	0.355
OptiXcell®	480	-	-	-	-	8.516 ^a	0.260
p-valor		<0.01*					

Nota. Letras diferentes en superíndice (a, b, c) en columnas representan diferencias estadísticas al nivel $p < 0.01$. *Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis SPSSv.15.0.

El largo de la pieza intermedia del espermatozoide de cuy no vario significativa luego de la refrigeración, pero fue significativamente menor en AndroMed® y OptiXcell® ($p < 0.01$), en cambio, el ancho de la pieza intermedia y la longitud de la cola si disminuyeron con respecto a espermatozoides frescos (Tabla 11).

Los valores de largo y ancho de pieza intermedia también fueron menores luego de la congelación ($p < 0.01$), siendo mayor en el medio Tris-huevo 20% y menor en el medio tris-huevo 25%, pero no influyó en la longitud de la cola ($p > 0.05$).

Tabla 11

Morfometría de la pieza intermedia y cola de espermatozoides de cuy (n=16) sometidos a refrigeración y congelación.

Tratamiento	N	Largo de pieza intermedia (µm)		Ancho de pieza intermedia (µm)		Largo de cola (µm)	
		Prom.	±DE	Prom.	±DE	Prom.	±DE
Fresco	800	12.417 ^a	0.875	0.725 ^a	0.074	93.787 ^a	2.615
Refrigerado							
Tris-huevo 15%	480	12.416 ^a	0.751	0.685 ^c	0.086	92.768 ^c	1.964
Tris-huevo 20%	480	12.431 ^a	0.541	0.691 ^b	0.102	93.277 ^b	2.265
Tris-huevo 25%	480	12.480 ^a	0.699	0.681 ^c	0.125	92.661 ^c	1.923
AndroMed®	480	12.246 ^b	0.655	0.683 ^c	0.104	92.651 ^c	2.177
OptiXcell®	480	12.235 ^b	0.648	0.697 ^b	0.106	92.519 ^c	1.665
p-valor		<0.01*		<0.01*		<0.01*	
Congelado							
Tris-huevo 15%	480	12.067 ^{bc}	0.570	0.657 ^c	0.095	92.271	1.479
Tris-huevo 20%	480	12.210 ^a	0.547	0.730 ^a	0.428	92.210	2.049
Tris-huevo 25%	480	12.050 ^{bc}	0.561	0.639 ^d	0.095	92.592	2.135
AndroMed®	480	11.860 ^c	0.534	0.682 ^b	0.094	92.451	2.004
OptiXcell®	480	12.139 ^b	0.553	0.657 ^c	0.099	92.286	2.160
p-valor		<0.01*		<0.01*		0.05*	

Nota. Letras diferentes en superíndice (a, b, c, d) en columnas representan diferencias estadísticas al nivel p<0.01. *Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis SPSSv.15.0.

IV. DISCUSIÓN

La concentración espermática es un parámetro de importancia porque determina la fertilidad del macho. Su valor depende según el método de extracción, condición del macho, variedad; entre otros factores. En este trabajo, la concentración promedio de las muestras colectadas fue de 2327.95×10^6 espermatozoides/ml, valor superior a 823.30, 256.60, 149.85, 418.0, y 915.23 millones por ml reportado por otros autores (Yucra, 2013; Fernandini et al., 2014; Ayala Guanga et al., 2017 y Quispe-Ccasa et al., 2021; respectivamente), quienes utilizaron el mismo método de colecta de semen; por extirpación de epidídimo. La diferencia entre los valores reportados por otros autores y este trabajo, probablemente sea debido al método de conteo espermático (cámara Neubauer, Makler o CASA); sumado a ello puede influir otros factores como edad, alimentación o genética de animal.

La motilidad permite conocer la capacidad fecundante del espermatozoide, siendo la progresiva la de mayor relevancia. El parámetro de motilidad total en este estudio fue de 86.02% y la motilidad progresiva de 50.09%, similar al trabajo reportado por Tapia y Tello (2016) que mostró una motilidad progresiva de 46.00% con el mismo método de colección; por extirpación de epidídimo. Es entendible que estos valores sean bajos, ya que los espermatozoides que se encuentran en el epidídimo aún se encuentran en proceso de maduración. Por otro lado, otros autores reportan valores de motilidad superiores; como el trabajo de Aragón (2019) quien obtuvo una motilidad progresiva de 72.15%; posiblemente debido a que uso el método de colecta por electroeyaculación.

Luego del proceso de refrigeración a 5 °C, por 3 horas y congelación, la reducción de la motilidad progresiva fue notable. Si comparamos entre los tratamientos con Tris-yema de huevo al 15%, 20% y 25% mostraron más porcentaje de motilidad progresiva luego de la refrigeración de 22.11%, 22.20% y 21.68%, respecto a la motilidad progresiva de los tratamientos con AndroMed® y OptiXcell® con 8.91% y 5.15%; aunque estas diferencias no fueron significativas entre ellas y la motilidad total de las muestras. Sumado a ello, luego de la descongelación de las muestras, no se observó ningún tipo de motilidad progresiva entre los tratamientos, pero se notó un ligero porcentaje de motilidad no progresiva entre los 5 tratamientos sin diferencias significativas. En este estudio no se investigó la causa de la disminución o ausencia de la motilidad luego de la refrigeración o congelación, pero se sabe que la motilidad está en función a la condición del cito esqueleto que compone a las mitocondrias, es probable que tanto el

proceso de refrigeración y congelación hayan dañado la conformación estructural de los microtúbulos que conforman la pieza media que es donde se produce ATP para la generación del movimiento flagelar.

La vitalidad representa el estado “vivo-muerto” de un espermatozoide. Éste puede ser evaluado mediante la prueba eosina-nigrosina. En este ensayo se determinó una vitalidad de los espermatozoides en fresco de 68.50%, valor que difiere a lo reportado por otros autores. Tapia y Tello (2016), Ayala Guanga et al., 2017, Quispe-Ccasa et al., 2021 y Loor (2015) reportaron una vitalidad de 35.90%, 60.2%, 34.86% y 86.70%. Las diferencias encontradas con los trabajos de estos autores son variables, posiblemente debido al protocolo usado, lugar donde se realizó la investigación, tiempo de exposición de los espermatozoides al ambiente, entre otros.

Los valores de vitalidad después de la refrigeración con los tratamientos de Tris-yema (15%, 20% y 25%) no difirió significativamente (60.60%, 64.21% y 64.24%; respectivamente) respecto a los valores de vitalidad de los espermatozoides en fresco (68.5%). Pero con respecto a los valores de AndroMed® y OptiXcell® estos valores se redujeron significativamente a la mitad (34.25% y 35.88%; respectivamente). Esto significa que los tratamientos con Tris-yema de huevo permiten la estabilidad y características funcionales de la membrana plasmática del espermatozoide que los tratamientos con AndroMed® y OptiXcell®, luego de la refrigeración por 3 horas.

Por otro lado, se observó que la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides decayó luego de la congelación-descongelación. Se sabe que los espermatozoides son muy sensibles tanto a temperaturas extremas como a las variaciones de la misma. Consideramos que esta sea la causa de la ausencia de vitalidad del espermatozoide luego de la congelación; aunque no podemos dilucidar si el daño se originó al momento de congelar o durante el proceso de descongelación.

La integridad funcional de la membrana espermática está directamente relacionada con la vitalidad. En este estudio se observó que los espermatozoides de semen fresco reportaron una integridad de membrana de 84.10%. Al comparar con otros trabajos se puede determinar que el HOST+ que nuestro trabajo fue superior a lo reportado por Tapia y Tello (2016), Mutwedu et al (2021) y Quispe-Ccasa et al (2021); quienes colectaron semen de epidídimo obteniendo HOST+ de 18.00%, 74.66% y 60.49%, respectivamente.

Los valores de HOST+ después de la refrigeración disminuyeron moderadamente en los tratamientos con Tris-yema de huevo, y considerablemente cuando se usaron los crioprotectores AndroMed® (50.01%) y OptiXcell® (48.88%). Así mismo, luego de la descongelación la capacidad de regulación osmótica de los espermatozoides (HOST+) se redujo considerablemente con respecto a los valores en fresco y refrigerado debido al daño de la integridad de la membrana plasmática por la temperatura baja y la variación de la temperatura. Lo curioso, es que los valores de vitalidad obtenido con el test de eosina-nigrosina y con HOST+, siguen el mismo comportamiento cuando se analiza en fresco, refrigerado o congelado, pero no son los mismo; lo que demuestra que el tipo de Test empleado influye también en los valores obtenidos.

El estado acrosomal nos garantiza la penetración de la zona pelúcida y la fusión del acrosoma con la membrana plasmática del óvulo y por ende la fecundación. En este trabajo identificamos el estado del acrosoma mediante la tinción Coomassie Blue 0.22% (CB). En las muestras de semen fresco, se obtuvo una tinción CB fuerte (84.05%), tinción CB débil (7.28%), tinción CB negativa (8.67%) y tinción CB total (CB fuerte + CB débil) (91.33%), similares a los valores reportados en los estudios de Aragón (2019); quien observó una reacción acrosomal fuerte (CB fuerte) entre 99.51% - 90.24% en espermatozoides obtenidos por el método de electroeyaculación. Por otro lado, con el método de colección por extracción del epidídimo, Chavarría (1984) obtuvo una reacción acrosomal entre $13.8\% \pm 5.4\%$.

Más aún, los procesos de refrigeración y congelación, redujeron la tinción CB total en todos los tratamientos con los dilutores Tris-yema de huevo (en las tres concentraciones), AndroMed® y OptiXcell®. Estos resultados, nos demuestra que estos crioprotectores son deficientes al momento de proteger el acrosoma de la variación de la temperatura, originándose una capacitación y reacción temprana del acrosoma y la exocitosis del contenido enzimático.

La fragmentación del ADN espermático son rupturas que se originan entre las bases y cadenas complementarias en el ADN. Esta ruptura puede deberse al estrés térmico, fallas durante la espermatogénesis, por agentes mutagénicos o por estrés propio del metabolismo celular. En este estudio observamos que el 83.50% de espermatozoides de semen fresco poseían halo grande, el 12.99% halo medio y el 3.52% sin halo alrededor del núcleo. Estos valores nos indica que aún los espermatozoides del epidídimo pueden

contener ADN en estado integro. Curiosamente, luego de la refrigeración y congelación, el número de espermatozoides con ADN integro disminuyó, pero no fue inferior al 59%. Posiblemente debido a que los espermatozoides obtenidos estuvieron inicialmente en buena condición y que el estrés térmico tuvo un ligero efecto sobre el ADN.

Se analizó las correlaciones de variables durante la refrigeración y descongelación. Durante la refrigeración, la MP, MNP y MT, se correlacionaron positivamente con la vitalidad, HOST+, CB fuerte y CB total, y negativamente con CB débil y CB negativa, indicando la condición no deseable de estas dos últimas variables para la calidad espermática. También se observó correlaciones positivas entre la motilidad de espermatozoides refrigerados, con CB fuerte, CB débil y CB total de espermatozoides descongelados de cuy. Algo curioso fueron las correlaciones negativas de motilidad con HOST luego de la congelación, sugiriendo que, a mayor motilidad en refrigeración, habría menor porcentaje de funcionalidad de membrana luego de la descongelación. Es así que, la correlación negativa entre la motilidad con el porcentaje de fragmentación del ADN (Sin Halo), nos sugiere que a mayor motilidad corresponde una menor tasa de fragmentación de daño de ADN, e indicaría además que la integridad estructural de la membrana se mantiene durante la refrigeración y con la integridad estructural del ADN (Halo Grande). Luego de la descongelación, la funcionalidad de la membrana espermática (HOST+) se correlacionó negativamente al porcentaje de espermatozoides con cromatina intacta ($p < 0.01$), sugiriendo que el proceso de congelación podría no impactar en la calidad de la cromatina, sino que el principal daño ocurriría a nivel de membrana plasmática, evidenciado por las bajas tasas de motilidad, vitalidad y reacción positiva a HOST.

Con relación al análisis morfométrico de los espermatozoides en fresco, se obtuvo en las mediciones del núcleo un promedio de 8.47 μm de largo, 7.54 μm de ancho, 27.08 μm de perímetro y 54.06 μm^2 de área. Además, se observó, que los procesos de refrigeración y descongelación afectaron estas dimensiones, aunque sin seguir un patrón en especial. La refrigeración con Tris-yema de huevo al 15%, incrementó el largo de núcleo y el máximo incremento fue con OptiXcell® (8.513 μm). Con relación al ancho del núcleo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos en refrigeración, pero sí con relación a los espermatozoides de semen al hacer las mediciones del perímetro del núcleo y área del núcleo en los tratamientos a base de dilutores comerciales AndroMed® y OptiXcell®, posiblemente a que estos crioprotectores

originaron mayor deshidratación al momento de la refrigeración por los componentes (azúcares) y sus concentraciones que poseen.

En el caso de la descongelación, la tendencia de los resultados de la refrigeración se mantiene. Es decir, los valores de largo de núcleo aumentaron cuando se usó Tris-yema de huevo al 20% (8.519 μm de largo) y un ligero aumento con OptiXcell® (8.516 μm de largo). No se encontraron diferencias con relación al ancho de núcleo al igual que en espermatozoides refrigerados, pero si hubo reducción del perímetro y área del de núcleo en los 5 tratamientos, destacando que con el tratamiento de Tris-yema de huevo al 20% se obtuvo los mayores valores (25.998 μm de perímetro de núcleo y 52.914 μm^2 de área de núcleo). Los menores valores fueron obtenidos con los tratamientos AndroMed® y OptiXcell®. Por lo tanto, se deduce que los crioprotectores en base a Tris-yema de huevo al 20%, protege las membranas del espermatozoide, favoreciendo la rehidratación del espermatozoide. Con relación a los parámetros adimensionales del núcleo (elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad) lo menores valores (menos deformidad) se observaron en fresco e incrementaron con la refrigeración y el congelamiento (mayor deformidad). Se puede observar que durante el descongelamiento los crioprotectores que protegieron mejor al núcleo del espermatozoide fueron el OptiXcell® y Tris-yema de huevo 20%.

En la morfometría del acrosoma de los espermatozoides, los valores promedio en fresco fueron de 32.639 μm de perímetro, 78.46 μm^2 de área y un largo de cabeza total de 12.565 μm . Estos valores disminuyeron al momento de la refrigeración. El uso del crioprotector Tris-yema de huevo al 15%, mantuvo las dimensiones (perímetro y área del acrosoma) del acrosoma comparado al de 20% y 25%. Por otro lado, con el uso de AndroMed® y OptiXcell®, no se registró ningún valor de perímetro ni de área, esto es por la pérdida del acrosoma. Es decir, que estos últimos dilutores podrían contener componentes con efectos adversos en la conservación del acrosoma de los espermatozoides epididimarios de cuyo durante la refrigeración. Más aún, el perímetro y área del acrosoma después de la descongelación no se registraron por la pérdida del acrosoma.

Debemos tener en cuenta dos cosas: lo primero es que la pérdida del acrosoma es porque el acrosoma fue frágil en los cambios fisicoquímicos de la criopreservación (intercambio osmótico) y lo segundo es que los tratamientos utilizados no tienen efecto en la

congelación y la descongelación de los espermatozoides, es decir, que los componentes de los tratamientos no fueron los óptimos en la conservación de esta estructura en especial.

La morfometría de la pieza intermedia y la cola del espermatozoide en fresco fueron de 12.417 μm de largo de pieza intermedia, 0.725 μm de ancho de pieza intermedia y 93.787 μm de largo de cola. En la refrigeración estos valores no tuvieron diferencias significativas en tratamiento 1, 2 y 3, siendo el tratamiento 2 de Tris-yema de huevo 20% el que mejores valores obtuvo en largo y ancho de pieza intermedia, pero sin cambios en lo que respecta a largo de cola. En la descongelación, el tratamiento 2 de Tris-yema de huevo 20% es también el que mejores valores obtuvo en el largo y ancho de pieza intermedia con respecto a los demás tratamientos, pero no hubo diferencias en el largo de cola.

V. CONCLUSIONES

- El método de colección determina las características espermáticas, en este trabajo realizado, el método de colecta fue por extirpación de epidídimo, aunque algunos valores obtenidos en estas características fueron mayores con trabajos realizados con el mismo método de colecta; debemos evaluar con otros métodos de colecta realizados por otros autores.
- La colecta de espermatozoides epididimarios puede relacionarse con las características espermáticas, ya que los espermatozoides epididimarios no tienen la madurez suficiente y es por eso que se deben considerar otros métodos de colecta.
- La composición de los tratamientos de Tris-yema de huevo, influye en la criopreservación de los espermatozoides, mayores o menores concentraciones de estos componentes determinan las características de criopreservación de los espermatozoides.
- Los tratamientos con AndroMed® y OptiXcell® por ser elaborados para la criopreservación de espermatozoides de otras especies animales influyen de manera negativa en las características espermáticas de los espermatozoides de cuyes.
- El método de descenso de temperatura en el proceso de congelación realizada puede interferir en las características de los espermatozoides; tomar o realizar otros métodos de descenso de temperatura pueden dar cambios en los resultados que se obtuvieron luego de la congelación.

VI. RECOMENDACIONES

- Para continuar con el desarrollo de esta investigación, debemos evaluar la composición de los tratamientos de Tris-yema de huevo en otros porcentajes, para evaluar si existen mejoras en los resultados obtenidos.
- Si queremos comparar entre dilutores naturales y comerciales, debemos investigar otros dilutores comerciales que sean para especies similares a *Cavia porcellus*.
- Debemos tener en cuenta que los espermatozoides epididimarios no tienen una completa maduración, es por ellos que debemos optar por un nuevo método de colecta, por ejemplo, por electro-eyaculación.
- En el momento del descenso de la temperatura debemos realizar diferentes curvas de descenso de la temperatura al momento de la congelación de las pajillas y también durante la descongelación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aragón, S. (2019). *Características macroscópicas, microscópicas, estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de cuy (Cavia porcellus)*. [Tesis de Título Profesional, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias Agrarias. Zootecnia]. <http://hdl.handle.net/20.500.12918/4280>
- Chauca, L. (1997). *Producción de cuyes (Cavia porcellus)* Instituto Nacional de Investigación Agraria La Molina, Perú. Roma: FAO.
- Chavarria, M. (1984). Evaluación bioquímica de la presencia y participación de actina y tubulina en la Reacción acrosomal de los espermatozoides de cobayo. Tesis Lic. En Biología. Universidad 76 Autónoma Metropolitana – Iztapalapa División de Ciencias Biológicas y de la Salud. México.
- Freund, M. (1969). Interrelation ships among the caracteritics of guinea pig semen collected by electro-ejaculation. J. Reprod. Fert (19), pag. 393-403.
- Friend, S., Orci, L., Perrelet, A., & Yanagimachi, R. (1977). Membrane particle changes attending the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa. J Cell Biol, 74, 561-577.
- Fumuso, F.G. Giménez, M.L. Neild, D.M. Giuliano, S.M. Chaves, M.G. Carretero, M.I. (2014). Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar en acrosoma en espermatozoide de llama mediante la tinción Coomassie Blue. Spermova 4(1): 50-53.
- Hafez, E. (1989). Reproducción e Inseminación en animales. Editorial Internacional. Vol. 210. México.
- Huanca Marca, N. F. (2016) Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de alpacas (*Vicugna pacos*) utilizando el integrated semen análisis system – ISAS [Tesis de Título Profesional, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. <http://hdl.handle.net/20.500.12918/1800>
- INIEA. (2007). Instituto Nacional de Investigation y Extensión Agraria-Perú.

- Kajjak, C. (2007). Documento: mejoramiento de cuyes por selección. Trabajo de investigación y Tecnología. CONCYTEC. <http://www-somoscuyperu.com/2012/04/mejoramiento-genetico-de-los-cuyes.html>.
- Loor, A. I. (2015). Caracterización morfológica del espermatozoide del cobayo (*Cavia porcellus*) en el Canton Latacunga. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Técnica de Cotopaxi. Latacunga – Ecuador.
- Meizel, S. (1978). The mammalian sperm acrosome reaction. A biochemical approach. North Holland Press, Amsterdam, 3, 1-64.
- Meizel, S. (1984). The importance of hydrolytic enzymes to an exocytotic event, the mammalian sperm acrosome reaction. Biol Rev (59), 125-157.
- Mellisho, E. (2010). Manual de laboratorio de reproducción animal. Universidad Agraria la Molina. Lima.
- Mise, N. (2014). Evaluación de la crioconservación del semen de cobayo (*Cavia porcellus*). Tesis, Médico Veterinario. Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi. Latacunga – Ecuador.
- Muiño, R. (2008). Evaluación de la motilidad y vitalidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo. Identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis, Grado de Doctor. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Veterinaria del Departamento de Patología Animal.
- Okuyama M, Isogai S, Saga M, Hamada H, Ogawa S. (1990) In vitro fertilization (IVF) and artificial insemination (AI) by cryopreserved spermatozoa in mouse. J Fertile Implant (Tokyo); 7:116–119.
- Pinduisaca, F. (2018). Colecta y evaluación de semen de cuyes (*Cavia porcellus*) extraído por la técnica de electroeyaculación en el centro Experimental Uyumbicho. Tesis, Médico Veterinario. Universidad Central del Ecuador. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica. Quito – Ecuador.
- Quispe Ccasa, H. A., Cayo Colca, I. S., Días García, A. J. (2020) Informe técnico correspondiente al hito 1. Caracterización del Semen de *Cavia porcellus* L.

- Rubio, J., & Quintero, M. (2000). Uso de las pruebas de resistencia osmótica para valorar, 617'627. Obtenido de http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_50.pdf
- Souza, T. (2009). Tesis Magister Scientiae, Universidad Federal de Vicosa. Vicosa Brasil.
- Sumar, J., Novoa, C., & Enrique, F. (1968). Contribución al conocimiento de la vida reproductiva de los roedores peruanos. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Estación del Centro de Investigaciones IVITA.
- Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogi, T., Kasai, K., Ogawa, S. (1990) cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Journal of Reproduction and Fertility* 89: 511-516.
- Tapia, A., & Tello, J. (2016). Evaluación Cualitativa-cuantitativa de espermatozoide de la cola del epidídimo de cuyes (*Cavia porcellus*) criollos y mejorados en dos edades reproductivas. Tesis, Médico Veterinario Zootecnista Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agrarias. Cuenca – Ecuador.
- Unchupaico, I., Alponete, A., & Barrera, S. (2011). Assessing sperm in the guinea pig, *Cavia porcellus*. Charles River laboratories, Horsham.PA. USA. *Reproductive Toxicology*. (32), pag. 164-179.
- Yucra, A. (2013). Características microscópicas del semen y morfometría del espermatozoide del cuy domestico (*Cavia porcellus*) y silvestre (*Cavia tschudii*). Tesis, Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias Agrarias. Cusco – Perú.

VIII. ANEXOS



Figura 1. Crianza de cuyes.



Figura 2. Sacrificio de los cuyes.



Figura 3. Laboratorio donde se realizo el estudio.



Figura 4. Laboratorio de producción de semen.



Figura 5. Termo donde trasladamos lo testículos de cuy.



Figura 6. Testículos de cuy para extraer los epidídimos.



Figura 7. Epidídimos extraídos para realizar cortes y obtener los espermatozoides.

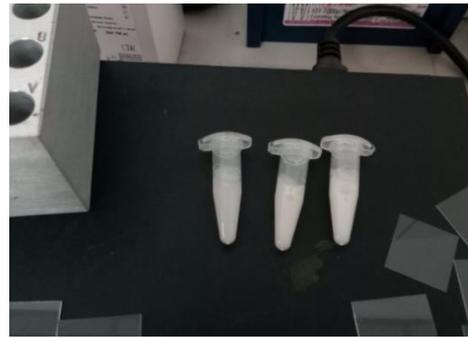


Figura 8. Espermatozoides extraídos listos para sus evaluaciones.



Figura 9. Equipo SCA CASA para determinar motilidad.



Figura 10. Materiales para realizar las pruebas en precalentamiento.

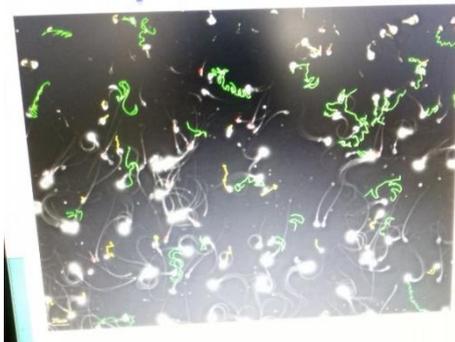


Figura 11. Equipo SCA CASA analizando motilidad.



Figura 12. Realizando prueba de vitalidad a las muestras de semen.



Figura 13. Preparando los dilutores.



Figura 14. Dilutor AndroMed®.

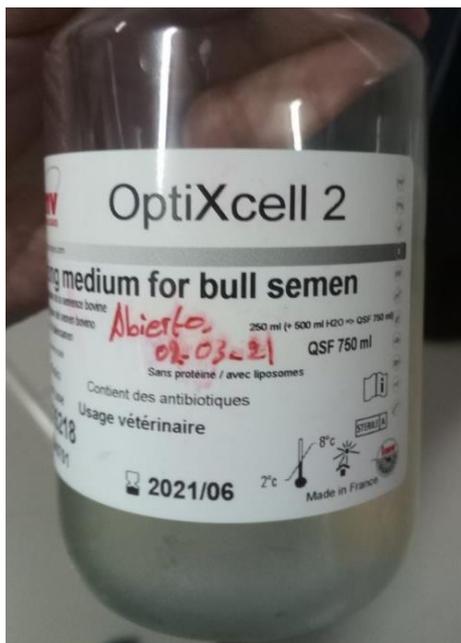


Figura 15. Dilutor OptiXcell®.



Figura 16. Tratamientos listos para su empajillado.



Figura 17. Tratamientos listos para su empajillado.



Figura 18. Pajillas en el desenso de temperatura.



Figura 19. Depositando las pajillas en el tanque de nitrógeno.

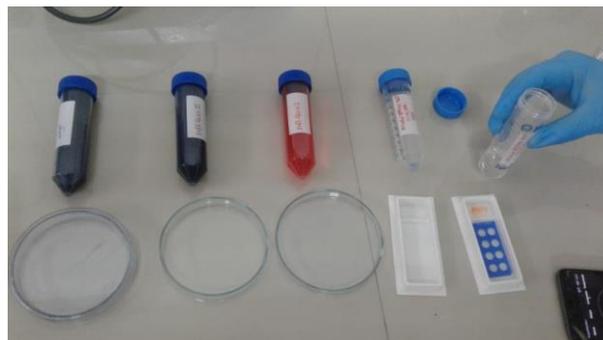


Figura 20. Insumos para realizar la tinción de Fragmentación.



Figura 21. Laminas con las distintas pruebas realizadas.

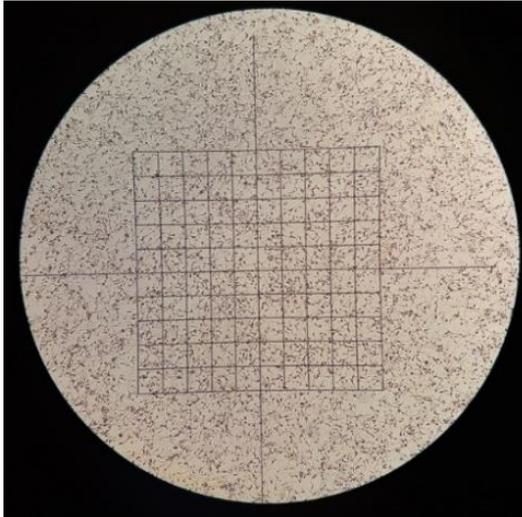


Figura 22. Motilidad en Camara Makler.



Figura 23. Espermatozoides con prueba de vitalidad.

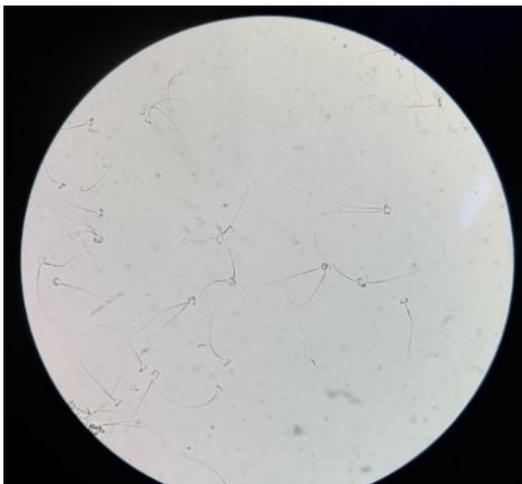


Figura 24. Espermatozoides con prueba HOST.

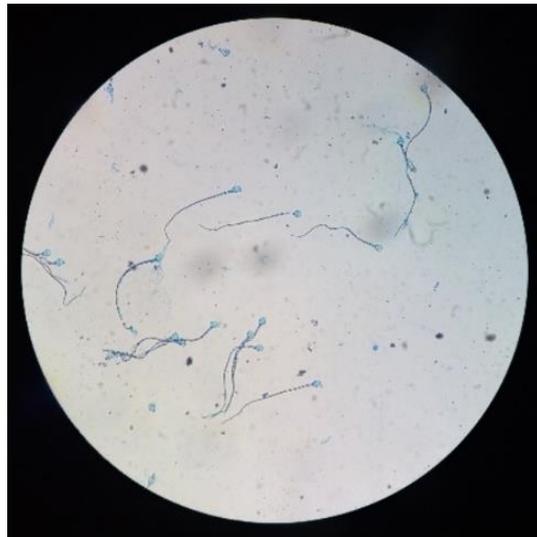


Figura 25. Espermatozoides con prueba Commassie Blue.

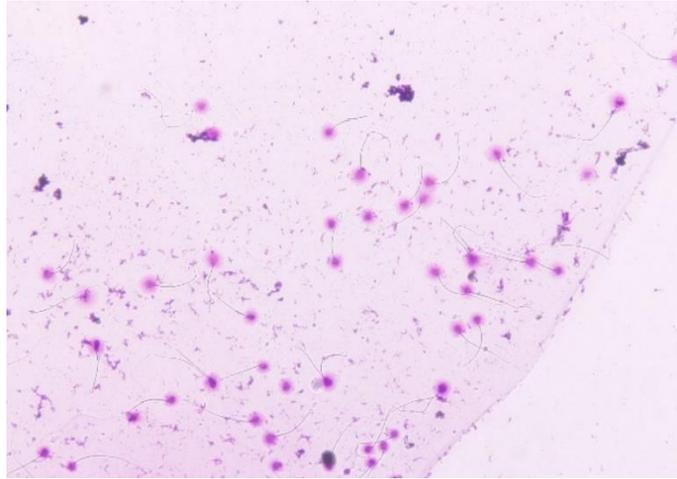


Figura 26. Espermatozoides con prueba Hemacolor®.

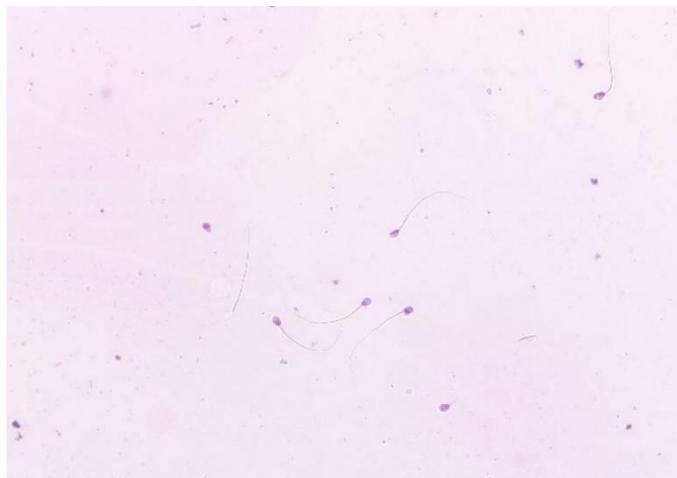


Figura 27. Espermatozoides con prueba de fragmentación Negativa.

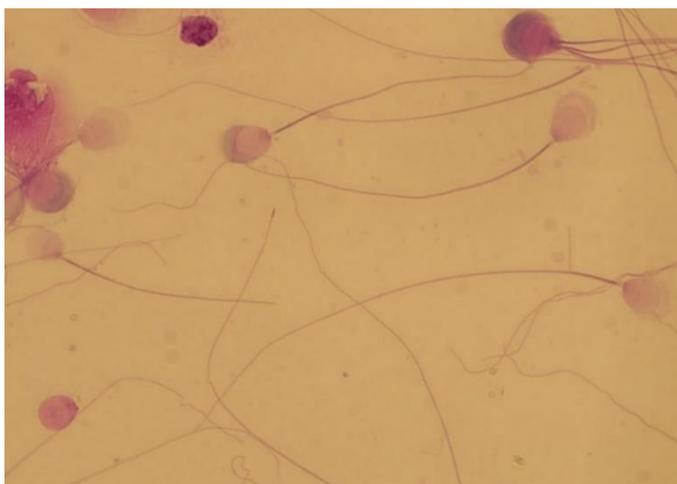


Figura 28. Espermatozoides con prueba Fragmentación Positiva.