

**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**

**INFLUENCIA DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE  
LA CALIDAD ESPERMÁTICA POST -  
DESCONGELAMIENTO EN CUYES (*Cavia porcellus* L.)  
EN LA REGIÓN AMAZONAS**

**Autor:**

**Bach. Yañez Manuel Castañeda Pastor**

**Asesoras:**

**Asesora: M. Sc. Yander Mavila Briceño Mendoza**

**Asesora: Ph. D. Ilse Silvia Cayo Colca**

**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): Costantino Pastor Jaimes Manuel  
DNI N°: 76351228  
Correo electrónico: 7635122881@untrm.edu.pe  
Facultad: Ingeniería Zootécnica, Agonegocios y Biotecnología  
Escuela Profesional: Ingeniería Zootécnica

#### 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

Influencia de la Criopreservación Sobre la calidad espermática Post-descongelamiento en cujes (Cavia porcellus L.) en la región Amarenes

#### 3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Cayo Colca Ilse Silvia (Ph.D)  
DNI, Pasaporte, C.E N°: 09820879  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) <https://orcid.org/0000-0001-6518-0479>

#### Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: Bischo Mendoza Yander Mayra (M.Sc.)  
DNI, Pasaporte, C.E N°: 40471027  
Open Research and Contributor-ORCID (<https://orcid.org/0000-0002-9670-0970>) <https://orcid.org/0000-0001-5535-8091>

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

[https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde\\_ford.html](https://catalogos.concytec.gob.pe/vocabulario/ocde_ford.html)

4.00.00- Ciencias agrícolas, 4.02.00-Ciencia animal, ciencia de productos lácteos, 4.02.02-Ciencia animal, Ciencia de productos lácteos

#### 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, 04 de diciembre de 2023

Firma del autor 1

Firma del Asesor 1

Firma del autor 2

Firma del Asesor 2

## **DEDICATORIA**

A mi familia y amigos, quienes siempre me han apoyado y animado en este largo camino. Sus palabras de aliento y su apoyo incondicional, fueron mi fuerza en cada momento de duda y dificultad. También quiero dedicarlo a mis profesores y tutores, por su guía y conocimientos compartidos, que fueron fundamentales en la realización de este trabajo. Por último, dedico este informe a todas las personas que luchan por la educación y el avance científico, esperando que mi investigación contribuya de alguna manera a mejorar la sociedad.

*Yáñez Manuel Castañeda Pastor*

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme la vida, la salud y la oportunidad de cumplir mis metas. A mis padres y hermanos por su apoyo en los momentos que más los necesite. A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM - A), en especial a la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología (FIZAB).

A mis asesoras Ph.D. Ilse Silvia Cayo Colca y M.Sc. Yander Mavila Briceño Mendoza por su contribución para la elaboración y ejecución de este proyecto de investigación. Al Dr. Hurley Abel Quispe Ccasa por su apoyo en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A Diana Arista Vargas, Biviana Lucero Aquino Gómez y Luciana Contreras Puerta con quienes compartí experiencias y emociones desde el primer ciclo; gracias a sus palabras de aliento logré concluir una etapa en mi formación profesional.

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

**Ph. D. JORGE LUIS MAICELO QUINTANA**

Rector

**Dr. OSCAR ANDRÉS GAMARRA TORRES**

Vicerrector Académico

**Dra. MARÍA NELLY LUJÁN ESPINOZA**

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 Influencia de la Criopreservación sobre la calidad espermática post - descongelamiento en coyes (Cavia porcellus L.) en la región Amazonas; del egresado Yañez Manuel Castañeda Pastor 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, 06 de noviembre de 2023

  
Firma y nombre completo del Asesor

Ilse Silvia Cayo Colca  
09820879



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 Influencia de la criopreservación sobre la calidad espermática post-descongelamiento en wyes (Cana porokus L) en la región Amazonas. del egresado Mañez Manuel Castañeda Pastor 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, 06 de noviembre de 2023



Firma y nombre completo del Asesor

Yander Navila Briceño Mendoza

cel. 941948570

DNI. 70471027

## JURADO EVALUADOR



---

Dr. Nilton Luis Murga Valderrama

**PRESIDENTE**



---

M.Sc. César Augusto Maraví Carmen

**SECRETARIO**



---

Dr. Hugo Frías Torres

**VOCAL**

## CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



**UNTRM**

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

### ANEXO 3-Q

#### CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

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

Influencia de la criopreservación sobre la calidad espermática post-Descuogelamiento en cuyes (*Cavia porcellus* L.) en la región Amazonas

presentada por el estudiante ( )/egresado (x) Yañez Manuel Castañeda Pastor

de la Escuela Profesional de Ingeniería Zootecnista

con correo electrónico institucional 7635122881@untrm.edu.pe

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

- La citada Tesis tiene 09 % 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, 22 de noviembre del 2023.

  
SECRETARIO

  
PRESIDENTE

  
VOCAL

OBSERVACIONES:  
.....  
.....

# ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNTRM

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

ANEXO 3-5

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 28 de noviembre del año 2023, siendo las 12:00 horas, el aspirante: Yañez Manuel Castañeda Pastor, asesorado por Ph.D. Ilse Silvia Cayo Colca y M.Sc. Yander Mayla Briceño Mendoza defiende en sesión pública presencial (  ) / a distancia (  ) la Tesis titulada: Influencia de la Criopreservación sobre la calidad espermática post-descongelamiento de cupes (*Cavia porcellus* L.) en la región Amazonas, 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. Milton Luis Muroa Valderrama

Secretario: Msc. Cesar Augusto Paravi Carmen

Vocal: Dr. Hugo Frias Torres

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 13:00 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

SECRETARIO

PRESIDENTE

VOCAL

OBSERVACIONES:

## ÍNDICE

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS.....	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS.....	vi
JURADO EVALUADOR DE LA TESIS.....	viii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS.....	ix
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	19
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
2.1. Ubicación.....	23
2.2. Crianza de los cuyes.....	23
2.3. Sacrificio y colecta de muestra.....	24
2.4. Refrigeración de semen.....	24
2.5. Criopreservación de semen.....	25
2.6. Evaluaciones microscópicas.....	25
2.7. Análisis estadístico.....	28
III. RESULTADOS.....	29
3.1. Caracterización de la calidad espermática de espermatozoides epididimarios.....	29
3.1.1. Motilidad.....	29
3.1.2. Vitalidad.....	30

3.1.3. Integridad acrosomal.....	38
3.1.4. Funcionalidad de la membrana.....	43
3.1.5 Cromatina.....	51
3.2. Correlación de la morfometría de los espermatozoides epididimarios.....	55
3.2.1. Correlación entre los parámetros morfométricos de los espermatozoides epididimarios refrigerados.....	55
3.2.2 Correlación entre los parámetros morfométricos de los espermatozoides epididimarios criopreservados.....	55
3.2.3. Correlación entre los parámetros morfométricos de los espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados.....	60
3.3. Estandarización de la criopreservación de semen epididimario de cuy.....	63
IV. DISCUSIÓN.....	87
4.1. Caracterización de la calidad espermática de espermatozoides epididimarios.....	87
4.2. Correlación de la morfometría de los espermatozoides epididimarios.....	89
4.3. Estandarización de la criopreservación de semen epididimario de cuy.....	91
V. CONCLUSIONES.....	92
VI. RECOMENDACIONES.....	93
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
ANEXO.....	98

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Medidas de dispersión de las características microscópicas de espermatozoides epididimarios de 12 cuyes en refrigeración. ....	31
<b>Tabla 2.</b> Medidas de dispersión de las características microscópicas de espermatozoides epididimarios de 12 cuyes criopreservados. ....	32
<b>Tabla 3.</b> Correlación de la morfometría de espermatozoides epididimarios refrigerados. ....	56
<b>Tabla 4.</b> Correlación de la morfometría de espermatozoides epididimarios criopreservados. ....	58
<b>Tabla 5.</b> Correlación de la morfometría de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados. ....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación de los Laboratorios de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología.....	23
<b>Figura 2.</b> Diseño preexperimental.....	28
<b>Figura 3.</b> Motilidad de espermatozoides rápidos progresivos según modo de conservación. ....	33
<b>Figura 4.</b> Valores promedios de los medios progresivos según modo de conservación. ....	34
<b>Figura 5.</b> Valores promedios de los no progresivos según modo de conservación. ....	35
<b>Figura 6.</b> Valores promedios de los inmóviles según modo de conservación. ....	36
<b>Figura 7.</b> Valores promedios del número de espermatozoides vivos según modo de conservación. ....	37
<b>Figura 8.</b> Valores promedios de la integridad acrosómica (azul intenso (CB++) según modo de conservación. ....	39
<b>Figura 9.</b> Valores promedios de la integridad acrosómica (azul débil (CB+) según modo de conservación.....	40
<b>Figura 10.</b> Valores promedios de la integridad acrosómica (sin capuchón (CB-) según modo de conservación. ....	41
<b>Figura 11.</b> Tinciones para integridad acrosomal.....	42
<b>Figura 12.</b> Valores promedios de la funcionalidad de la membrana sin reacción (a) según modo de conservación. ....	44
<b>Figura 13.</b> Valores promedios de la funcionalidad de la membrana (débil b) según modo de conservación.....	45
<b>Figura 14.</b> Valores promedios de la funcionalidad de la membrana (Débil c) según modo de conservación.....	46
<b>Figura 15.</b> Valores promedios de la funcionalidad de la membrana (regular d) según modo de conservación. ....	48
<b>Figura 16.</b> Valores promedios de la funcionalidad de la membrana (fuerte (e)) según modo de conservación. ....	49
<b>Figura 17.</b> Funcionalidad de la membrana. ....	50
<b>Figura 18.</b> Cromatina condensada y descondensada. ....	52

<b>Figura 19.</b> Valores promedios de la condensación de cromatina según modo de conservación. ....	53
<b>Figura 20.</b> Valores promedios de la descondensación de cromatina según modo de conservación. ....	54
<b>Figura 21.</b> Matriz de correlación entre el refrigerado sobre la calidad del espermatozoide. ....	57
<b>Figura 22.</b> Matriz de correlación entre el criopreservado sobre la calidad del espermatozoide. ....	59
<b>Figura 23.</b> Matriz de correlación entre el refrigerado y la criopreservación sobre calidad del espermatozoide. ....	62
<b>Figura 24.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 1. ....	63
<b>Figura 25.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el R1 y C1. ....	64
<b>Figura 26.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 2. ....	65
<b>Figura 27.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C2 y R2. ....	66
<b>Figura 28.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 3. ....	67
<b>Figura 29.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C3 y R3. ....	68
<b>Figura 30.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 4. ....	69
<b>Figura 31.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C4 y R4. ....	70
<b>Figura 32.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 5. ....	71
<b>Figura 33.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C5 y R5. ....	72
<b>Figura 34.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 6. ....	73
<b>Figura 35.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C6 y R6. ....	74

<b>Figura 36.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 7. ....	75
<b>Figura 37.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C7 y R7. ....	76
<b>Figura 38.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 8. ....	77
<b>Figura 39.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C8 y R8. ....	78
<b>Figura 40.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 8. ....	79
<b>Figura 41.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el R9. y C9. ....	80
<b>Figura 42.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 10. ....	81
<b>Figura 43.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C10 y R10. ....	82
<b>Figura 44.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 11. ....	83
<b>Figura 45.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C11 y R11. ....	84
<b>Figura 46.</b> Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y el tiempo en la muestra 12. ....	85
<b>Figura 47.</b> Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C12 y R12. ....	86

## RESUMEN

La criopreservación de semen de cuy es una técnica que está en investigación con la finalidad de conservar y almacenar el esperma de cuyes para asegurar su disponibilidad en el futuro, mantener las características genéticas deseables de los animales y evitar la consanguinidad. En este trabajo se evaluó la influencia de la criopreservación sobre la calidad espermática de 12 cuyes post- descongelamiento con diferentes rangos de temperatura y diferentes intervalos de tiempo al momento de la criopreservación. Se evaluó las características microscópicas, post- refrigerado a 4°C por 3 horas en promedio y post- criopreservado a fin identificar el rango de temperatura y tiempo que logre las mejores características espermáticas. Se observó que la motilidad, vitalidad, integridad acrosomal, funcionalidad de la membrana fuerte y cromatina condensada fue de 40%, 67%, 51%, 10% y 85%; luego de la refrigeración; respectivamente, sin embargo, estos valores disminuyeron 3%, 17%, 14%, 3% y 83% luego de la criopreservación, respectivamente. Asimismo, con relación a la morfometría espermática, las características dentro de los espermatozoides refrigerados, criopreservados y entre ambos grupos se encontraron altamente correlacionados. Mas aun, al estandarizar un protocolo de espermatozoides epididimarios de cuy, los mejores valores de características microscópicas se hallaron cuando la temperatura desciende de 4 a -140°C en promedio en 11.5 minutos. Esta investigación demuestra la factibilidad de desarrollar un protocolo plausible para la crioconservación de cuy; sin embargo, se requieren aún mayores investigaciones.

**Palabras claves:** *Cavia porcellus*, epididimarios, refrigeración, criopreservación, correlación, protocolo de estandarización.

## ABSTRACT

The cryopreservation of guinea pig semen is a technique that is under investigation to conserve and store guinea pig sperm to ensure its availability in the future, maintain the desirable genetic characteristics of the animals, and avoid inbreeding. In this work, the influence of cryopreservation on the sperm quality of 12 post-thawed guinea pigs with different temperature ranges and different time intervals at the time of cryopreservation was evaluated. Microscopic characteristics were evaluated, post-refrigerated at 4°C for 3 hours on average and post-cryopreserved to identify the range of temperature and time that achieves the best sperm characteristics. It was observed that motility, vitality, acrosomal integrity, robust membrane functionality, and condensed chromatin were 40%, 67%, 51%, 10%, and 85% after refrigeration, respectively; however, these values decreased 3%, 17%, 14%, 3% and 83% after cryopreservation, respectively. Likewise, concerning sperm morphometry, the characteristics within refrigerated and cryopreserved spermatozoa and between groups were highly correlated. Furthermore, when standardizing a protocol for guinea pig epididymal spermatozoa, the best values for microscopic characteristics were found when the temperature was lowered from 4 to -140°C on average in 11.5 minutes. This research demonstrates the feasibility of developing a plausible protocol for guinea pig cryopreservation; however, further research is still required.

**Keywords:** *Cavia porcellus*, epididymides, refrigeration, cryopreservation, correlation, standardization protocol.

## I. INTRODUCCIÓN

El cuy, conejillo de indias o cobayo (*Cavia porcellus* L.) es una especie doméstica de gran importancia para la producción de carne en el Perú y otros países pertenecientes a Sudamérica (Chauca, 2022). La industria del cuy depende de la selección de animales con caracteres por encima de la producción promedio y rendimientos reproductivos superiores; además, mejorar la genética de estos animales estará condicionada por la utilización de machos no analizados reproductivamente debido a la dificultad para recolectar semen y la predisposición genéticamente natural del animal (Benavides *et al.*, 2020).

En el Perú, el mejoramiento genético de los cuyes se desarrolló en tres etapas: en la primera etapa (1965 - 1970) se evaluaron los ecotipos nativos con el propósito de conocer las características de las especies para identificar sus parámetros productivos y conductuales, la segunda etapa (1970-2005) consistió en la determinación del progreso genético de los parámetros productivos luego del proceso de selección teniendo en consideración características productivas con implicancia monetaria, y la tercera etapa (2005 – 2021) continuó con el cruzamiento de las razas para la formación de líneas paternas y maternas (Chauca, 2022). Actualmente, se vienen realizando investigaciones que evalúan el germoplasma de los diferentes ecotipos a nivel nacional, llegando a reemplazar a los cuyes criollos por líneas específicas para incrementar la producción de los mismos (García, 2020).

El cuy se caracteriza por poseer una amplia adaptabilidad a los cambios climáticos y ecosistemas, y debido a su precocidad, prolificidad y ciclo reproductivo corto, en la región andina es criado como un producto alimenticio (Ferrián, 2017). Además, la reproducción del cuy es poliéstrica; es decir, que se realiza todo el año, de esta manera los cuyes muestran un comportamiento sexual a los 30 días de su nacimiento con un celo promedio de 16 días; es así como la actividad sexual de esos animales inicia a los 50 días de edad (pubertad); y en el caso de los machos, a los 70 días suelen producir espermatozoides con un mayor porcentaje de fertilidad, de tal modo que los machos primerizos de empadre debe iniciarse a los cuatro meses, puesto que es la edad donde desarrollan su madurez sexual y fisiológica, alcanzando pesos superiores a 1 kilogramo (Almeida, 2016). Esta diversidad ha dado lugar a la formación de distintos tipos que pudieran tener parámetros productivos con relación a las características microscópicas del semen.

La criopreservación de semen de cuyes es una técnica que está en investigación con la finalidad de conservar y almacenar el espermatozoide de cuyes con el fin de asegurar su disponibilidad en el futuro. Esta técnica se ha utilizado con éxito en la industria de cría y reproducción animal en otras especies, permitiendo mantener las características genéticas deseables de los cuyes y evitar la consanguinidad (Chauca, 2022). La criopreservación es una técnica que consiste en congelar muestras de semen a muy bajas temperaturas, lo que permite su almacenamiento a largo plazo sin perder sus características reproductivas; por ello, las evaluaciones de las características microscópicas del semen son de vital importancia en este proceso. El análisis seminal mediante microscopía nos permite evaluar parámetros como la concentración espermática, motilidad, vitalidad, morfología, funcionalidad de la membrana espermática, integridad acrosomal y descondensación de cromatina (Argon, 2019).

La concentración espermática es la cantidad de espermatozoides en una cierta cantidad de volumen de semen (mill/ml) y esta depende de varios factores como: la edad, nutrición, enfermedades, temperatura del ambiente y el periodo de extracción, y un análisis que permitirán dar a conocer de adecuados parámetros para un semen de calidad en cuyes (Quispe, 2022). Siguiendo la misma línea, la concentración de espermatozoides post descongelamiento es un factor crucial en la reproducción asistida en cada especie; ya que permite determinar la calidad y el potencial fecundante de las muestras analizadas. Varios estudios han abordado este tema y han encontrado resultados variables en cuanto a la concentración de semen de conejos después del descongelamiento (Vivanco, 2018). Por ejemplo, Smith *et al.* (2010) realizaron un estudio donde descongelaron muestras de semen de conejo y encontraron una concentración media de 300 millones de espermatozoides por mililitro.

Sin embargo, en un estudio posterior realizado por Johnson (2015) encontraron una concentración media de solo 200 millones de espermatozoides por mililitro después de la descongelación. Estos resultados indican que la concentración de semen de conejos puede variar considerablemente entre individuos y que factores como la técnica de criopreservación pueden influir en el éxito del proceso de descongelación. Por otro lado, Quishpe (2021) en su investigación en semen extraído del epidídimo de cuy con 2 tratamientos obtuvo valores de 125 millones/ml y 149 millones/ml de espermatozoides post- descongelamiento.

Otra característica del espermatozoide es el movimiento; que en el cuy es curvilíneo con progresión irregular hacia adelante y que pueden dificultar la clasificación de la motilidad

espermática de los cobayos (Quispe, 2018). Asimismo, Quishpe (2021), en su trabajo de investigación realizó la extracción de espermatozoides del epidídimo en cuyes, el cual reporta datos de motilidad de 15,08% y 14,42% en dos tratamientos siendo menor a los datos reportados por Ferrian (2017) en su estudio en semen de conejos, donde obtuvo una motilidad de 9,36% post- descongelmiento.

Por otro lado, la vitalidad de los espermatozoides se basa en su capacidad de movimiento, la integridad de su membrana y su capacidad de fecundación. Con el sistema CASA (Computer Asisted Sperm Análisis System) podemos obtener este parámetro, pero el método más comúnmente utilizado, es la tinción con eosina/nigrosina que consiste en que, si la membrana plasmática está intacta, el núcleo del espermatozoide no se teñirá, pero si está dañada, permitirá el ingreso de eosina al interior del espermatozoide tiñéndolo de color rojo o rosado (Montenegro, 2022). Los valores de vitalidad son variables según especie: Ponce de León (2014) obtuvo una vitalidad de espermatozoides en ratones de 32% posterior a su descongelmiento, superior a los que obtuvo Quishpe (2021) en su estudio con semen de cuyes donde obtuvo una vitalidad en un rango de 3,4 – 3,6%.

El acrosoma, una estructura que se encuentra en la parte superior de la cabeza del espermatozoide, desempeña un papel crucial en la fecundación luego de la fase de capacitación espermática; debido a la existencia de una estrecha relación entre membrana acrosomal y la zona pelúcida del ovocito, para lograr la penetración del espermatozoide, la posterior recombinación genética de los gametos y formación del embrión (Pérez, 2019). La verdadera reacción acrosomal consiste en la fusión de la membrana acrosomal residual con la membrana plasmática en la zona ecuatorial de la cabeza del espermatozoide, manteniendo la continuidad de las membranas espermáticas. También existe la falsa reacción acrosomal, que se observa en espermatozoides degenerados o muertos (Hito, 2018). Ferrian (2017) y Gema (2022) en sus investigaciones realizadas en espermatozoides de conejos criopreservados y descongelados obtuvieron valores del 23,28% y 23% de acrosomas intactos, respectivamente.

El correcto estado y funcionamiento de la membrana espermática está vinculado a la transferencia de moléculas y a la adaptación metabólica. Para evaluar esto, se utilizan pruebas como la resistencia osmótica (ORT), resistencia a la hiperosmosis (HRT) y el test de endósmosis o hiposmótico (HOST) (Quintero, 2009). El test hiposmótico se basa en la evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática; que permite el paso de líquido al espacio citoplasmático y el choque hipoosmótico provocando un enrollamiento de la cola (Benavides *et al.*, 2020). Por su lado, Gómez (2021) muestra que la

funcionalidad de la membrana plasmática en conejos es de 20 y 10% con dos tratamientos post - descongelado y Ferrián (2017) muestra datos de 40% de funcionalidad de la membrana en conejos post descongelamiento. Sumado a ello, García *et al.* (2018) reportaron un 78% de funcionalidad de la membrana plasmática en semen de ratones descongelado. Estos resultados demuestran la importancia de la integridad de la membrana plasmática en la conservación y viabilidad espermática post descongelamiento.

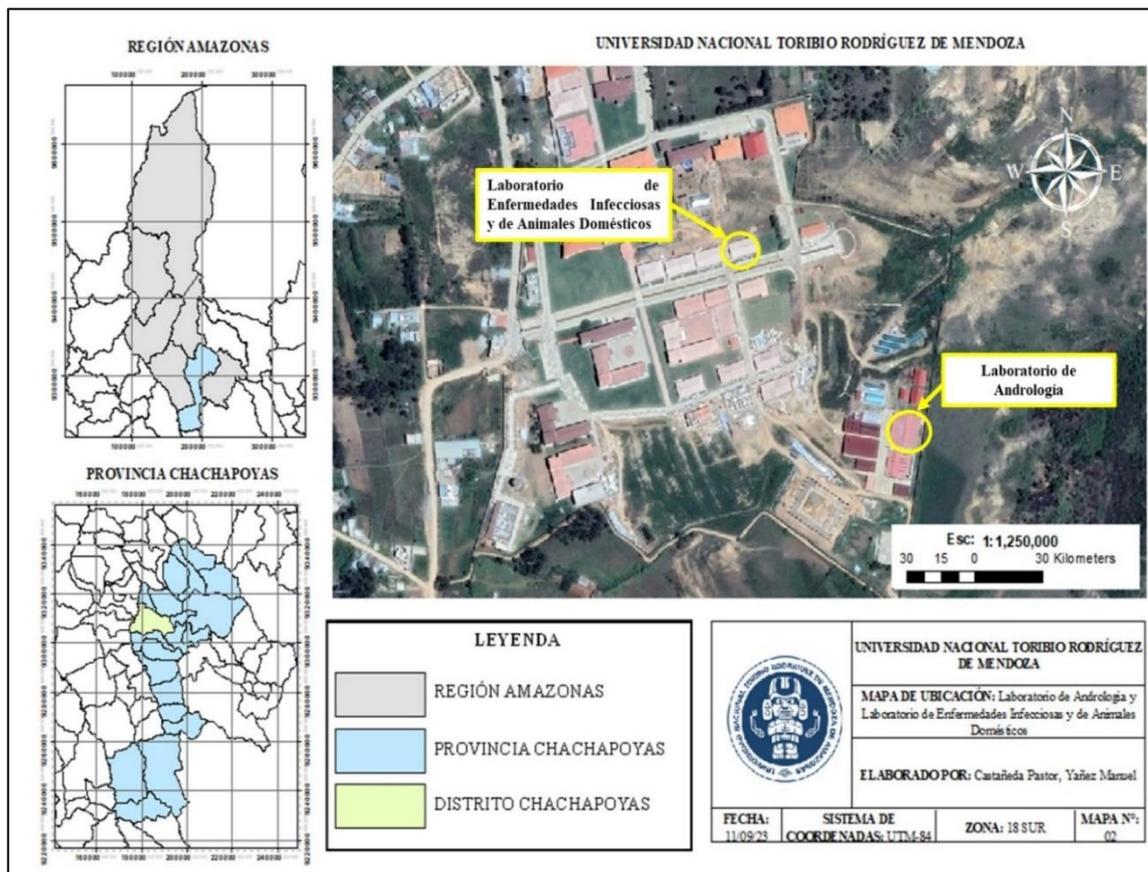
La cromatina de los espermatozoides es la forma altamente condensada del material genético presente en los núcleos de estas células. Esta estructura compacta permite proteger y transmitir de manera eficiente la información genética durante la fertilización. La descondensación y condensación de la cromatina en espermatozoides post descongelamiento de conejos ha sido objeto de diversas investigaciones. Según un estudio realizado por Pérez *et al.* (2018) se encontró que el porcentaje de espermatozoides con cromatina condensada fue del 85% antes del proceso de congelación. Sin embargo, después del descongelamiento, este porcentaje se redujo significativamente a un 45%. Por otro lado, en una investigación llevada a cabo por Gómez *et al.* (2019), se determinó que la descondensación de la cromatina en los espermatozoides de conejos post descongelamiento fue del 25%. Esto significa que solo una cuarta parte de los espermatozoides recuperados después del proceso de congelación presentaban una cromatina descondensada. Estos resultados muestran la importancia de evaluar la condensación y descondensación de la cromatina en los espermatozoides post descongelamiento de conejos, ya que estos cambios podrían afectar la capacidad de los espermatozoides para fertilizar correctamente.

Por ello, es necesario profundizar en este tema para entender mejor los mecanismos involucrados y buscar estrategias que mejoren la calidad de los espermatozoides después del proceso de criopreservación; es así, que se evaluó las características microscópicas en refrigeración y criopreservación de semen del epidídimo. Para ello, este estudio se dividió en tres fases; la primera consistió en caracterizar la calidad espermática del semen refrigerado de cuy, la segunda en correlacionar los descensos de temperatura durante la congelación con la calidad espermática post - descongelamiento en cuyes y la tercera en identificar los estándares óptimos de congelación de semen de cuy que permitan la mayor supervivencia espermática.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Ubicación

Los análisis de motilidad, vitalidad, integridad acrosomal y funcionalidad de la membrana se realizaron en el Laboratorio de Andrología Animal y el análisis de morfología se llevó a cabo en el Laboratorio de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Animales Domésticos de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM), ubicada en el distrito de Chachapoyas, provincia de Chachapoyas, región Amazonas.



**Figura 1.** Ubicación de los Laboratorios de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología.

### 2.2. Crianza de los cuyes

Los cuyes de la raza Perú fueron adquiridos de una granja comercial ubicado en el distrito de Jazán, provincia de Bongará, región Amazonas, trasladados e instalados en el galpón de cuyes de la Estación Experimental Chachapoyas de la UNTRM, alimentados con forraje verde (alfalfa) y con suministro de agua *ad libitum*, para ser sacrificados 2 días después de su llegada.

### **2.3. Sacrificio y colecta de muestras**

Los cuyes fueron sacrificados en la Estación Experimental Chachapoyas de la UNTRM, teniendo en cuenta las normas establecidas de bienestar animal, con la finalidad de que el animal no se estrese. Para ello, primero, se aturdió manualmente al animal para proceder al desangrado, posteriormente se realizaron dos cortes en el escroto para la extracción de los testículos en posición decúbito supino para colocarlos inmediatamente en un tubo con tapa de 15ml (Eppendorf, Alemania) y fueron transportados en un termo con agua temperada a 37°C hasta el Laboratorio de Andrología Animal para su evaluación (Mise, 2020).

Los testículos fueron colocados en una placa Petri sobre la platina térmica a 37°C (Minitube, Alemania) y se retiró las adherencias lipídicas y cualquier partícula ajena a la muestra. Luego se agregó 0.4ml de medio base 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) atemperado a 37°C, en seguida, se seccionó la porción caudal del epidídimo realizando ligeros cortes (slicing) con hoja de bisturí para accionar la salida de los espermatozoides y finalmente, se agregó 0.6ml más de medio tris base para realizar el lavado. Finalmente, se extrajo el lavado con una micropipeta de 1ml (Eppendorf, Alemania) y se depositó en un tubo con tapa de 1.5 ml (minitube, Alemania) para luego ser llevados inmediatamente a 37°C en Baño María (Gemmy, Alemania) (Quispe, 2022).

### **2.4. Refrigeración de semen**

Se preparó el dilutor OptiXcell® según las recomendaciones del fabricante, se agregó yema de huevo al 25%, y se mantuvo en refrigeración (4°C) hasta su uso. Para la dilución del semen, primero se obtuvo la cantidad exacta por el cálculo de la muestra según el anexo 26. La muestra se colocó en un tubo Falcon de 15ml y se llevó a incubación 37°C (Baño María, Gemmy, Alemania). Luego, se agregó el dilutor a la muestra del semen lentamente por las paredes del tubo de 15ml (Eppendorf, Alemania) con la finalidad de evitar el golpe térmico. Seguidamente, se llevó a refrigeración por 3 horas aproximadamente, registrando rangos de temperatura (T°) cada 30 min, hasta su descenso de 37°C a 4°C. Finalmente, transcurrido las 3 horas de refrigeración, se realizó las pruebas microscópicas (motilidad, vitalidad, HOST, integridad acrosomal, morfología y cromatina) a 37°C.

## **2.5. Criopreservación de semen**

La criopreservación se realizó por el método de congelación lenta en nitrógeno líquido. Para ello, las muestras se equilibraron por 6 horas más en refrigeración con la finalidad de que el dilutor penetre en el citoplasma de las células espermáticas. Después las muestras de semen diluido se congelaron por criopreservación lenta en pajillas de 0.25 o 0.5 ml. Para ello, primero, se depositó las pajillas en una gradilla dentro de una caja de tecnopor conteniendo nitrógeno líquido en donde se realizó la congelación, con una termocupla (Tipo K, Omega, Estados Unidos), se registró la caída de temperatura cada 30 segundos durante 12 minutos hasta llegar a  $-140^{\circ}\text{C}$ . Segundo, las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), para ser depositadas en goblets ya rotulados y ser transferidas de inmediato a las canastillas del tanque criogénico ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) donde se las dejó por 3 días hasta su evaluación. Para el descongelamiento se sumergieron las pajillas de semen directamente en agua temperada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos. Seguidamente, se cortó un extremo de la pajilla y se volvió a realizar todos los procedimientos de análisis microscópica (motilidad, vitalidad, HOST, integridad del acrosoma, cromatina y morfología) (Quispe, 2022).

## **2.6. Evaluaciones microscópicas**

Las evaluaciones microscópicas se realizaron en las muestras luego de la refrigeración y congelación con nitrógeno líquido siguiendo los procedimientos descritos a continuación:

### **a. Motilidad**

En una lámina porta objetos temperada en una platina térmica a  $37^{\circ}\text{C}$  se depositó  $5\ \mu\text{l}$  de muestra y se cubrió con una lámina cubre objetos. La evaluación de la motilidad se realizó con el sistema CASA acoplado a un microscopio de contraste de fases con un lente de 10X (CX31, OLYMPUS, JAPON). Se determinó los porcentajes de motilidad progresiva (MP) Motilidad no Progresiva (MNP) y Motilidad Total (MT) (Aragón, 2019).

### **b. Vitalidad**

Para determinar vitalidad se utilizó las tinciones nigrosina-eosina en proporción (1:1). En la platina térmica de mesa (Minitube, Alemania) temperada a  $37^{\circ}\text{C}$ . Se colocó una lámina portaobjetos y sobre ella  $5\ \mu\text{l}$  de semen (a una concentración de  $50 \times 10^6/\text{ml}$ ),  $5\ \mu\text{l}$  de reactivo A (eosina) y  $5\ \mu\text{l}$  de reactivo B (nigrosina), se homogenizó y se realizó

un frotis con el borde de otra lamina para luego dejarlo secar. Una vez seco los frotis, se procedió a la evaluación en el microscopio contabilizando 200 células (espermatozoides) con el objetivo 40x. Los espermatozoides rojos se clasificaron como muertos y los claros brillantes como vivos (Aragón, 2019) (Anexo 14 y13).

### **c. Funcionalidad de la membrana espermática (HOST)**

Para la evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática empleamos el test hipoosmótico o HOST (hipoosmotic swelling test) a una concentración de 50 mOsm/l (Anexo 20,21,22,23 y 24) (Aragón, 2019) preparado con 0.0245 g/ml de citrato de sodio y 0.9 g/ml de d-fructuosa. Para ello, se incubó a 37°C por 5 min en baño María, 100 µl la solución hipoosmótica, conteniendo 25 µl de la muestra (semen) en un tubo eppendorf de 2ml. Pasado este tiempo, se agregó 31 µl de solución formulada (1ml de solución hipoosmótica más 3 µl de formaldehído al 40%) con la finalidad de detener la reacción del test hipoosmótico.

Para su correcta evaluación, se aplicó 5 µl de la mezcla ya preparada en una lámina porta objetos, y se cubrió con una lámina cubreobjetos. Luego, la lámina se trasladó al microscopio para contabilizar no menos de 200 células (espermatozoides) con el objetivo de 40x. La clasificación como reacción de endosmosis (HOST +) se dio al observar algún grado de enrollamiento fuerte, torcida o en forma helicoidal de la cola y la clasificación de endosmosis (HOST-) se dio a aquellas células espermáticas dañadas y flagelo sin reacción o recto (Quispe, 2022).

### **d. Integridad acrosomal**

Para el análisis de integridad acrosomal se utilizó la tinción Coomassie Blue preparada según Fumus *et al.* (2014) con Brilliant blue para coomassie G250 (Merck, Alemania) (0.11g), metanol (25ml), ácido acético glacial (5ml), agua destilada (20ml) (Anexo16, 17 y 18). La solución se aplicó a 5 µl de la muestra en una lámina portaobjetos, se realizó un frotis con el borde de otra lámina portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, se procedió a fijar horizontalmente con formaldehído al 4% en PBS (10 ml de formaldehído al 10% y 90 ml de PBS) por 15 minutos. Una vez fijados se procedió a realizar el lavado con PBS haciendo 5 inmersiones de 1 min cada una y se sumergió horizontalmente en la placa petri conteniendo la tinción de Coomassie Blue (0.22%) por 5 minutos. Seguidamente, la placa se lavó en agua destilada con 5 inmersiones de 1 segundo cada una, luego del cual se dejó secar. Finalmente, se llevó al microscopio para realizar el conteo con el objetivo 40x no menos de 250 células

espermáticas. La clasificación se realizó en 3 categorías; acrosoma íntegro (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 -) (Quispe, 2022).

#### **e. Descondensación de la cromatina**

La evaluación de la cromatina consistió en colocar 5 µl de la muestra en una lámina portaobjetos y realizar un frotis para dejarlo secar a temperatura ambiente; una vez seco son sumergidos en placas petri con etanol al 96° en forma horizontal, por 2 minutos. Luego, se sumergieron en solución de azul de toluidina (1ml de azul de toluidina en 9 ml de buffer pH4) por 5 minutos más, y se lavaron con agua destilada, dejándose secar en un ambiente oscuro y seco. Por último, se llevó al microscopio con el objetivo 40x y se contabilizó 300 células espermáticas (Anexo 25 y 26).

#### **f. Morfología**

Para morfología se realizaron frotis en láminas portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente; para esta evaluación se utilizó el kit para diferenciación celular Hemacolor®, el cual está conformado de 4 reactivos: solución I (fijador alcohol), solución II (eosina), solución III (azul de metileno) y la solución IV (tampón). Una vez secada las muestras en las láminas se realizaron cinco inmersiones cada segundo en el reactivo I, tres inmersiones de 1 segundo en el reactivo II, seis inmersiones de 1 segundo en el reactivo III y dos inmersiones de 10 segundos cada una en el reactivo IV, de acuerdo a Kim *et al.* (2001). Luego de dejar escurrir y secar a temperatura ambiente, las placas fueron trasladadas al laboratorio de de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias de Animales Domésticos. El análisis se realizó usando aceite de inmersión y con objetivo 100x, unida a una cámara y el software CellSens de OLYMPUS; se fijaron los campos, tomaron capturas con el software y se clasifican morfológicamente no menos de 300 células. Las variables medidas fueron largo del núcleo (L), ancho del núcleo (W), área (A) y perímetro (P) del núcleo, área de acrosoma, perímetro de acrosoma, largo de cabeza, largo de pieza intermedia, ancho de pieza intermedia, y largo de cola (Anexo 19).

## 2.7. Análisis estadístico

Se trabajo siguiendo un diseño preexperimental que solo considero una sola medición.



**Figura 2.** Diseño preexperimental.

- Grupo experimental: Son las muestras de semen obtenidos de 12 cuyes
- Estímulo X: OptiXcell® con yema de huevo al 25%.
- A: Evaluaciones microscópicas post- refrigeración y post- criopreservación.

Para el objetivo específico 1, donde se observaron los dos métodos de conservación (refrigerado y crioconservado) en espermatozoides de 12 cuyes (24 observaciones); el análisis se hizo mediante estadística descriptiva definidas mediante promedio, desviación estándar (DS), varianza (Var), coeficiente de variación (CV), valores máximos (máx.) y valores mínimos (min.) con ayuda del software SPSS v.25 (Corp ,2020), igualmente se obtuvieron las frecuencias en las variables de estudio, donde se mostraron en porcentajes según parámetros a evaluar.

Para el objetivo específico 2, el análisis de correlación se realizó de las múltiples variables evaluadas en 300 espermatozoides obtenidos de 12 muestras de cuyes, estos fueron analizados en su normalidad mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov Smirnov con un margen de error del 0.05, según los resultados de normalidad se realizó la prueba de correlación Spearman con un grado de confianza de 95% mediante el software R en Rstudio, (RStudio Team, 2020) y representados en una matriz de correlaciones.

Para el análisis del objetivo específico 3, se usó el software Minitab, (Minitab, 2020) y Rstudio; se evaluaron las conductas de la velocidad de descenso de temperatura ante la calidad espermática mediante regresión lineal y no lineal. Asimismo, la predicción del movimiento de datos fue expresada en un ANOVA con un grado de confianza del 95% entre la relación de variables.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Caracterización de la calidad espermática de espermatozoides epididimarios

##### 3.1.1. Motilidad

###### a. Rápidos progresivos

Las características de espermatozoides “rápidos progresivos” (motilidad), presenta un promedio y una desviación estándar (DS)  $120 \pm 20,32$ ; (Tabla 1). Así mismo, la Figura 3, muestra los valores promedios de este parámetro; observamos que los espermatozoides refrigerados obtuvieron valores de motilidad superior a los espermatozoides criopreservados con nitrógeno líquido. Se observa, además, que los valores más altos los presentaron los cuyes 7 (46%) y 10 (52%). De igual forma, los estadísticos de las características de la motilidad de espermatozoides epididimarios criopreservados de cuy (Tabla 2), se encontró un promedio y una DS de  $9 \pm 5,68$ ; evidenciándose que la velocidad rápida progresiva se ve afectada por la criopreservación, del cual, los cuyes, 8 al 12 muestran mayores porcentajes (4,3%; 4%; 4,7%, 5,3% y 5,3%; respectivamente) (Figura 3).

###### b. Medios progresivos

Las características de espermatozoides “medios progresivos” (motilidad), presenta un promedio y una DS de  $95 \pm 24,38$  (Tabla 1). Se puede observar en la Figura 4 que los cuyes 1, 9 y 12, poseen los valores más altos para esta evaluación (42,6%, 48,3% y 37,7%, respectivamente). Más aún, en la Tabla 2 se aprecia motilidad media progresiva de espermatozoides epididimarios criopreservados de cuy, con un promedio y una DS de  $20 \pm 53,82$ ; de los cuales, los cuyes 2, 5, 7 y 11 muestran mayores porcentajes (7%, 9%, 17% y 8,3% respectivamente) (Figura 4).

###### c. No progresivos

La característica de motilidad no progresiva de espermatozoides epididimarios refrigerados de cuy se observa en la Tabla 1, un promedio y una DS de  $44 \pm 15,04$ ; de los cuales, los cuyes 4 y 6 tienen los porcentajes más altos (24% y 20%, respectivamente) para espermatozoides epididimarios refrigerados (Figura 5). La Tabla 2 muestran la motilidad no progresiva de espermatozoides epididimarios criopreservados, encontrándose un promedio y una DS de  $67 \pm 24,87$ ; evidenciándose en la Figura 5 que el número de espermatozoides no progresivos

se incrementaron por efecto de la criopreservación, siendo los cuyes 6, 8 y 10, los que arrojaron los valores más altos (28%, 43,7% y 26,7%; respectivamente).

#### **d. Espermatozoides inmóviles**

La característica de motilidad “inmóvil” (Tabla 1), de espermatozoides epididimarios refrigerados, reporta un promedio y una DS de  $41 \pm 21,76$ ; de los cuales, los cuyes 2, 5 y 8 poseen los mayores valores (25%, 23% y 20%, respectivamente). Con relación a la motilidad “inmóviles” de espermatozoides epididimarios criopreservados (Tabla 2), se encontró un promedio y una DS de  $202 \pm 26,97$ ; de los cuales, los cuyes 4, 7 y 12, arrojaron los porcentajes más altos (75%, 76% y 77%, respectivamente) (Figura 6).

#### **3.1.2. Vitalidad**

Para el parámetro de vitalidad (Tabla1) de espermatozoides epididimarios refrigerados se muestra un promedio y una DS de  $134 \pm 14,16$ , se puede observar en los cuyes 1 y 2, los que mostraron los porcentajes más altos (78,5% y 77%; respectivamente). con relación a la vitalidad espermatozoides vivos epididimarios criopreservados (Tabla 2), se encontró un promedio y una DS de  $35 \pm 16,79$ ; de los cuales, los cuyes 6, 9, 11 y 12 obtienen mayores porcentajes de vitalidad para criopreservación (34%, 20%, 28% y 25%, respectivamente) (Figura 7).

**Tabla 1.**

*Medidas de dispersión de las características microscópicas de espermatozoides epididimarios de 12 cuyes en refrigeración.*

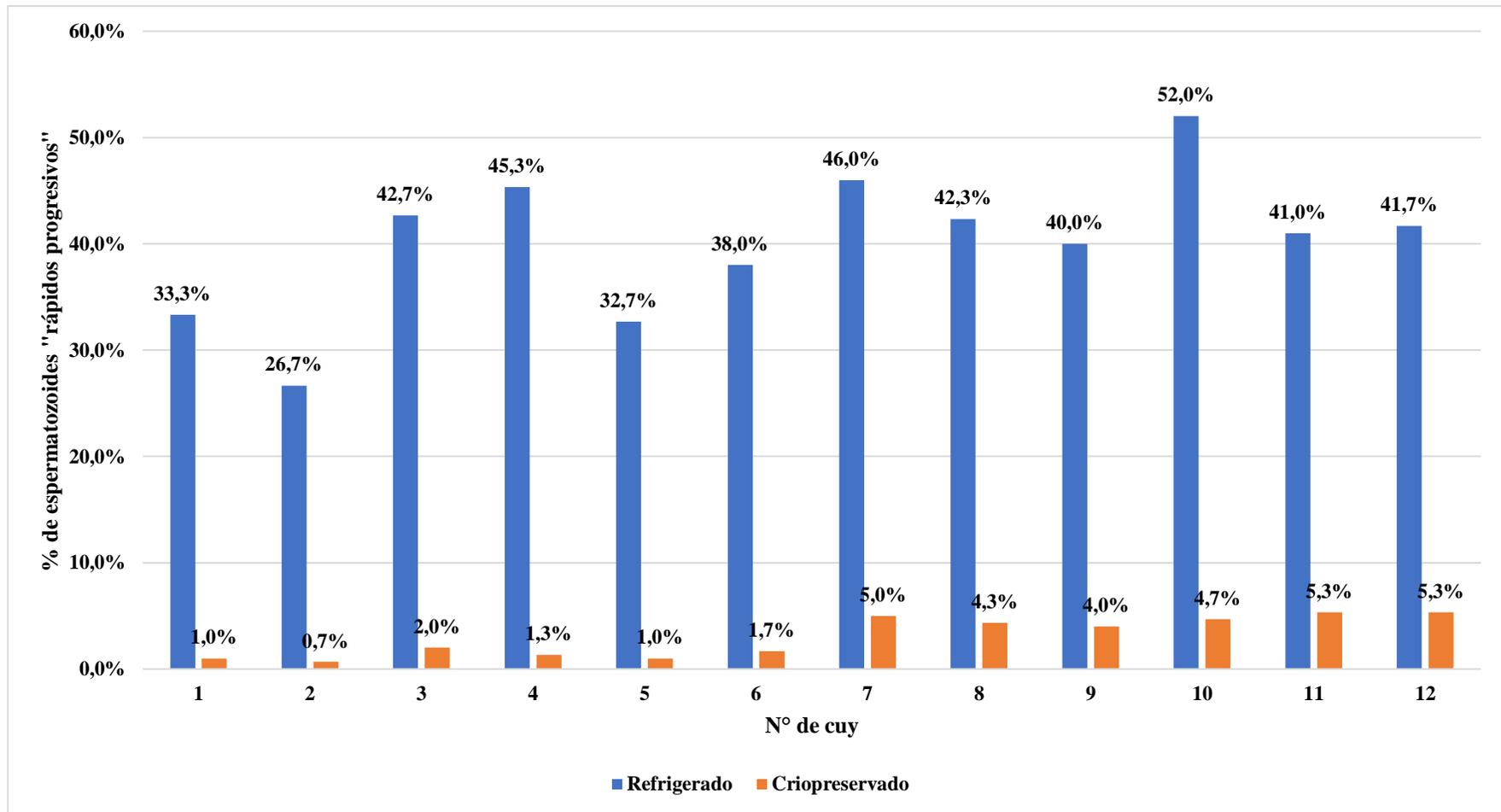
Refrigerado																
Parámetros	Motilidad (N° 300)				Vitalidad (N°200)		Integridad acrosomal (N°250)			Funcionalidad de la membrana (N°200)					Cromatina (N° 300)	
	Rápido	Medio	No progre.	inmóvil	Vivos	Muertos	CB++	CB+	CB-	a	b	c	d	e	Condensada	Descondensada
Promedio	120 (40%)	95 (32%)	44 (15%)	41 (14%)	134,25 (67%)	65,75 (33%)	126 (50%)	76 (30%)	47 (19%)	69 (35%)	40 (20%)	38 (19%)	33 (17%)	20 (10%)	256 (85%)	44 (15%)
DS	20,32	24,38	15,04	21,76	14,16	14,16	25,44	25,93	16,79	13,17	11,48	8,89	8,83	8,27	16,54	16,54
Var	412,81	594,27	226,08	473,45	200,39	200,39	647,09	672,45	281,88	173,48	131,90	78,99	78,02	68,33	273,64	273,64
CV	0,17	0,26	0,34	0,53	0,11	0,22	0,20	0,34	0,36	0,19	0,29	0,23	0,27	0,41	0,06	0,38
máx.	156	145	72	75	157	91	161	127	77	85,00	57,00	56,00	54,00	35,00	279,00	86,00
Mín.	80	62	20	5	109	43	69	51	22	49,00	24,00	26,00	20,00	13,00	214,00	21,00

Para integridad acrosomal (CB++, CB+ y CB- que representa azul intenso, azul débil y sin capuchón; respectivamente), funcionalidad de membrana: sin reacción (a), reacción débil (b), reacción débil (c), reacción regular (d) y reacción fuerte (e). Finalmente, la cromatina condensada y descondensada; para ello, se identificaron las medidas de dispersión para cada variable siendo así: promedio, desviación estándar (DS), varianza (Var), coeficiente de variación (CV), valores máximos (máx.) y valores mínimos (mín.). N°; representa el número de espermatozoides evaluados por cada variable por cuy.

**Tabla 2.***Medidas de dispersión de las características microscópicas de espermatozoides epididimarios de 12 cuyes criopreservados.*

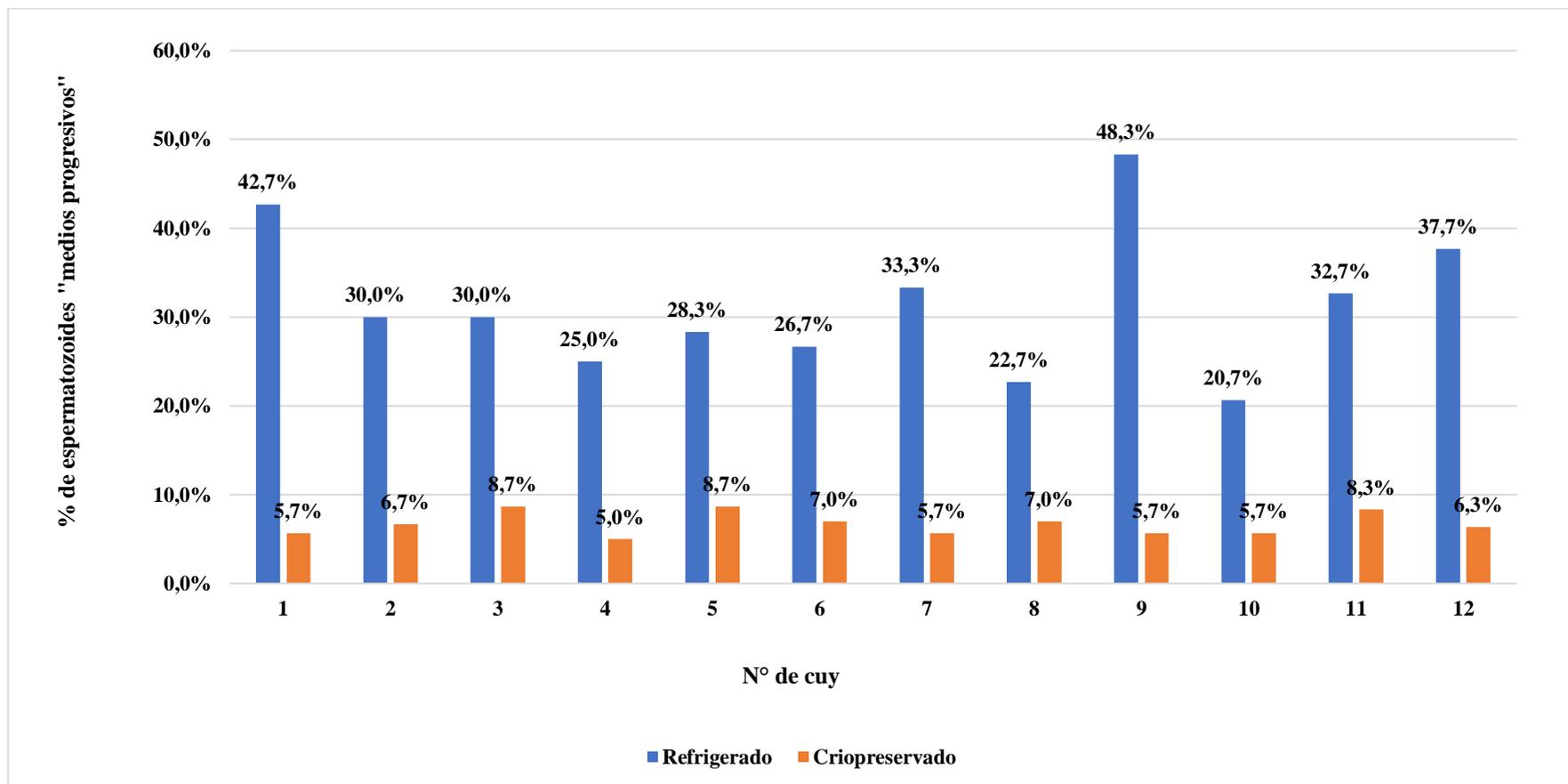
Criopreservado																
Parámetros	Motilidad (N° 300)				Vitalidad (N°200)		Integridad acrosomal (N°250)			Funcionalidad de la membrana (N°200)					Cromatina (N° 300)	
	Rápido	Medio	No prog.	inmóvil	Vivos	Muertos	CB++	CB+	CB-	a	b	c	d	e	Condensada	Descondensada
Promedio	9 (3%)	20 (7%)	67 (22%)	202 (67%)	34,5 (17%)	165,5 (83%)	34,33 (14%)	114,08 (46%)	100,75 (40%)	129 (65%)	26 (13%)	24 (12%)	16 (8%)	6 (3%)	248 (83%)	52 (17%)
DS	5,68	3,82	24,87	26,97	16,79	16,79	15,04	25,83	26,83	47,34	17,81	18,80	10,00	3,88	18,38	18,38
Var	32,27	14,63	618,63	727,36	281,91	281,91	226,24	667,36	719,66	2240,63	317,09	353,36	99,91	15,06	337,90	337,90
CV	0,63	0,19	0,37	0,13	0,49	0,10	0,44	0,23	0,27	0,37	0,68	0,80	0,64	0,67	0,07	0,35
máx.	16,00	26,00	131,00	231,00	68,00	189,00	59,00	139,00	170,00	186,00	50,00	48,00	30,00	16,00	274,00	84,00
min.	2,00	15,00	34,00	214,00	11,00	132,00	7,00	60,00	75,00	74,00	4,00	3,00	4,00	1,00	216,00	26,00

Para integridad acrosomal (CB++, CB+ y CB- que representa azul intenso, azul débil y sin capuchón, respectivamente); funcionalidad de membrana: sin reacción (a), reacción débil (b), reacción débil (c), reacción regular (d) y reacción fuerte (e). Finalmente, la cromatina condensada y descondensada; para ello, se identificaron las medidas de dispersión para cada variable siendo así: promedio, desviación estándar (DS), varianza (Var), coeficiente de variación (CV), valores máximos (máx.) y valores mínimos (min.). N°; representa el número de espermatozoides evaluados por cada variable por cuy.



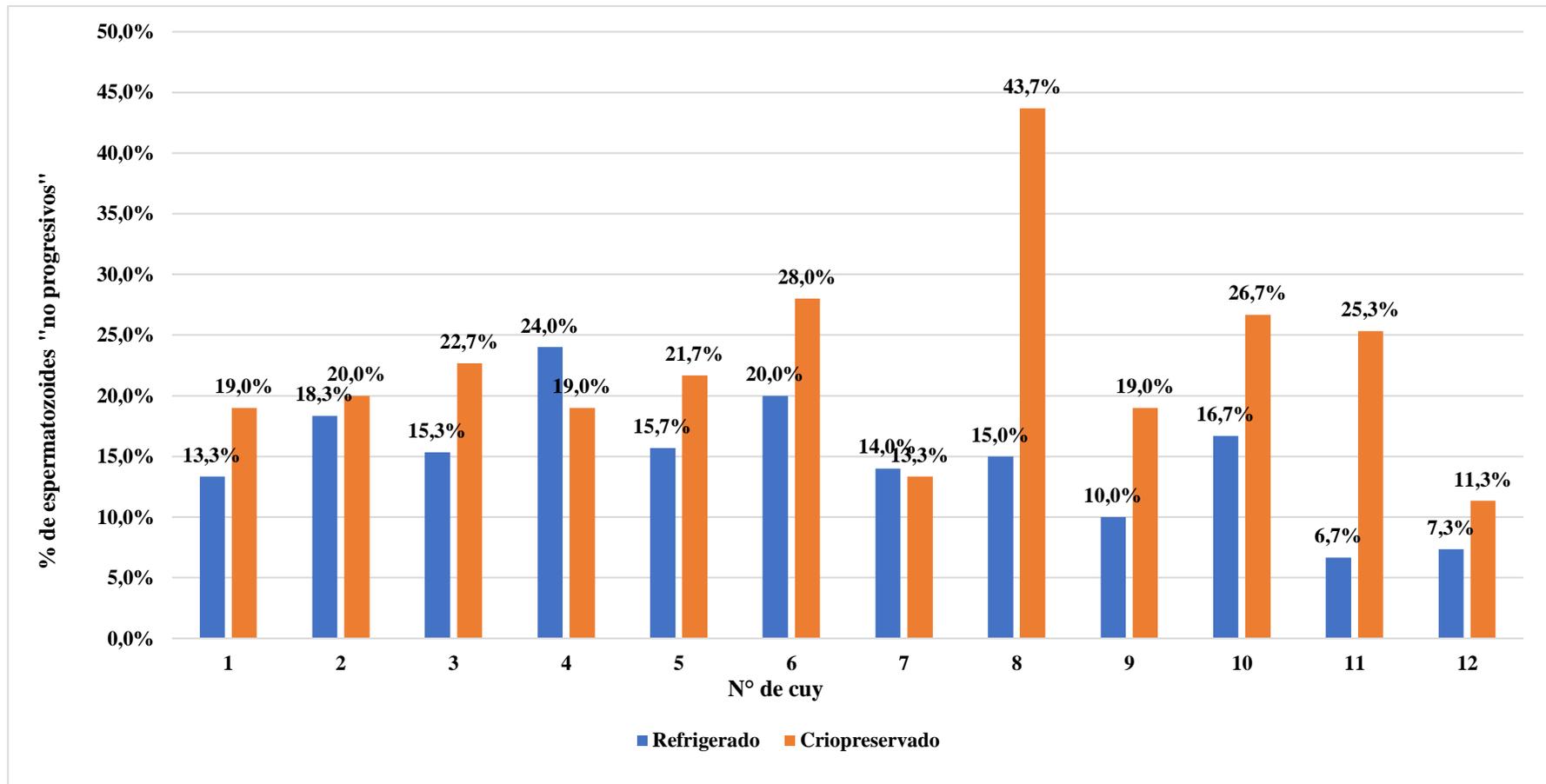
**Figura 3.** Motilidad de espermatozoides rápidos progresivos según modo de conservación.

Espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados para la característica rápidos progresivos representados en porcentaje, de un total de 300 espermatozoides por cuy, utilizando el software CASA con un objetivo 20x.



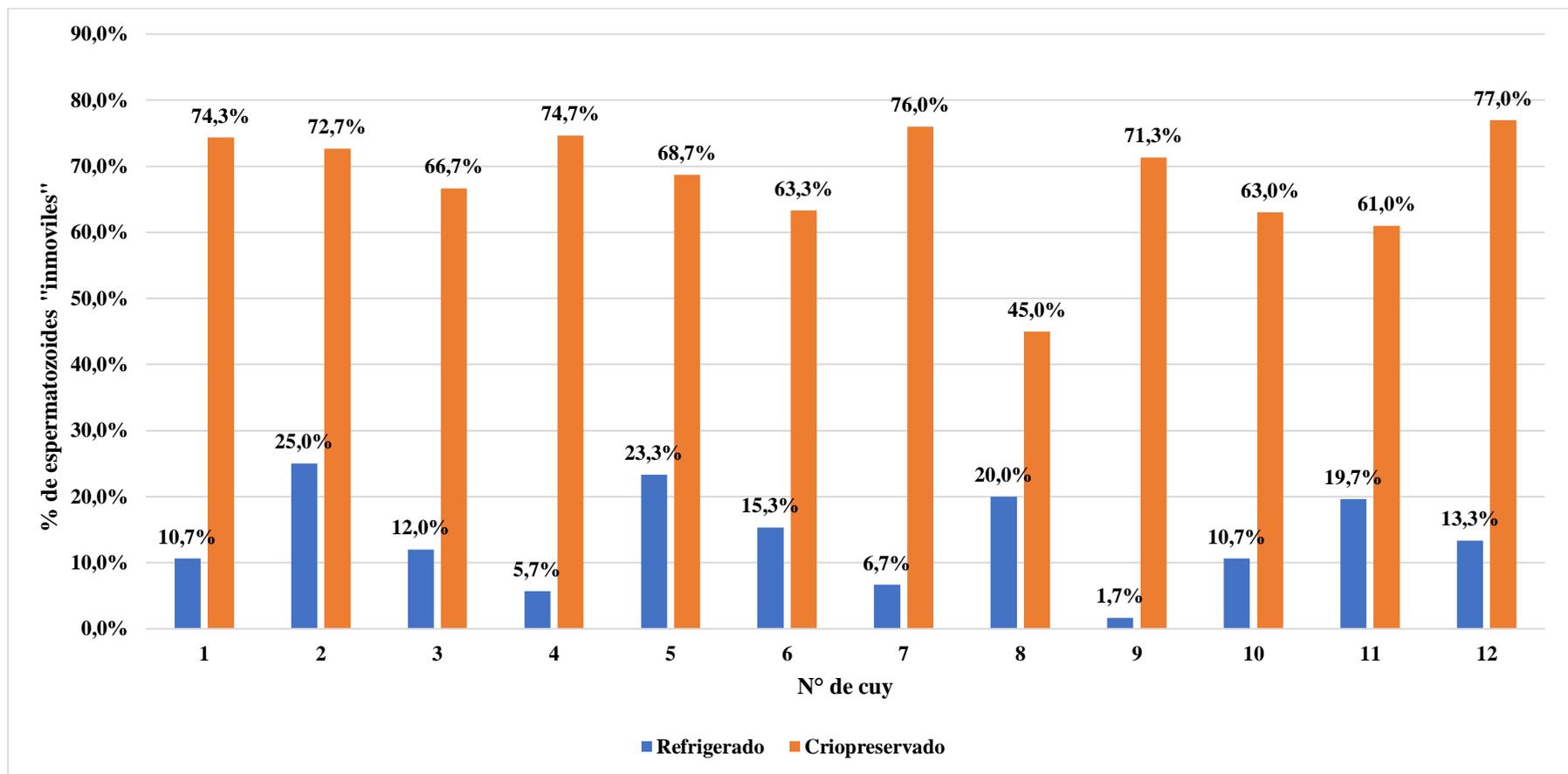
**Figura 4.** Valores promedios de los medios progresivos según modo de conservación.

Espermatozoides epididimarios refrigerado y criopreservado para la característica medios progresivos representados en porcentaje, de un total de 300 espermatozoides por cuy, utilizando el software CASA con un objetivo 20x.



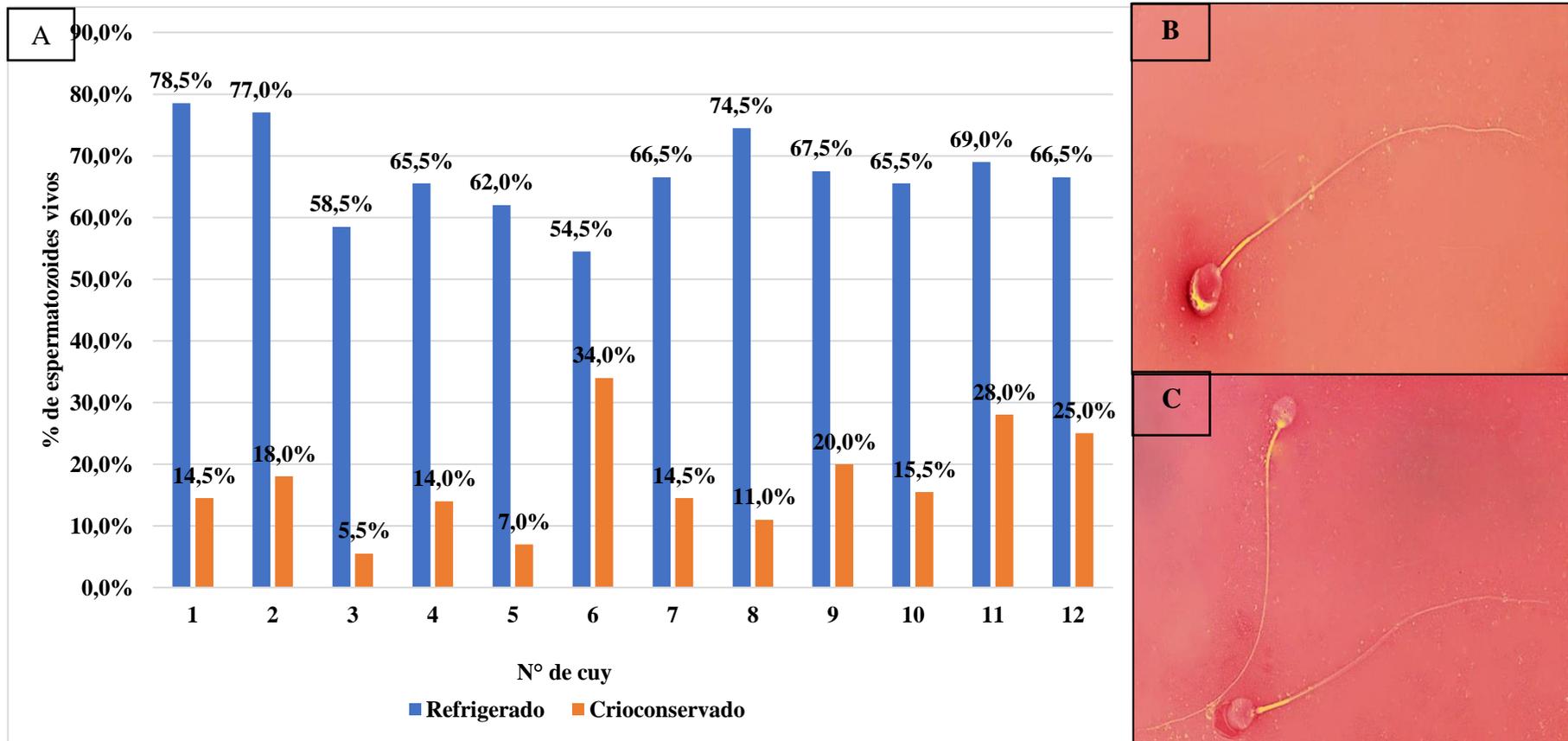
**Figura 5.** Valores promedios de los no progresivos según modo de conservación.

Espermatozoides epididimarios refrigerado y criopreservado para la característica de no progresivos representados en porcentaje, de un total de 300 espermatozoides por cuy, utilizando el software CASA con un objetivo 20x.



**Figura 6.** Valores promedios de los inmóviles según modo de conservación.

Espermatozoides epididimarios refrigerado y criopreservado para la característica de no progresivos representados en porcentaje, de un total de 300 espermatozoides por cuy, utilizando el software CASA con un objetivo 20x.



**Figura 7.** Valores promedios del número de espermatozoides vivos según modo de conservación.

Valores promedios en porcentaje de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados vivos (A), vista en 40x de espermatozoide vivo (B) y vista en 40x espermatozoides muertos (C).

### **3.1.3. Integridad acrosomal**

#### **a. Acrosoma azul intenso (B++)**

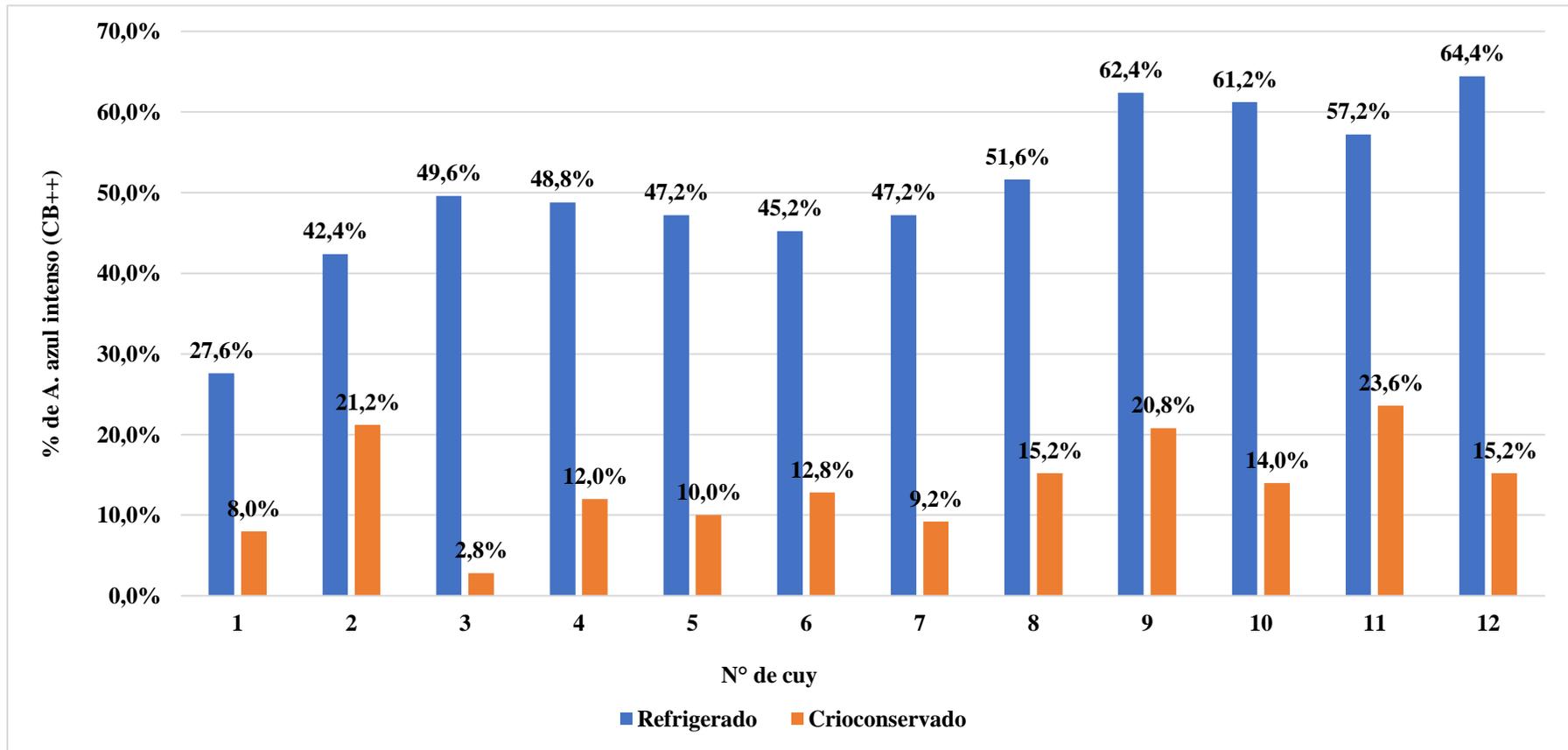
La característica azul intenso (B++) de espermatozoides epididimarios refrigerados tuvo un promedio y una DS de  $126 \pm 25,4$  (Tabla 1). En la Figura 8 se aprecia que los cuyes 9 y 12, obtuvieron los porcentajes más altos (62,4% y 64,4%; respectivamente). Con relación a espermatozoides epididimarios criopreservados (Tabla 2) mostró un promedio y una DS de  $34 \pm 16,79$  de espermatozoides azul intenso (B++), así mismo, los cuyes 2, 9 y 11 mostraron porcentajes más altos (21,2%, 20,8% y 23,6%; respectivamente).

#### **b. Acrosoma azul débil (CB+)**

La característica azul débil (CB+) de espermatozoides epididimarios refrigerados tuvo un promedio y una DS de  $76 \pm 25,9$  (Tabla 1). En la Figura 9 se aprecia que los cuyes 1, 2 obtuvieron los porcentajes más altos (58,8%, 47,6%; respectivamente). Con relación a espermatozoides epididimarios criopreservados (Tabla 2) mostró un promedio y una DS de  $114 \pm 25,8$  de espermatozoides azul débil (CB+); así mismo, los cuyes 7, 10 mostraron los porcentajes más altos (56,8%, 56%; respectivamente).

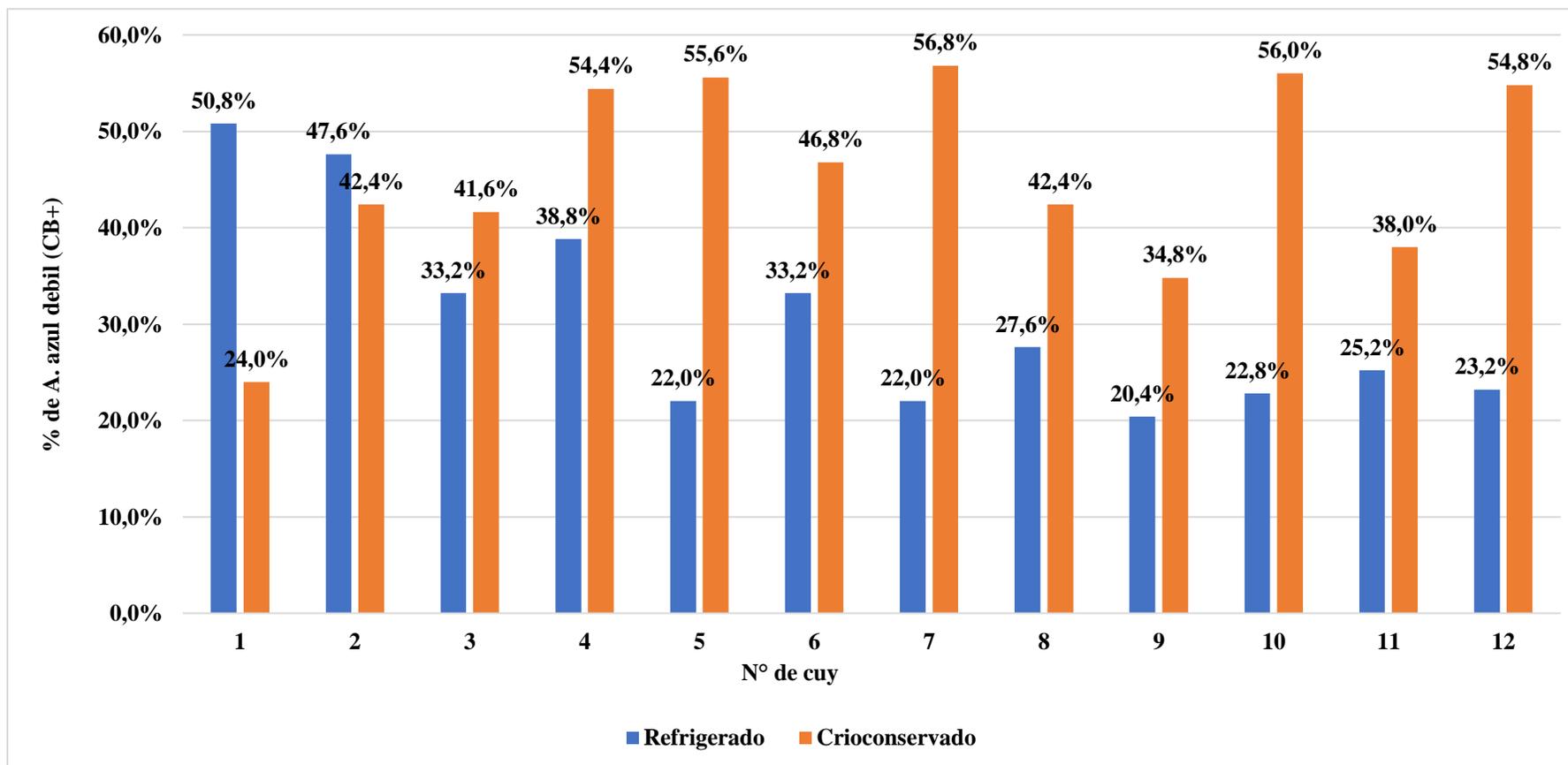
#### **c. Acrosoma sin capuchón (CB-)**

La característica azul débil (CB-) de espermatozoides epididimarios refrigerados tuvo un promedio y una DS de  $47 \pm 16,7$  (Tabla 1). En la Figura 10 se aprecia que los cuyes 5 y 7, obtuvieron los porcentajes más altos (30,8% en ambos casos). Con relación a espermatozoides epididimarios criopreservados (Tabla 2) mostró un promedio y una DS de  $101 \pm 26,8$  de espermatozoides sin capuchón (CB-), así mismo, los cuyes 1, 3 mostraron los porcentajes más altos (68%, 75,6%; respectivamente).



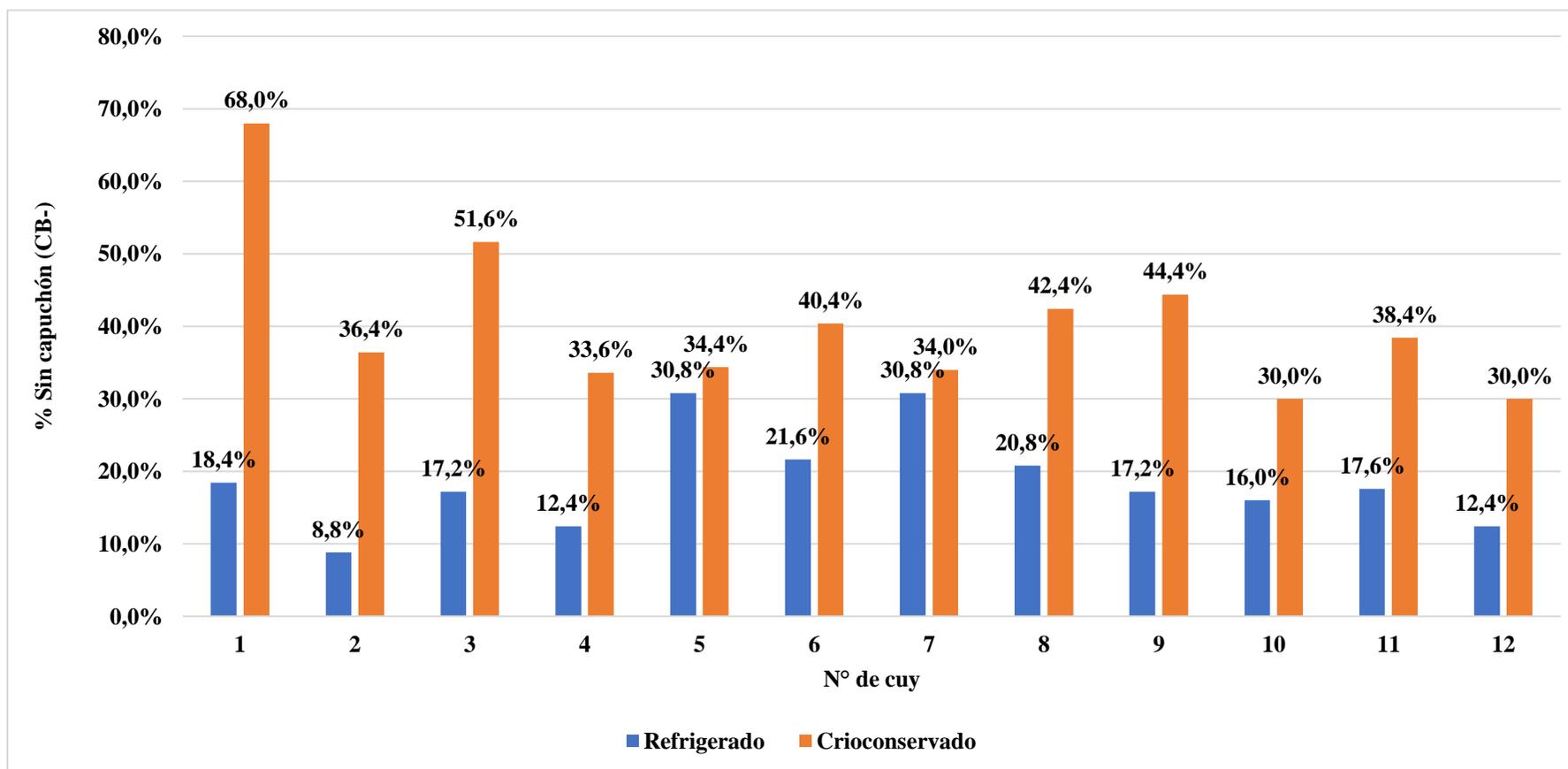
**Figura 8.** Valores promedio de la integridad acrosómica (azul intenso (CB++)) según modo de conservación.

El gráfico de barras representa la integridad acrosomal de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados representado en porcentaje. Un total de 250 espermatozoides evaluados mediante la tinción Coomassie Blue 0.22% con un objetivo 40x.



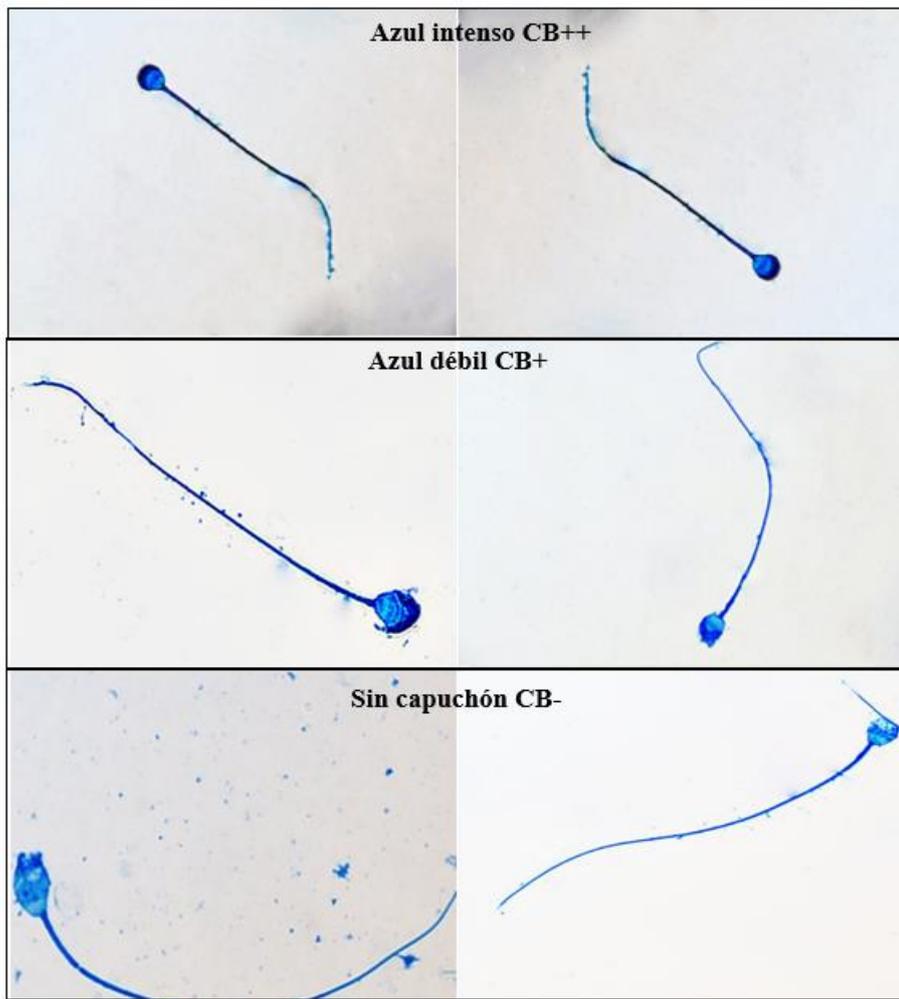
**Figura 9.** Valores promedios de la integridad acrosómica (azul débil (CB+)) según modo de conservación.

El gráfico de barras representa la integridad acrosomal de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados representado en porcentaje. Un total de 250 espermatozoides evaluados mediante la tinción Coomassie Blue 0.22% con un objetivo 40x.



**Figura 10.** Valores promedios de la integridad acrosómica (sin capuchón (CB-)) según modo de conservación.

El gráfico de barras representa la integridad acrosomal de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados representado en porcentaje. Un total de 250 espermatozoides evaluados mediante la tinción Coomassie Blue 0.22% con un objetivo 40x.



**Figura 11.** Tinciones para integridad acrosomal.

Integridad acrosomal mediante la tinción Coomassie Blue 0.22% en espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados.

### **3.1.4. Funcionalidad de la membrana**

#### **a. Membrana sin reacción (a)**

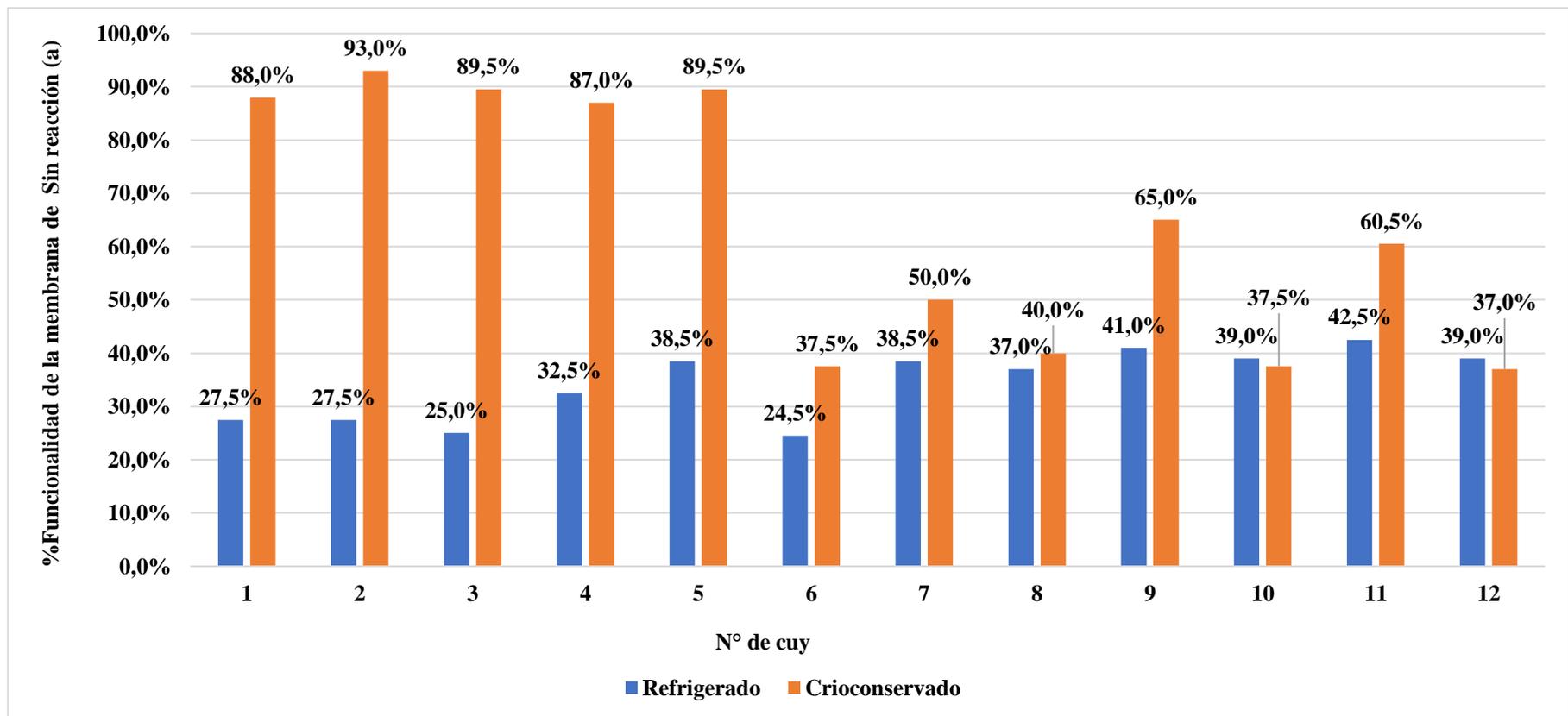
La funcionalidad de la membrana (Tabla 1) de espermatozoides epididimarios refrigerados sin reacción (a), obtuvo un promedio y una DS de  $69 \pm 13$ . Se encontró que los cuyes 11 y 12 obtuvieron los mayores porcentajes de (42,5% y 39%; respectivamente) (Figura 12). Con relación a espermatozoides epididimarios criopreservados (Tabla 2), se observó un promedio y una DS de  $129 \pm 47,34$  de los cuales, los cuyes 2, 3 y 5 reportaron mayores porcentajes (93%, 89,5% y 89,5%; respectivamente).

#### **b. Membrana con reacción débil (b)**

La funcionalidad de la membrana (Tabla 1) de espermatozoides epididimarios refrigerados de reacción débil (b), obtuvo un promedio y una DS de  $26 \pm 11$ . Se encontró que los cuyes 6, 9 y 11 obtuvieron los mayores porcentajes (28,5%, 26,5% y 27%; respectivamente, Figura 12). Con relación a espermatozoides epididimarios criopreservados (Tabla 2) se observó un promedio y una DS de  $26 \pm 17,8$  de espermatozoides de reacción débil (b); de los cuales, los cuyes 8, 10 y 11 muestran mayores porcentajes (22,5%, 20,5% y 20,5%; respectivamente) (Figura 13).

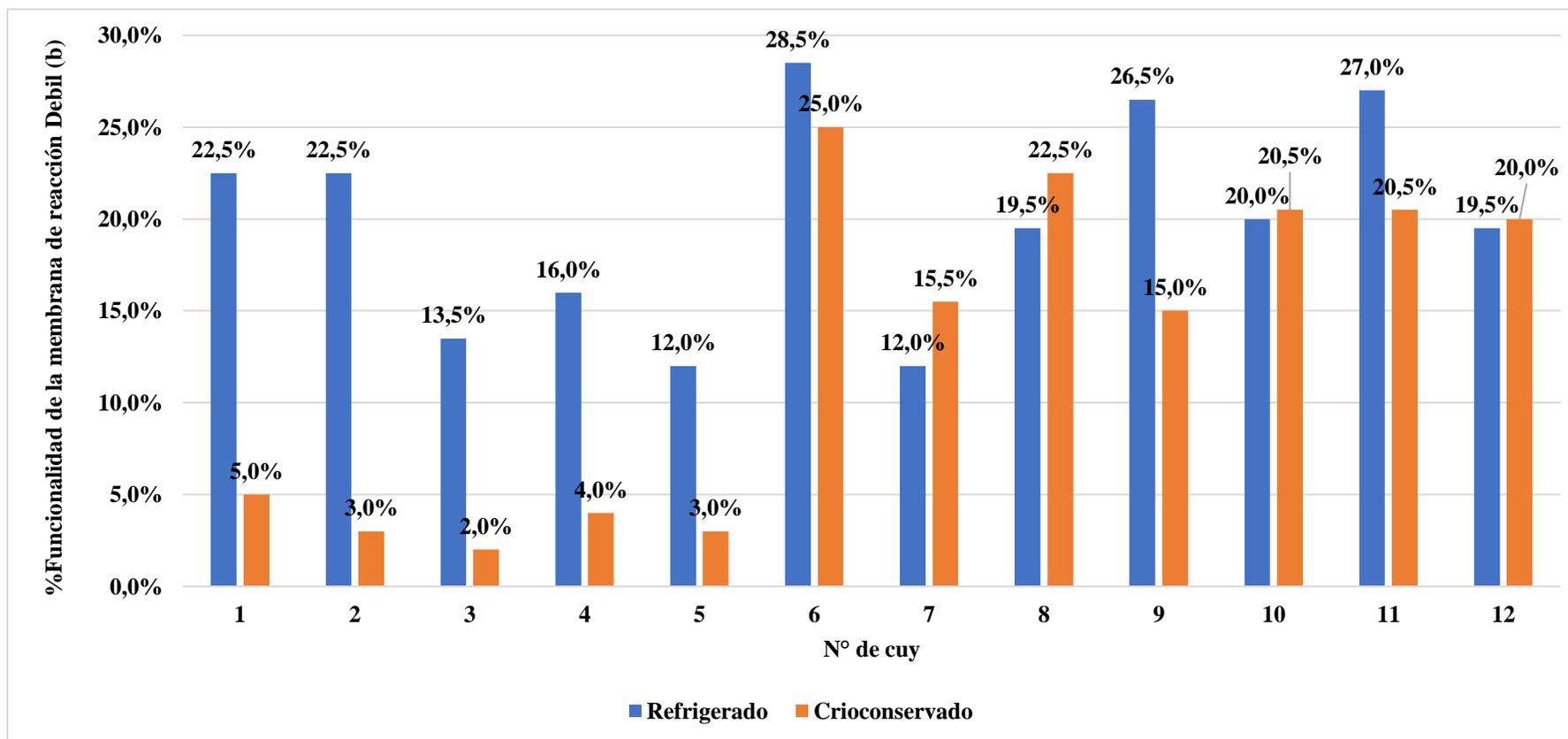
#### **c. Reacción débil (c)**

La funcionalidad de la membrana (Tabla 1), de espermatozoides epididimarios refrigerados de reacción débil (c), mostró un promedio y una DS de  $38 \pm 8,89$ . Se encontró que los cuyes 1, 2 y 4 obtuvieron mayores porcentajes (24%, 23,5% y 19,5%; respectivamente, Figura 14). Con relación a espermatozoides epididimarios criopreservados (Tabla 2), se observó un promedio y una DS de  $24 \pm 18,8$  de espermatozoides epididimarios de reacción débil (c), de los cuales los cuyes 8, 10 y 12 muestran mayores porcentajes (22,5%, 25% y 24%; respectivamente).



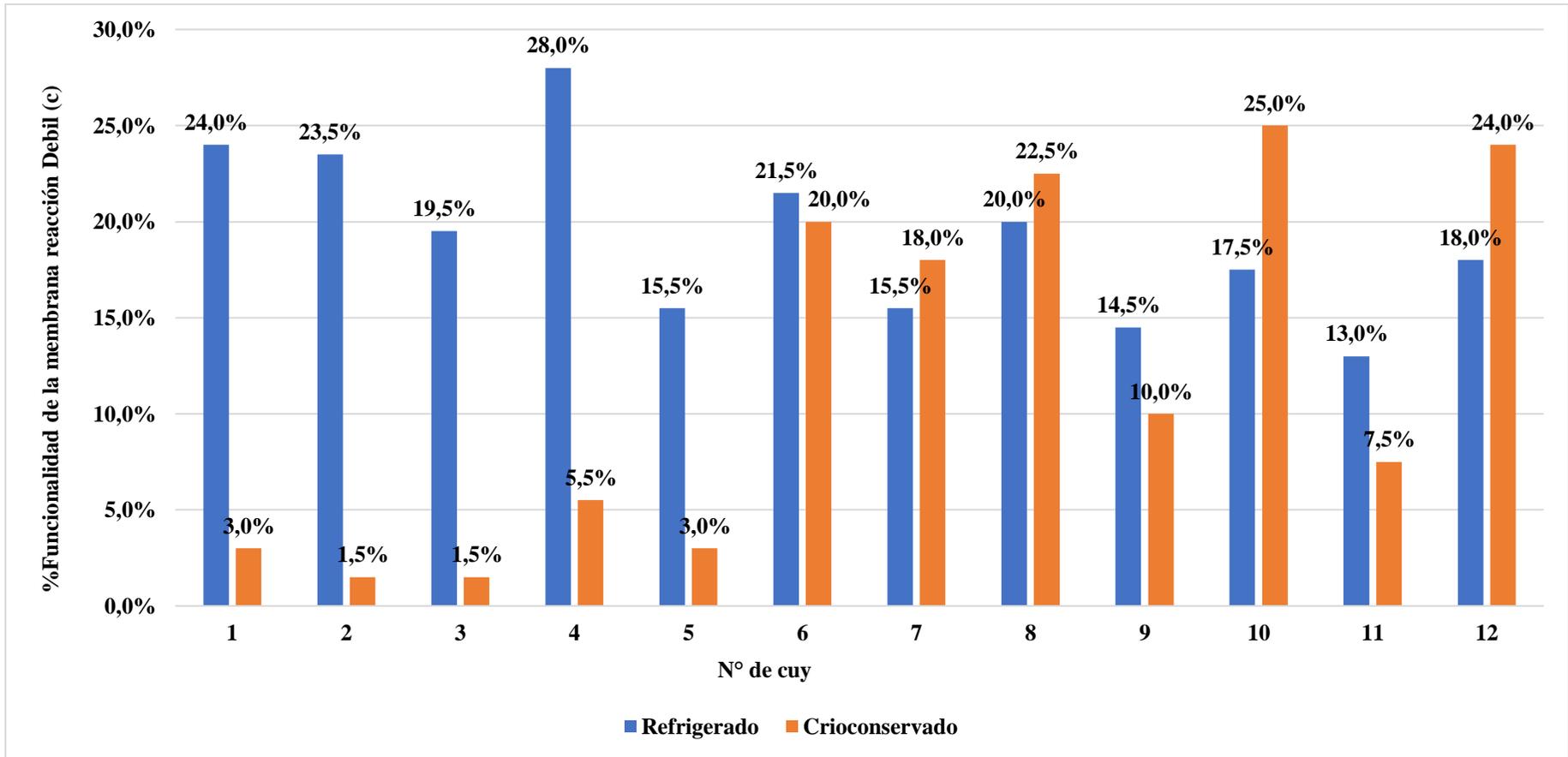
**Figura 12.** Valores promedios de la funcionalidad de la membrana sin reacción (a) según modo de conservación.

El gráfico de barras representa el parámetro de la funcionalidad de membrana de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados para la característica de membrana sin reacción (a) representado en porcentaje. Un total de 200 espermatozoides por cuy fueron evaluados mediante el test hiposmótico (HOST) con un objetivo 40x.



**Figura 13.** Valores promedios de la funcionalidad de la membrana (débil b) según modo de conservación.

El Gráfico de barras representa el parámetro de la funcionalidad de membrana de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados para la característica de membrana de reacción débil (b) representado en porcentaje. Un total de 200 espermatozoides por cuy fueron evaluados mediante el test hipoosmótico (HOST) con un objetivo 40x.



**Figura 14.** Valores promedios de la funcionalidad de la membrana (Débil c) según modo de conservación.

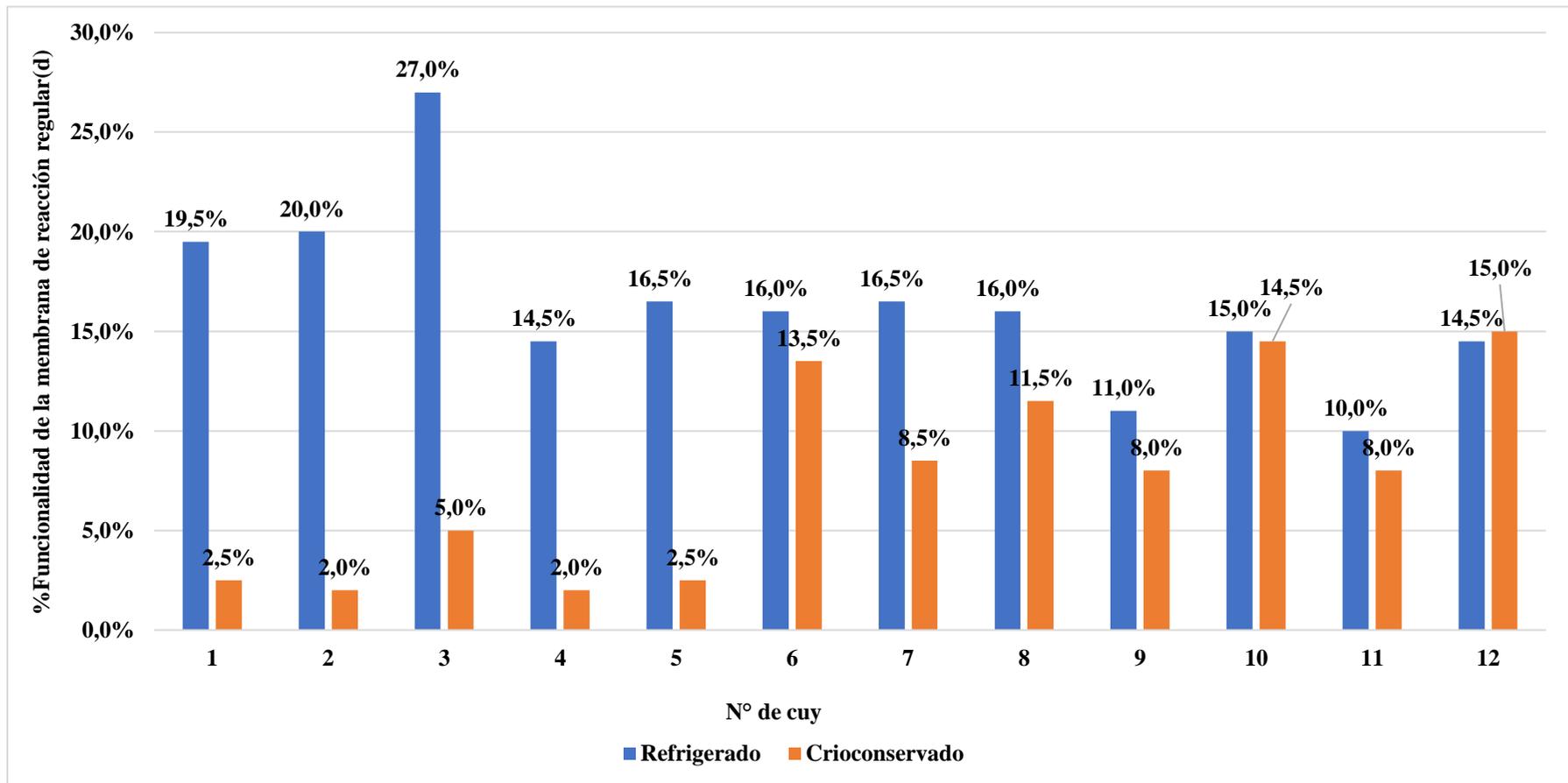
El Gráfico de barras representa el parámetro de la funcionalidad de membrana de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados para la característica de membrana de reacción débil (c) representado en porcentaje. Un total de 200 espermatozoides por cuy fueron evaluados mediante el test hipoosmótico (HOST) con un objetivo 40x.

#### **d. Reacción regular (d)**

La funcionalidad de la membrana (Tabla 1) de espermatozoides epididimarios refrigerados con reacción regular (d), mostro un promedio y una DS de  $33 \pm 8,8$ . Se encontró que los cuyes 1, 2 y 3 obtuvieron los mayores porcentajes con 19,5%, 20% y 27%; respectivamente (Figura 15). Con relación a espermatozoides epididimarios criopreservados (Tabla 2), se observó un promedio y una DS de  $16 \pm 10$  de espermatozoides epididimarios de reacción regular (d), de los cuales los cuyes 10 y 12 muestran mayores porcentajes (14,5% y 15%; respectivamente).

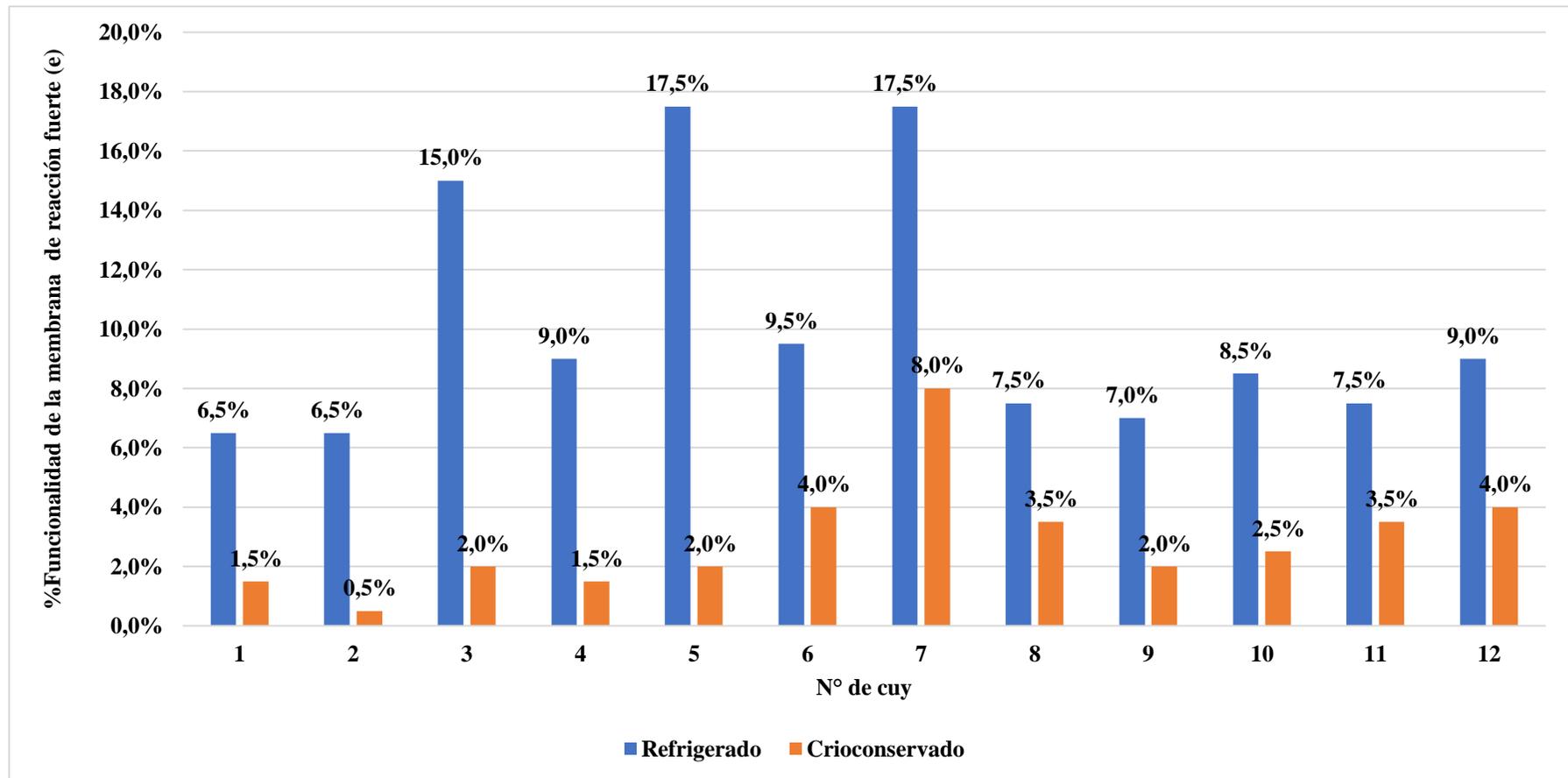
#### **e. Reacción fuerte (e)**

La funcionalidad de la membrana (Tabla 1) de espermatozoides epididimarios refrigerados con reacción fuerte (e), mostro un promedio y una DS de  $20 \pm 8,27$ . Se encontró que los cuyes 5 y 7 obtuvieron los mayores porcentajes con 17,5% y 17,5%; respectivamente (Figura 16). Con relación a espermatozoides epididimarios criopreservados (Tabla 2), se observó un promedio y una DS de  $6 \pm 3,88$  de espermatozoides epididimarios de reacción fuerte (e). de cuales los cuyes 6, 7, 11 y 12 muestran mayores porcentajes (4%, 8%, 3,5% y 4%; respectivamente).



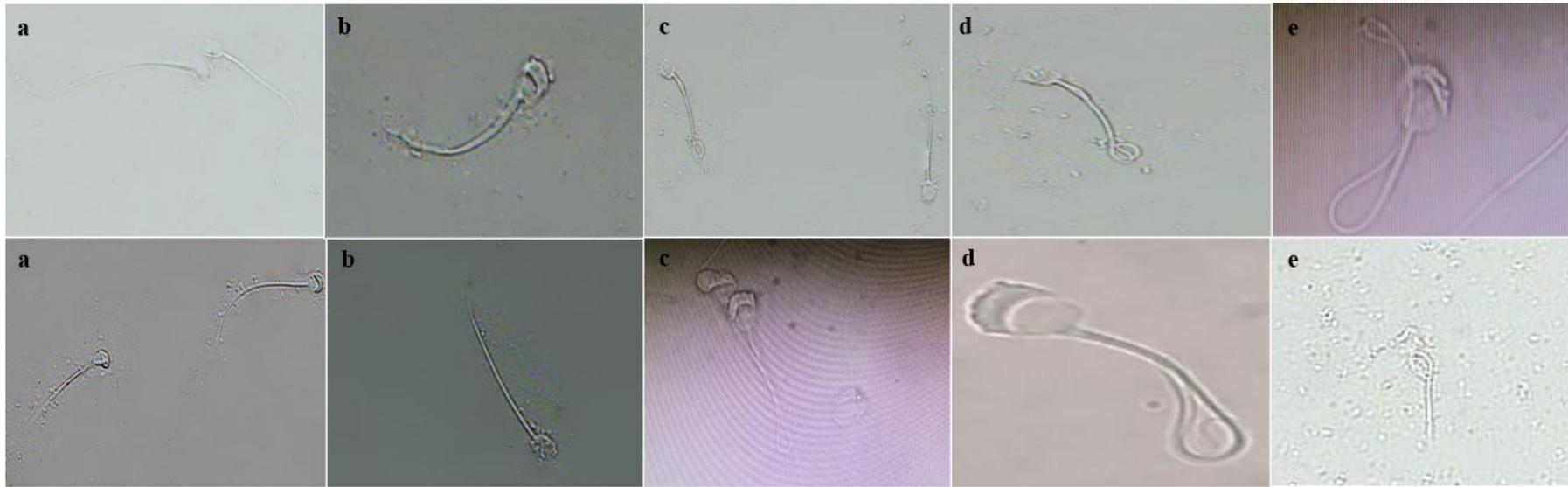
**Figura 15.** Valores promedio de la funcionalidad de la membrana (regular d) según modo de conservación.

El Gráfico de barras representa el parámetro de la funcionalidad de membrana de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados para la característica de membrana de reacción regular (d) representado en porcentaje. Un total de 200 espermatozoides por cuy fueron evaluados mediante el test hipoosmótico (HOST) con un objetivo 40x.



**Figura 16.** Valores promedios de la funcionalidad de la membrana (fuerte (e)) según modo de conservación.

El Gráfico de barras representa el parámetro de la funcionalidad de membrana de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados para la característica de membrana de reacción fuerte (e) representado en porcentaje. Un total de 200 espermatozoides por cuy fueron evaluados mediante el test hipoosmótico (HOST) con un objetivo 40x.



**Figura 17.** Funcionalidad de la membrana.

Funcionalidad de la membrana mediante la evaluación del test hipoosmótico (HOST) donde se muestran el grado de enrollamiento de la cola en la primera fila a espermatozoides epididimarios refrigerados: sin reacción (a), reacción débil (b), reacción débil (c), reacción regular (d) y reacción fuerte (e) y en la segunda fila a espermatozoides epididimarios criopreservados: sin reacción (a), reacción débil (b), reacción débil (c), reacción regular (d) y reacción fuerte (e).

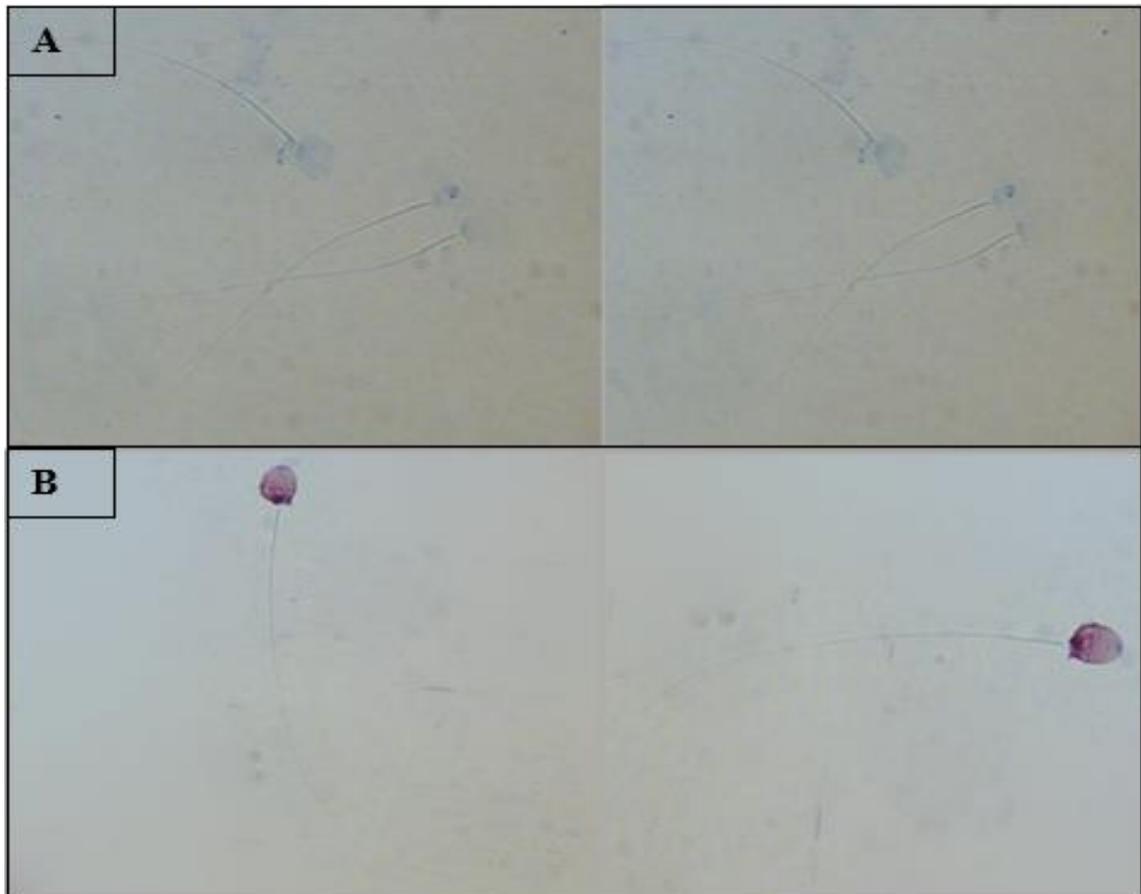
### **3.1.5. Cromatina**

#### **a. Cromatina condensada**

La Tabla 1 reporta el numero de espermatozoides epididimarios refrigerados con cromatina condensada, se observa un promedio y una DS de  $256 \pm 16$ . Los cuyes 8 y 12 mostraron los mayores valores en porcentaje con 93% y 90%, respectivamente (Figura 19). La Tabla 2 la característica de cromatina condensada de espermatozoides epididimarios criopreservados observándose un promedio y una DS de  $248 \pm 18$ ; en la figura 19 se puede observar los cuyes 8 y 10 mostraron mayores porcentajes (89% y 91,3%, respectivamente).

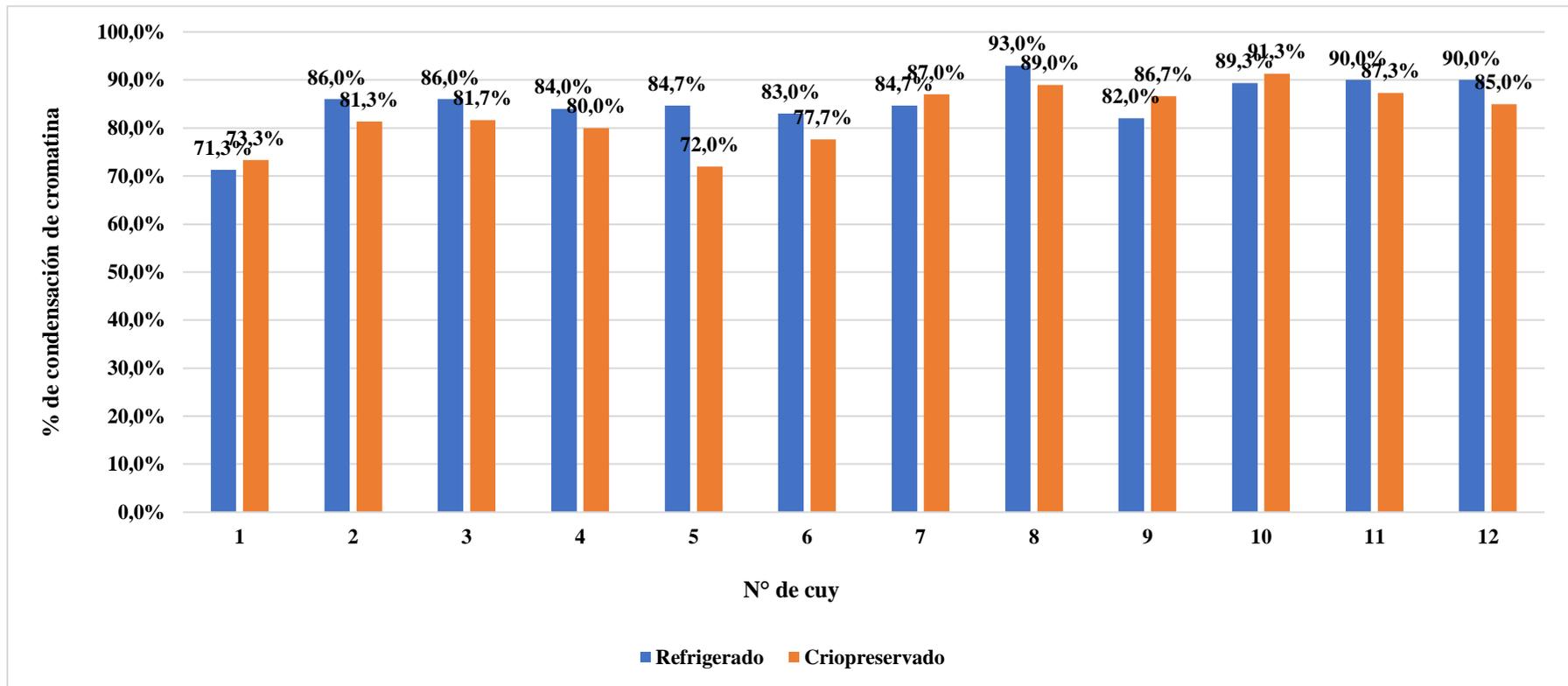
#### **b. Cromatina descondensada**

La Tabla 1 reporta el numero de espermatozoides epididimarios refrigerados con cromatina descondensada, se observa un promedio y una DS de  $44 \pm 16,54$ . Los cuyes 1; 6 y 9 mostraron los mayores valores en porcentaje con 29%, 17% y 18%; respectivamente (Figura 20). La Tabla 2 muestra la característica de cromatina descondensada de espermatozoides epididimarios criopreservados con un promedio y una DS de  $52 \pm 18,38$ . La figura 20 se puede observar que los cuyes 5 y 6 mostraron los mayores valores en porcentaje (28% y 22%, respectivamente).



**Figura 18.** Cromatina condensada y descondensada.

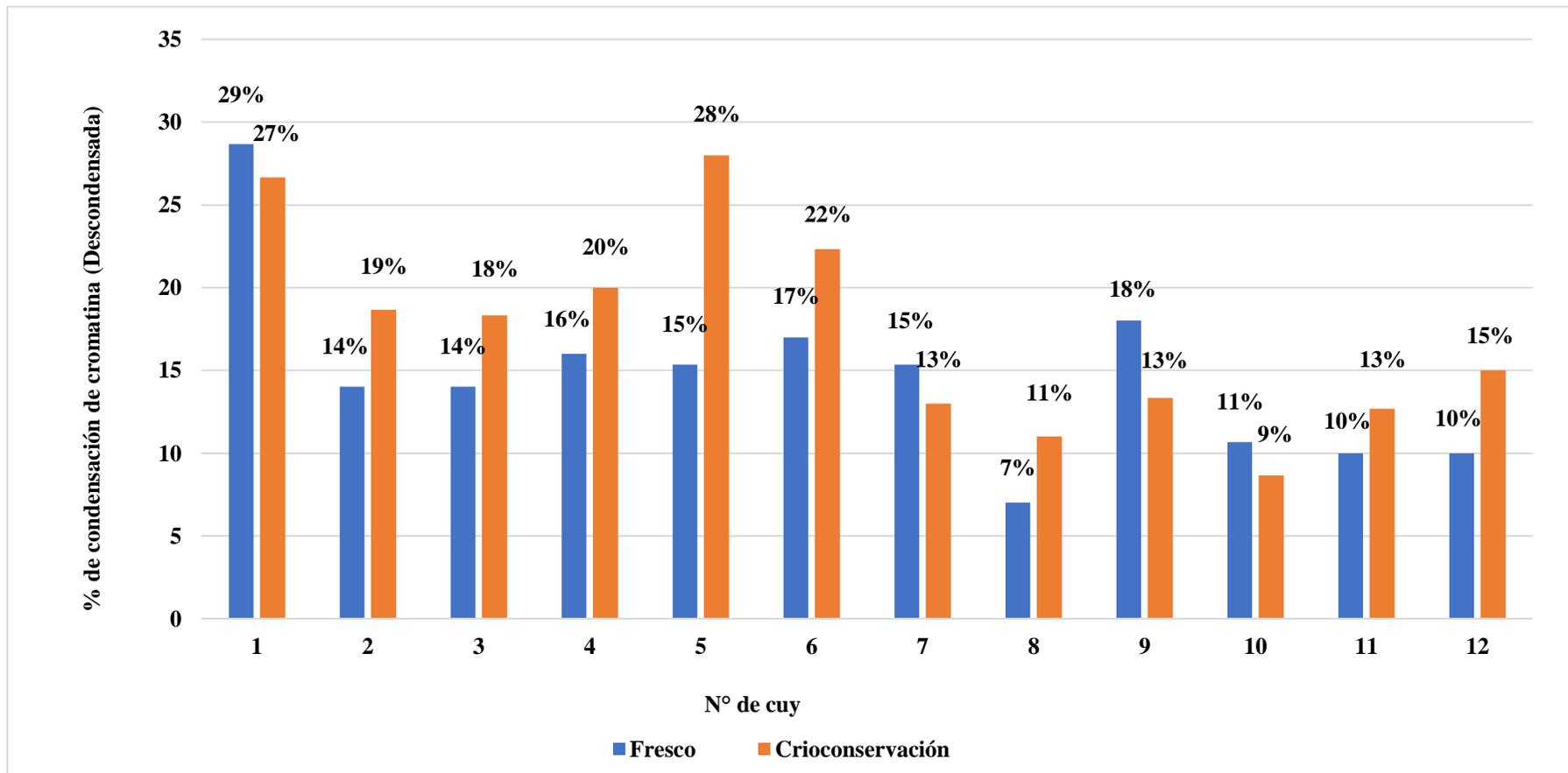
A: cromatina condensada y B: cromatina descondensada mediante la tinción de azul de toluidina en espermatozoides epididimarios tanto refrigerado y criopreservado.



**Figura 19.** Valores promedios de la condensación de cromatina según modo de conservación.

El gráfico de barras representa la característica de cromatina condensada de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados.

Un total de 300 espermatozoides por cuy fueron evaluados mediante la tinción azul de toluidina y evaluados a 40x.



**Figura 20.** Valores promedios de la descondensación de cromatina según modo de conservación.

El gráfico de barras representa la característica de cromatina descondensada de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados. Un total de 300 espermatozoides por cuy fueron evaluados mediante la tinción azul de toluidina y evaluados a 40x.

### **3.2. Correlación de la morfometría de los espermatozoides epididimarios**

#### **3.2.1. Correlación entre los parámetros morfométricos de espermatozoides epididimarios refrigerados**

En la Tabla 3 y en la Figura 21 muestran los grados de correlación entre los parámetros morfométricos de espermatozoides epididimarios refrigerados donde, el perímetro del acrosoma se correlaciona positivamente con el área ( $\mu\text{m}^2$ ) del acrosoma (0,98\*\*\*\*); así mismo, el largo de la cabeza con el área ( $\mu\text{m}^2$ ) del acrosoma (0,53\*\*\*\*). Por el contrario, el largo de la pieza intermedia con ancho del núcleo (W) (-0,23\*\*\*\*); por otro lado, ancho de la pieza intermedia se correlaciona con el largo de la pieza intermedia (0,36\*\*\*\*). Mas aun, el largo de la cola se correlaciona con largo del núcleo(L), ancho del núcleo(W), área ( $\mu\text{m}^2$ ) del núcleo y perímetro del núcleo (0,19\*\*\*, 0,15\*\*, 0,27\*\*\*\* y 0,28\*\*\*\*, respectivamente). Por el contrario, el largo de la cola se correlaciona con la pieza intermedia y ancho de la pieza intermedia (-0,57\*\*\*\*, -0,29\*\*\*\* respectivamente).

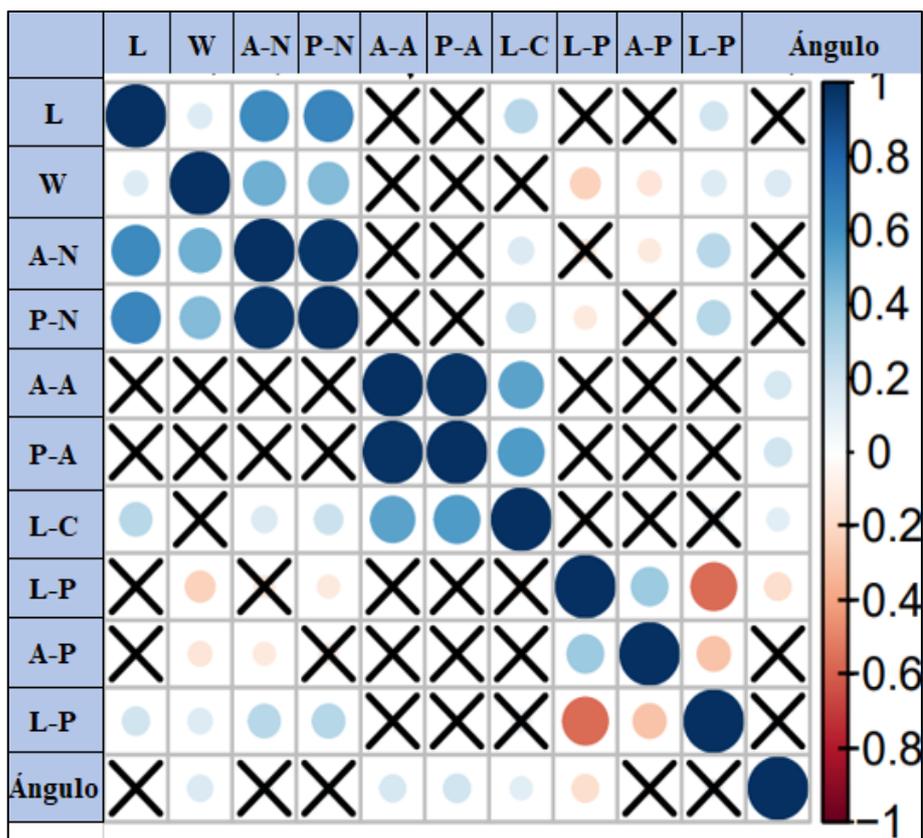
#### **3.2.2. Correlación entre los parámetros morfométricos de espermatozoides epididimarios criopreservados**

En la Tabla 4 se muestran los grados de correlación en la morfometría de espermatozoides epididimarios criopreservados en forma numérica y en la Figura 22 de manera gráfica por intensidad de colores; donde el largo de la cabeza se correlacionó significativamente con área ( $\mu\text{m}^2$ ) del acrosoma (0,98\*\*\*\*) así mismo, el largo de la pieza intermedia con ancho del núcleo (0,21\*\*\*). También, el ancho de la pieza intermedia se correlaciona positivamente con ancho del núcleo (W) (0,23\*\*\*\*); el largo de la cola se correlaciona significativamente con el área ( $\mu\text{m}^2$ ) de acrosoma, perímetro del acrosoma y largo de cabeza (0,24\*\*\*\*, 0,24\*\*\*\*, 0,2\*\*\*, respectivamente); finalmente, el largo de la pieza intermedia con una correlación negativa (-0,52\*\*\*\*).

**Tabla 3.***Correlación de la morfometría de espermatozoides epididimarios refrigerados.*

REFRIGERADO	(L)	(W)	A-N ( $\mu\text{m}^2$ )	P-N	A-A ( $\mu\text{m}^2$ )	P-A	L-C	L-P	A-P	L- R	Ángulo
(L)											
(W)	0,14*										
A-N ( $\mu\text{m}^2$ )	0,63****	0,48****									
P-N	0,65****	0,43****	0,97****								
A-A ( $\mu\text{m}^2$ )	0,048	-0,0061	-0,05	-0,033							
P-A	0,05	-0,0067	-0,039	-0,017	0,98****						
L-C	0,27****	-0,049	0,16**	0,21***	0,53****	0,57****					
L-P	-0,048	-0,23****	-0,11	-0,12*	0,028	0,024	-0,078				
A-P	-0,031	-0,14*	-0,12*	-0,091	-0,038	-0,037	0,035	0,36****			
L-R	0,19***	0,15**	0,27****	0,28****	-0,054	-0,023	0,099	-0,57****	-0,29****		
Ángulo	0,051	0,16**	0,071	0,061	0,17**	0,19****	0,12*	-0,18**	-0,067	0,081	

\* Correlación significativa al nivel de  $p < 0.05$  (bilateral); \*\* correlación significativa al nivel de  $p < 0.01$  (bilateral); \*\*\* correlación significativa al nivel de  $p < 0.001$  (bilateral); \*\*\*\* correlación significativa al nivel de  $p < 0.0001$  (bilateral). L: largo del núcleo, W: ancho del núcleo, A-N: área del núcleo, P-N: perímetro del núcleo, A-A: área del acrosoma, P-A: perímetro del acrosoma, L-C: largo de la cabeza, L-P: largo de la pieza intermedia, A-P: ancho de la pieza intermedia y L-R: largo de la cola.

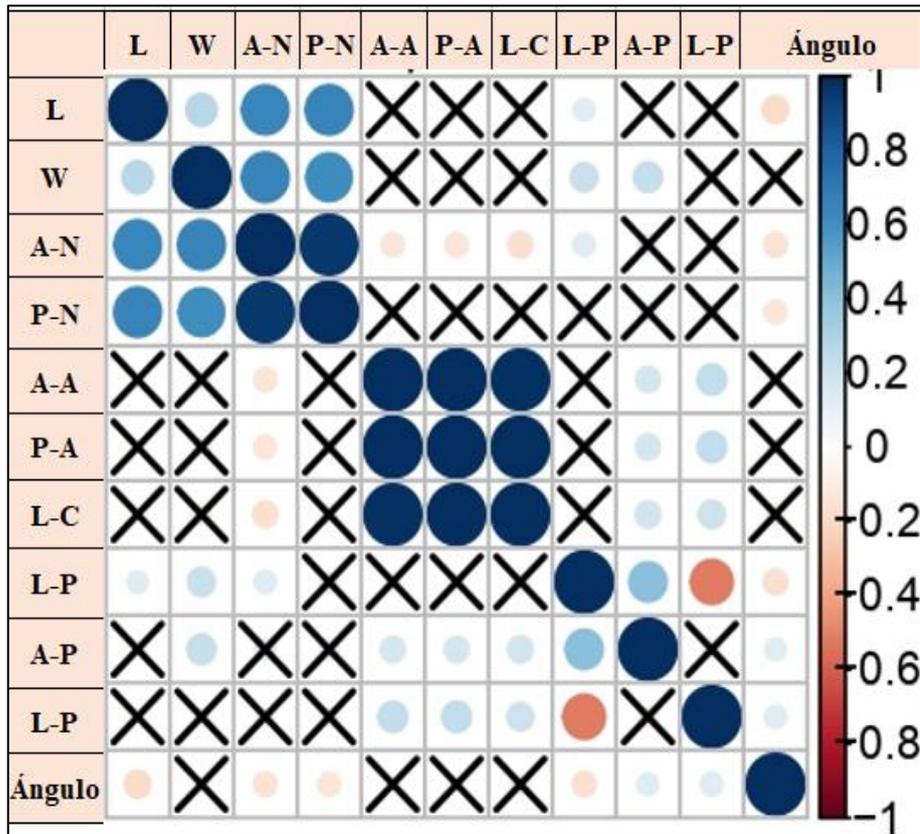


**Figura 21.** Matriz de correlación entre el refrigerado sobre la calidad del espermatozoide. El tamaño y la intensidad del círculo de color azul determina el grado de correlación positiva; el tamaño y la intensidad del círculo de color rojo determina el grado de correlación negativa y la X representa que no existe correlación entre las variables. L: largo del núcleo, W: ancho del núcleo, A-N: área del núcleo, P-N: perímetro del núcleo, A-A: área del acrosoma, P-A: perímetro del acrosoma, L-C: largo de la cabeza, L-P: largo de la pieza intermedia, A-P: ancho de la pieza intermedia y L-R: largo de la cola.

**Tabla 4.***Correlación de la morfometría de espermatozoides epididimarios criopreservados.*

CRIOPRESERVADOS	(L)	(W)	A-N ( $\mu\text{m}^2$ )	P-N	A-A ( $\mu\text{m}^2$ )	P-A	L-C	L-P	A-P	L- R	Ángulo
(L)											
(W)	0,27****										
A-N ( $\mu\text{m}^2$ )	0,64****	0,65****									
P-N	0,65****	0,61****	0,96****								
A-A ( $\mu\text{m}^2$ )	0,026	-0,096	-0,14*	-0,063							
P-A	0,023	-0,09	-0,14*	-0,067	1****						
L-C	0,036	-0,1	-0,17**	-0,09	0,98****	0,99****					
L-P	0,12*	0,21***	0,13*	0,1	0,076	0,083	0,098				
A-P	0,068	0,23****	0,11	0,1	0,17**	0,17**	0,18**	0,41****			
L-R	-0,0011	-0,075	0,076	0,089	0,24****	0,24****	0,2***	-0,52****	-0,1		
Ángulo	-0,19**	0,049	-0,15**	-0,14*	-0,044	-0,051	-0,097	-0,16**	0,12*	0,13*	

\* Correlación significativa al nivel de  $p < 0.05$  (bilateral); \*\* correlación significativa al nivel de  $p < 0.01$  (bilateral); \*\*\* correlación significativa al nivel de  $p < 0.001$  (bilateral); \*\*\*\* correlación significativa al nivel de  $p < 0.0001$  (bilateral). L: largo del núcleo, W: ancho del núcleo, A-N: área del núcleo, P-N: perímetro del núcleo, A-A: área del acrosoma, P-A: perímetro del acrosoma, L-C: largo de la cabeza, L-P: largo de la pieza intermedia, A-P: ancho de la pieza intermedia y L-R: largo de la cola.



**Figura 22.** Matriz de correlación entre el criopreservado sobre la calidad del espermatozoide.

El tamaño y la intensidad del círculo de color azul determina el grado de correlación positiva; el tamaño y la intensidad del círculo de color rojo determina el grado de correlación negativa y la X representa que no existe correlación entre las variables. L: largo del núcleo, W: ancho del núcleo, A-N: área del núcleo, P-N: perímetro del núcleo, A-A: área del acrosoma, P-A: perímetro del acrosoma, L-C: largo de la cabeza, L-P: largo de la pieza intermedia, A-P: ancho de la pieza intermedia y L-R: largo de la cola

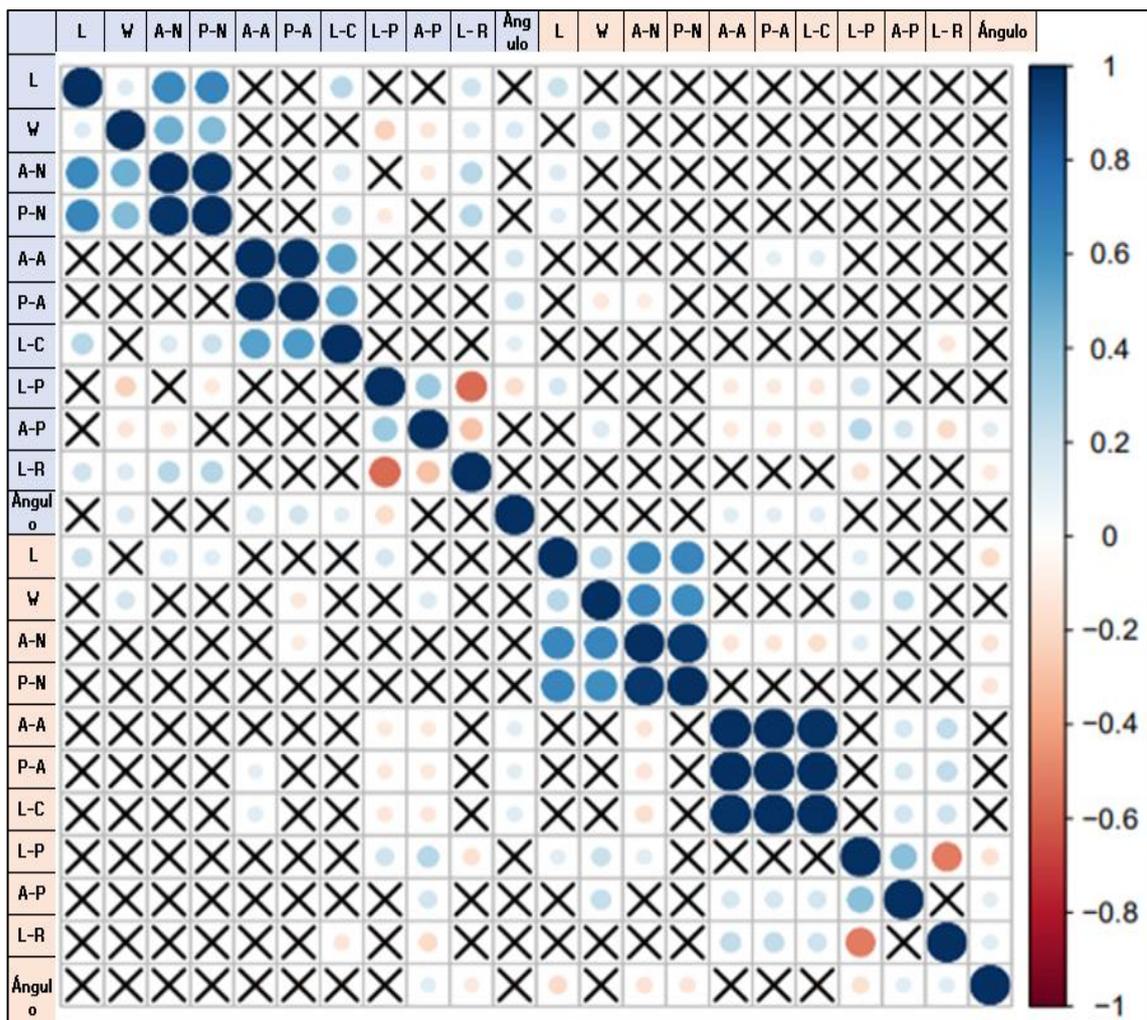
### **3.2.3. Correlación entre los parámetros morfométricos de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados**

La Tabla 5 y la Figura 23 muestran la correlación entre la morfometría de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados en forma numérica y gráfica, respectivamente. Se observó que el largo del núcleo (L) de espermatozoides refrigerados se correlaciona positivamente con largo del núcleo (L) ( $0,21^{***}$ ) de espermatozoides criopreservados; encontrándose también, el ancho del núcleo (w) de espermatozoides refrigerados con una correlación positiva con ancho del núcleo (w) de espermatozoides criopreservados ( $0,18^{**}$ ); del mismo modo, área ( $\mu\text{m}^2$ ) del núcleo de espermatozoides refrigerados se correlaciona con largo del núcleo (L) de espermatozoides criopreservados ( $0,13^*$ ); asimismo, el área ( $\mu\text{m}^2$ ) del acrosoma de espermatozoides refrigerados se correlaciona con el perímetro del acrosoma y largo de cabeza de espermatozoides criopreservados ( $0,11^*$  y  $0,13^*$ ; respectivamente). Por el contrario, el perímetro del acrosoma de espermatozoides refrigerados se correlaciona negativamente con el ancho del núcleo (w) y área ( $\mu\text{m}^2$ ) del núcleo de espermatozoides criopreservados ( $-0,13^*$  y  $-0,11^*$ , respectivamente). Sumado a ello, el largo de cabeza de espermatozoides refrigerados se correlacionó negativamente con el largo de la cola de espermatozoides criopreservados ( $-0,14^*$ ); el largo de pieza intermedia de espermatozoides refrigerados se correlaciona con el largo del núcleo (L) y largo de pieza intermedia de espermatozoides criopreservados ( $0,17^{**}$  y  $0,19^{***}$ , respectivamente). El largo de la pieza intermedia de espermatozoides refrigerados se correlaciona de manera negativa con el área ( $\mu\text{m}^2$ ) de acrosoma, perímetro del acrosoma y largo de cabeza de espermatozoides criopreservados ( $-0,12^*$ ,  $-0,12^*$  y  $-0,13^*$ , respectivamente). Así también, el ancho de la pieza intermedia de espermatozoides refrigerados se correlaciona positivamente con el ancho del núcleo (w), largo de la pieza intermedia y ancho de la pieza intermedia de espermatozoides criopreservados ( $0,15^{**}$ ,  $0,27^{***}$  y  $0,18^{**}$ ; respectivamente), pero, se correlaciona negativamente con el área ( $\mu\text{m}^2$ ) de acrosoma, perímetro del acrosoma, largo de cabeza y largo de la cola de espermatozoides criopreservados ( $-0,12^*$ ,  $-0,12^*$ ,  $-0,13^*$  y  $-0,19^{***}$ , respectivamente).

**Tabla 5.***Correlación de la morfometría de espermatozoides epididimarios refrigerados y criopreservados.*

REGRIGERADO CRIOPRESERVADO	(L)	(W)	A-N ( $\mu\text{m}^2$ )	P-N	A-A ( $\mu\text{m}^2$ )	P-A	L-C	L-P	A-P	L- R	Ángulo
(L)	0,21***	-0,079	0,15**	0,13*	0,008	0,0044	0,11	0,17**	0,064	0,092	0,058
(W)	0,0089	0,18**	0,056	0,04	-0,1	-0,13*	-0,099	0,0094	0,15**	0,085	-0,017
A-N ( $\mu\text{m}^2$ )	0,044	0,057	0,06	0,036	-0,1	-0,11*	-0,0045	0,1	0,074	0,051	0,0016
P-N	0,069	0,052	0,067	0,045	-0,055	-0,07	0,035	0,056	0,024	0,076	0,013
A-A ( $\mu\text{m}^2$ )	0,042	-0,058	0,074	0,064	0,11	0,089	0,028	-0,12*	-0,12*	-0,0041	0,12*
P-A	0,04	-0,058	0,074	0,064	0,11*	0,089	0,027	-0,12*	-0,12*	-0,0075	0,12*
L-C	0,066	-0,072	0,079	0,072	0,13*	0,11	0,063	-0,13*	-0,13*	0,017	0,13*
L-P	0,0054	-0,006	0,024	0,04	0,058	0,051	0,076	0,19***	0,27****	-0,16**	0,076
A-P	0,029	0,055	0,072	0,055	0,048	0,037	0,079	0,094	0,18**	-0,066	0,046
L-R	-0,059	-0,02	-0,035	-0,061	-0,091	-0,1	-0,14*	-0,088	-0,19***	-0,036	0,0051
Ángulo	-0,053	0,082	0,037	0,043	-0,1	-0,11	-0,1	0,094	0,12*	-0,12*	-0,092

\* Correlación significativa al nivel de  $p < 0.05$  (bilateral); \*\* correlación significativa al nivel de  $p < 0.01$  (bilateral); \*\*\* correlación significativa al nivel de  $p < 0.001$  (bilateral); \*\*\*\* correlación significativa al nivel de  $p < 0.0001$  (bilateral). L: largo del núcleo, W: ancho del núcleo, A-N: área del núcleo, P-N: perímetro del núcleo, A-A: área del acrosoma, P-A: perímetro del acrosoma, L-C: largo de la cabeza, L-P: largo de la pieza intermedia, A-P: ancho de la pieza intermedia y L-R: largo de la cola.

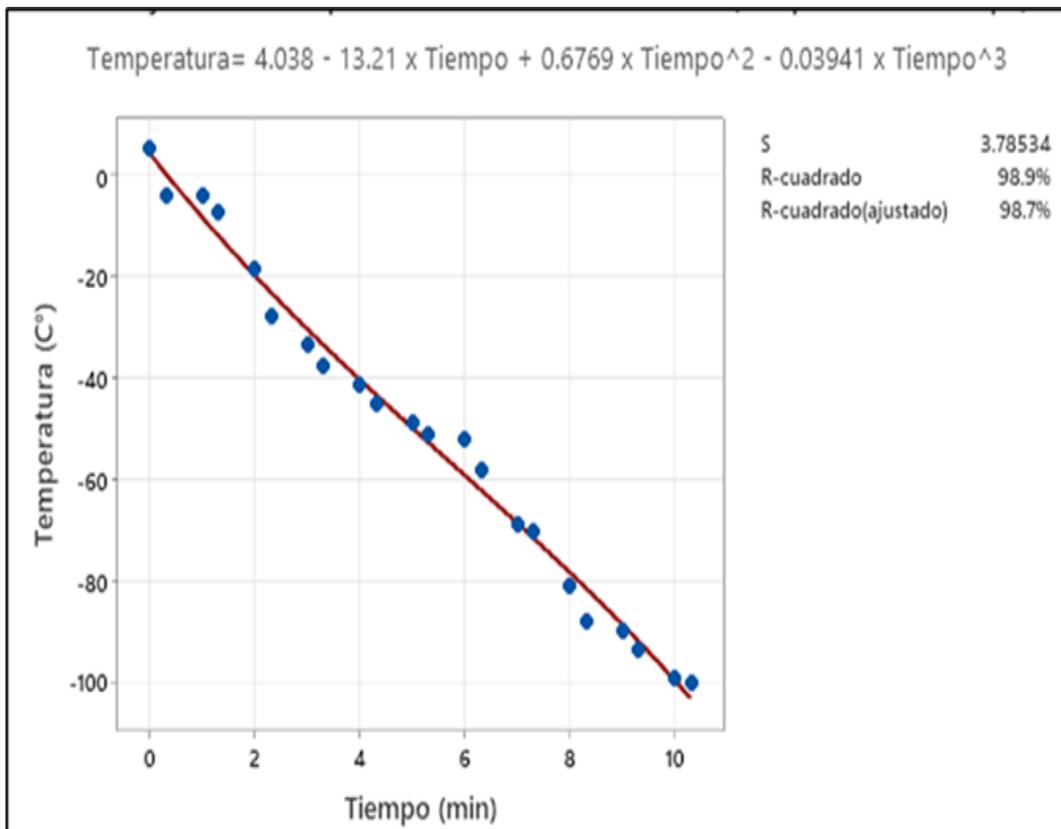


**Figura 23.** Matriz de correlación entre el refrigerado y la criopreservación sobre calidad del espermatozoide.

El tamaño y la intensidad del círculo de color azul determina el grado de correlación positiva; el tamaño y la intensidad del círculo de color rojo determina el grado de correlación negativa y la X representa que no existe correlación entre las variables. L: largo del núcleo, W: ancho del núcleo, A-N: área del núcleo, P-N: perímetro del núcleo, A-A: área del acrosoma, P-A: perímetro del acrosoma, L-C: largo de la cabeza, L-P: largo de la pieza intermedia, A-P: ancho de la pieza intermedia y L-R: largo de la cola.

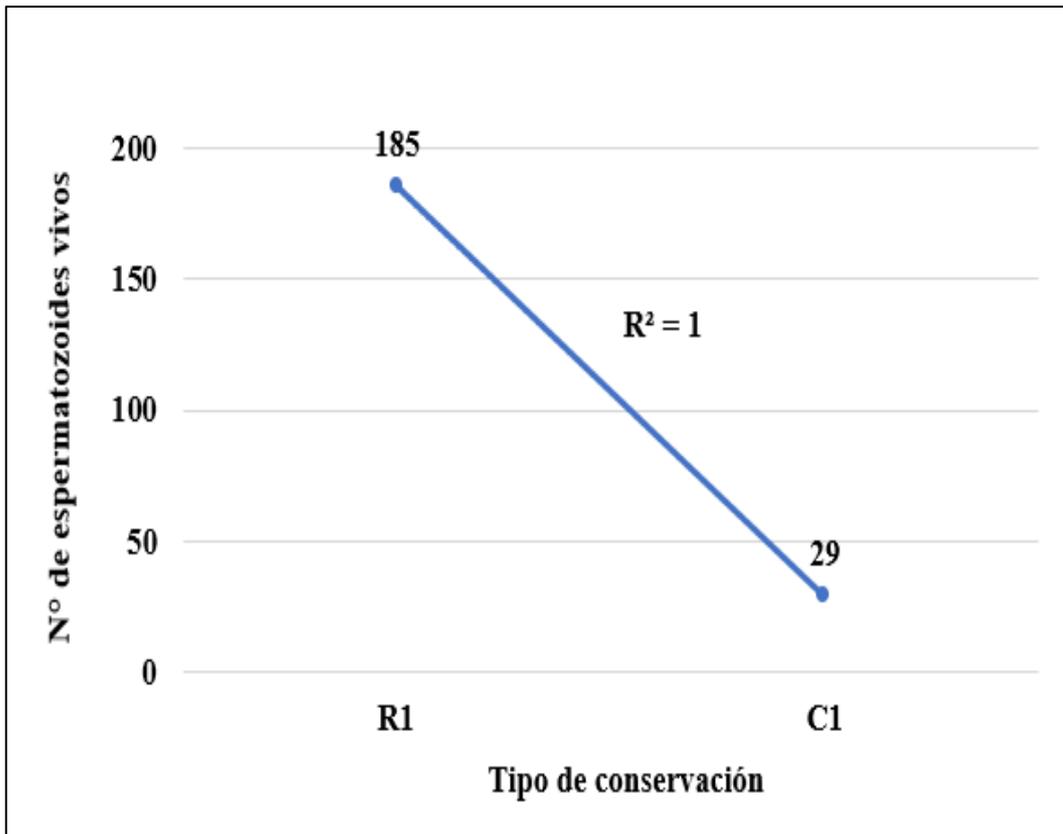
### 3.3. Estandarización de la criopreservación de semen epididimario de cuy

En la Figura 24, se muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 10 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 98,9% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 84,32% (Figura 25) de espermatozoides muertos en criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 24.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 1.

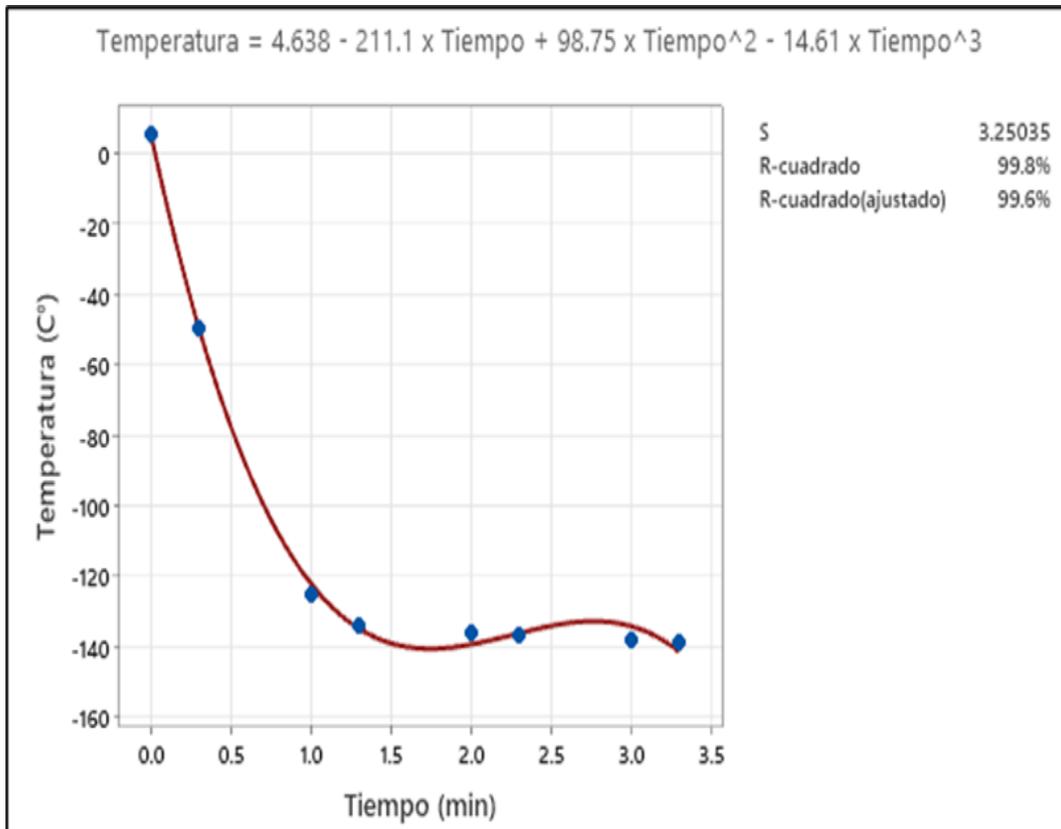
S: error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y el tiempo con la finalidad de reducir el error.



**Figura 25.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el R1 y C1.

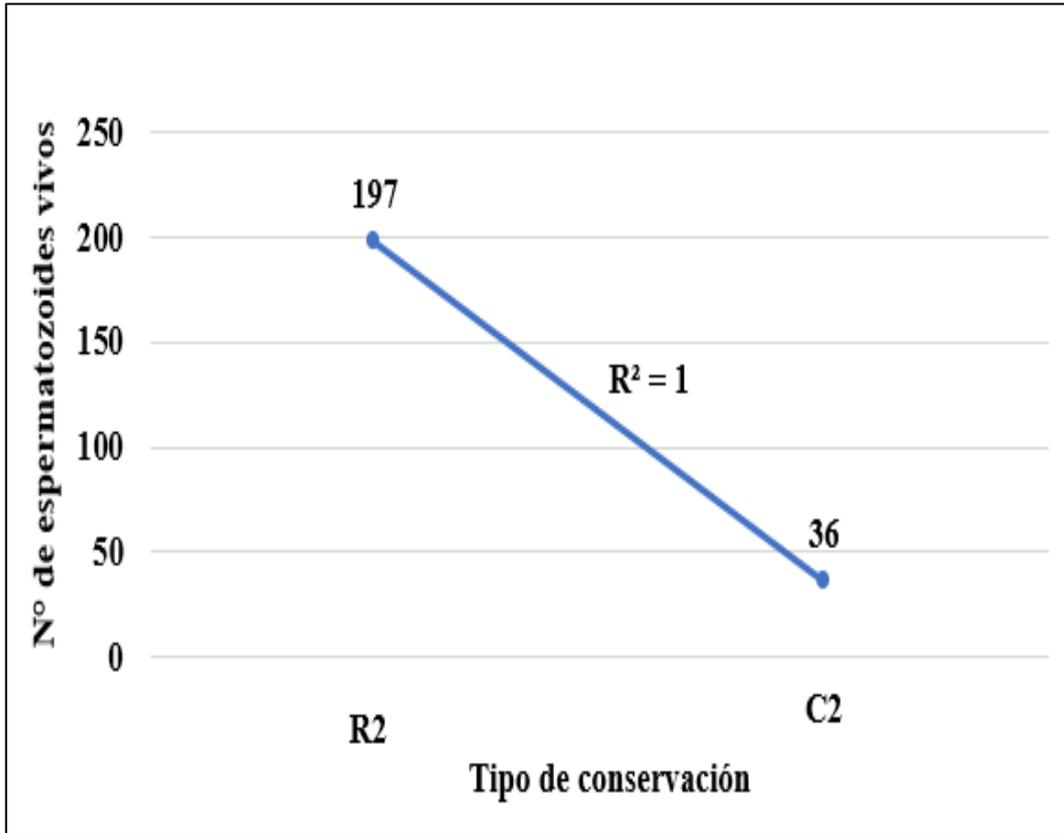
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R1) como criopreservados (C1) del cuy 1 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 26, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 3.5 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 99,9% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 81,72 (Figura27) de espermatozoides muertos criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 26.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 2.

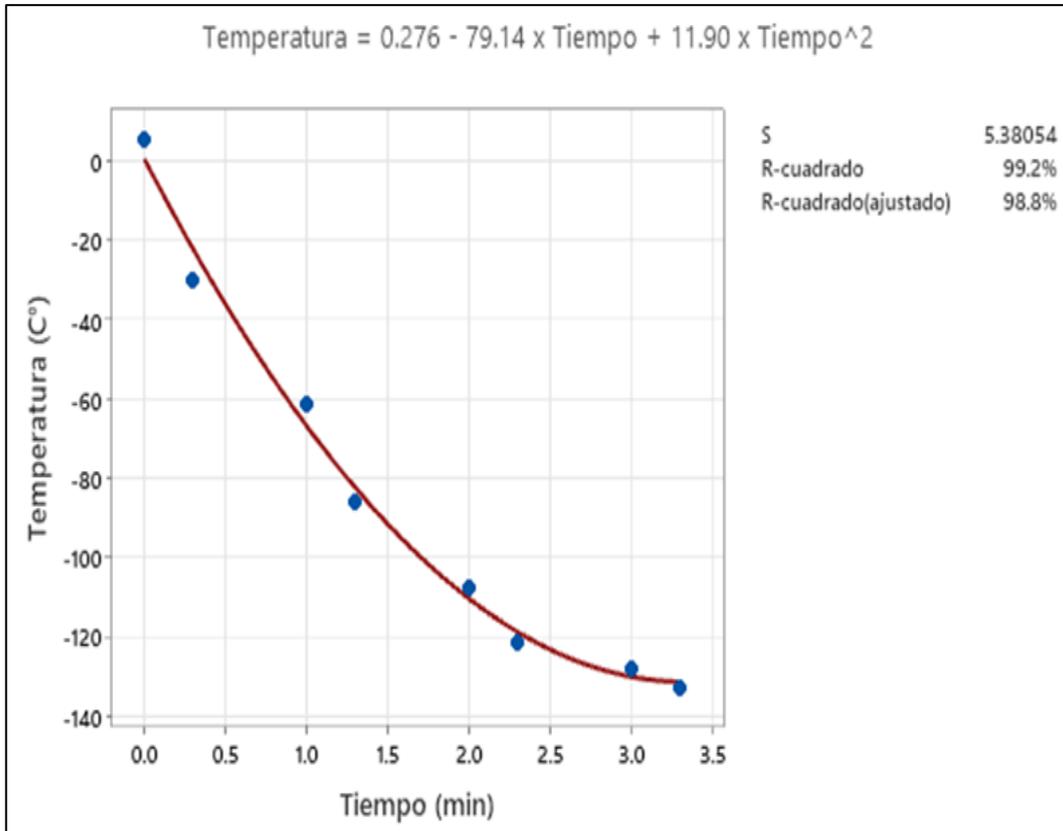
S: representa el error de los datos dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación del ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo y reducir el error.



**Figura 27.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C2 y R2.

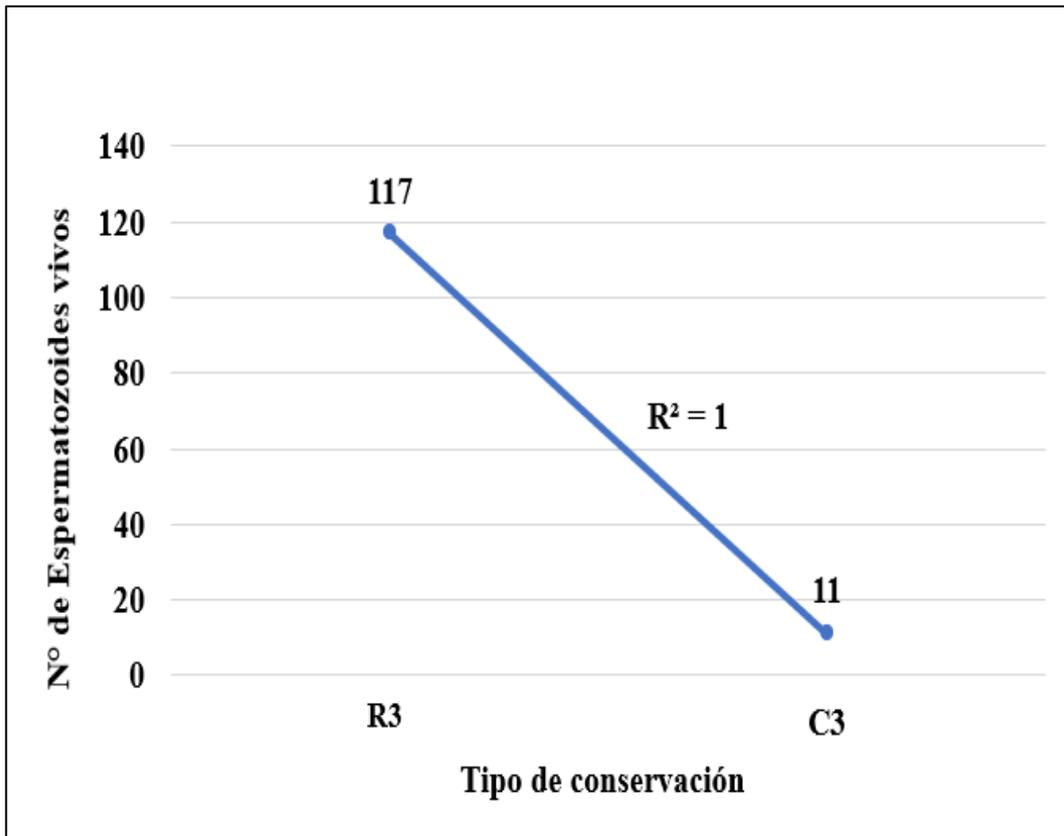
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R2) como criopreservados (C2) del cuy 2 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 28, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 3.5 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 99,2% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 90,40% (Figura 29) de espermatozoides muertos en criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 28.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 3.

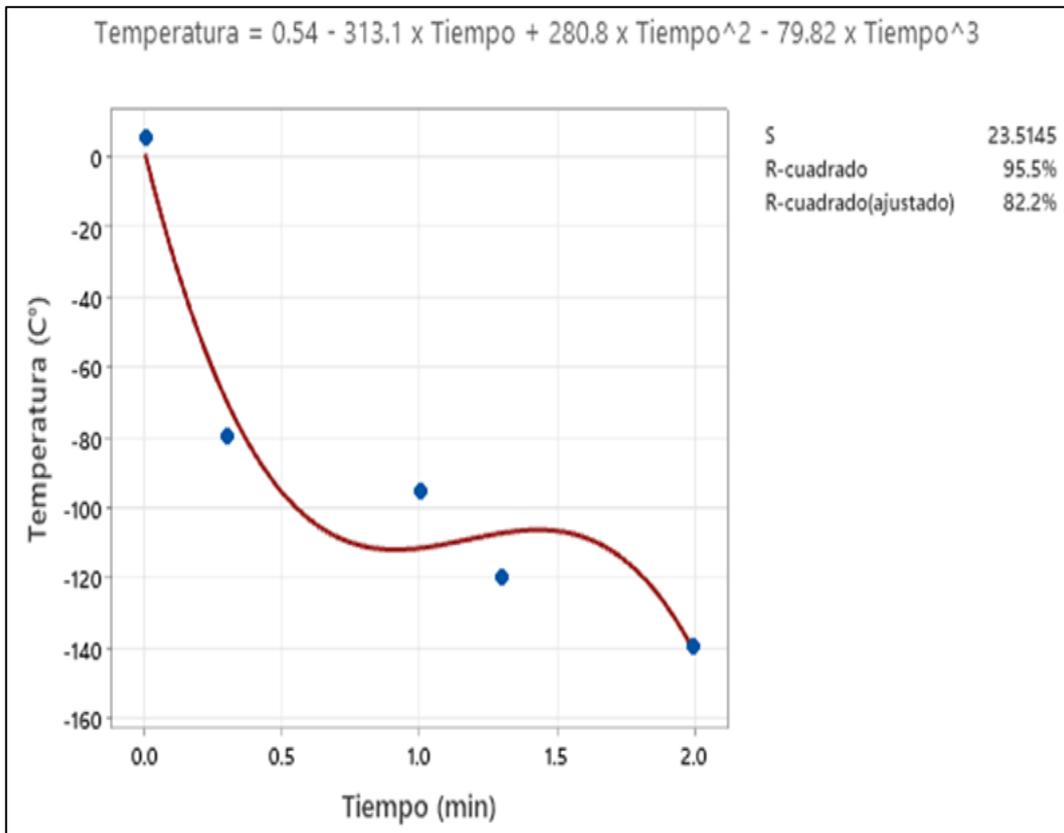
S: representa el error de los datos dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado: es la representación del ajuste de los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo y reducir el error.



**Figura 29.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C3 y R3.

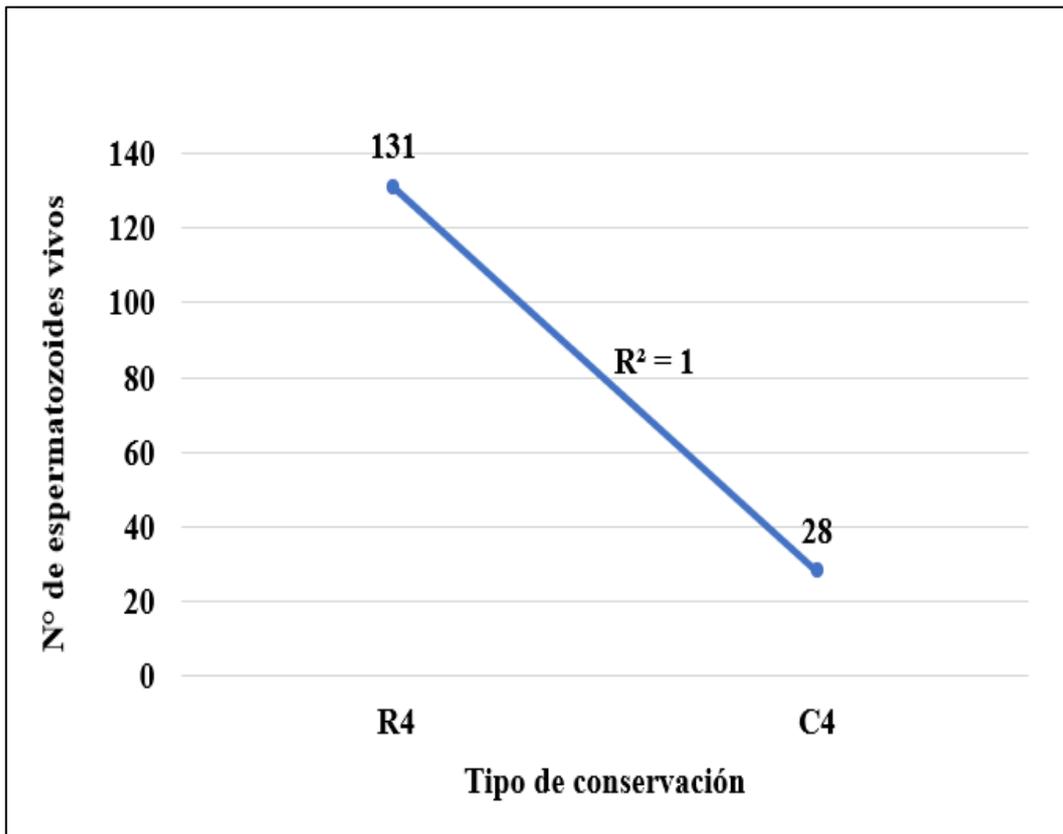
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R3) como criopreservados (C3) del cuy 3 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 30, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 2 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 95,5% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 78,62% (Figura 31) de espermatozoides muertos criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 30.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 4.

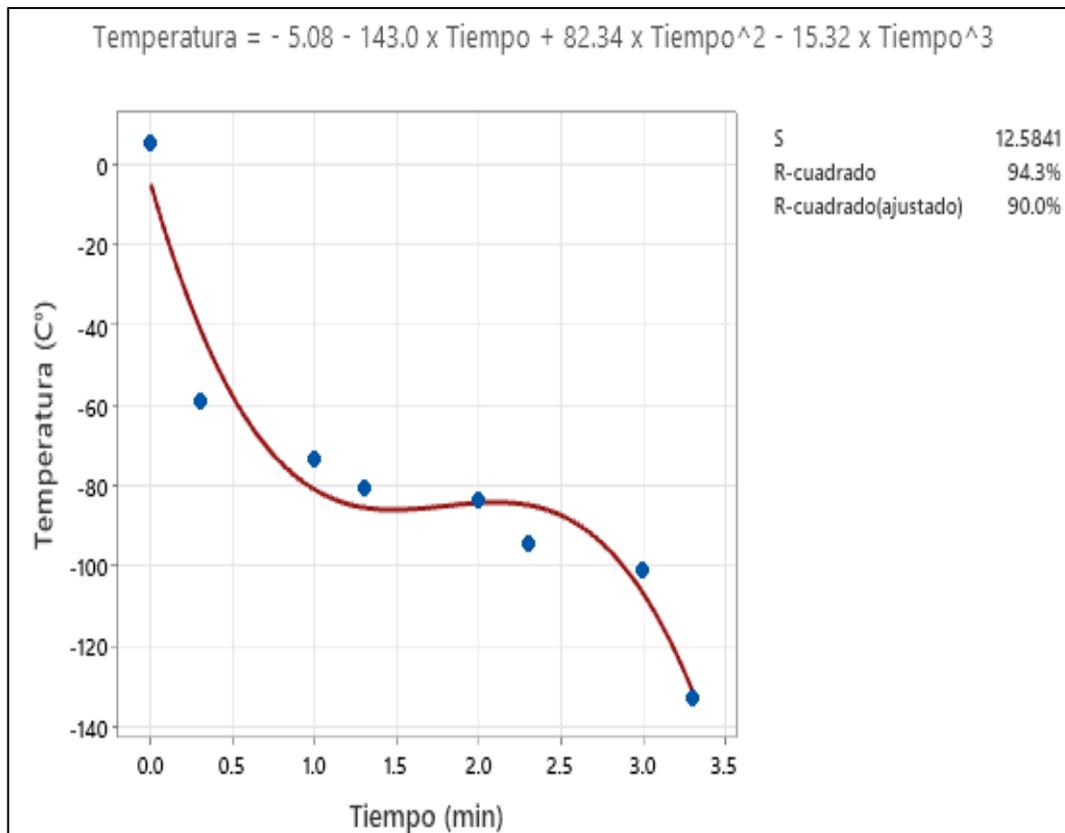
S: representa el error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo, con la finalidad de reducir el error.



**Figura 31.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C4 y R4.

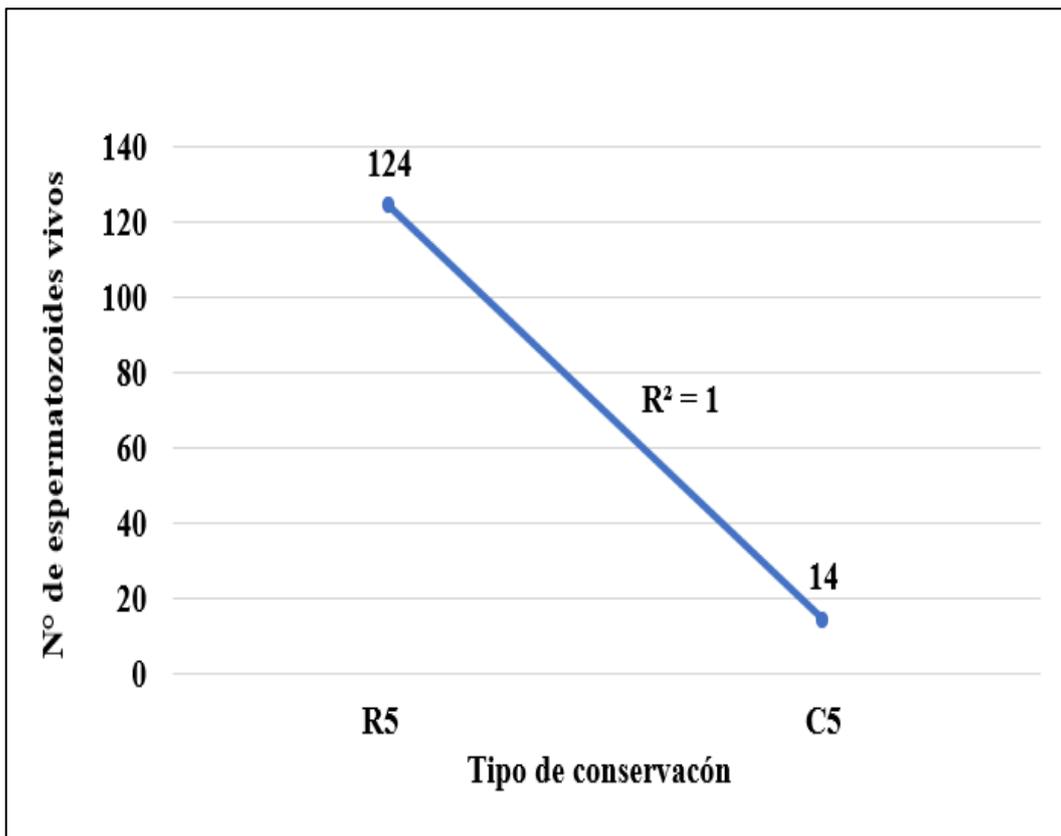
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R4) como criopreservados (C4) del cuy 4 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 32, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 3.5 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 94,3% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 88,70% (Figura 33) de espermatozoides muertos criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 32.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 5.

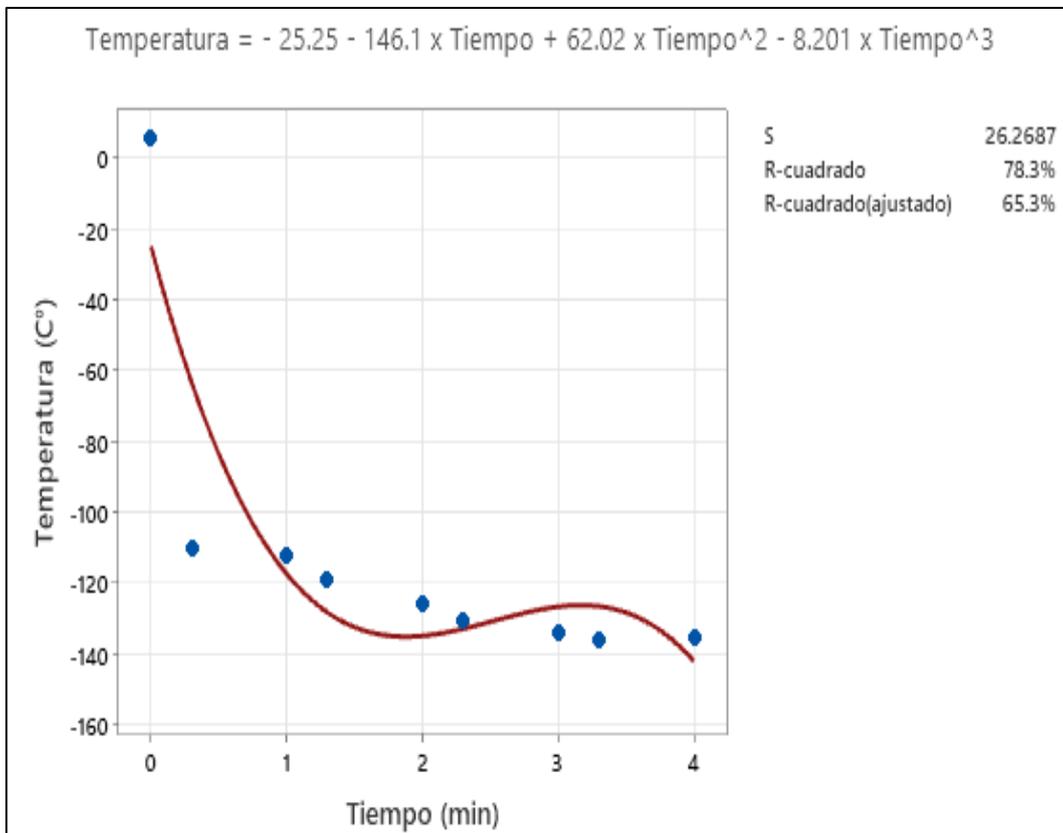
S: representa el error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo, con la finalidad de reducir el error.



**Figura 33.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C5 y R5.

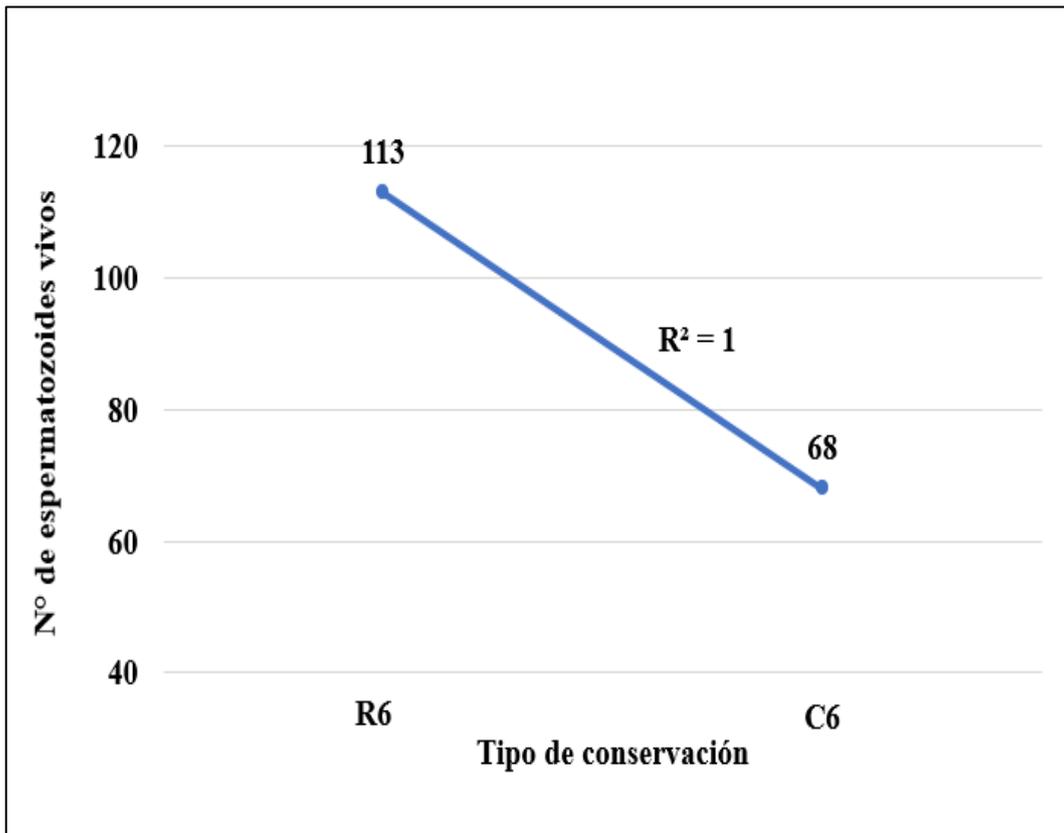
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R5) como criopreservados (C5) del cuy 5 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 34, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 4 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 78,3% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 39,82% (Figura 35) de espermatozoides muertos criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 34.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 6.

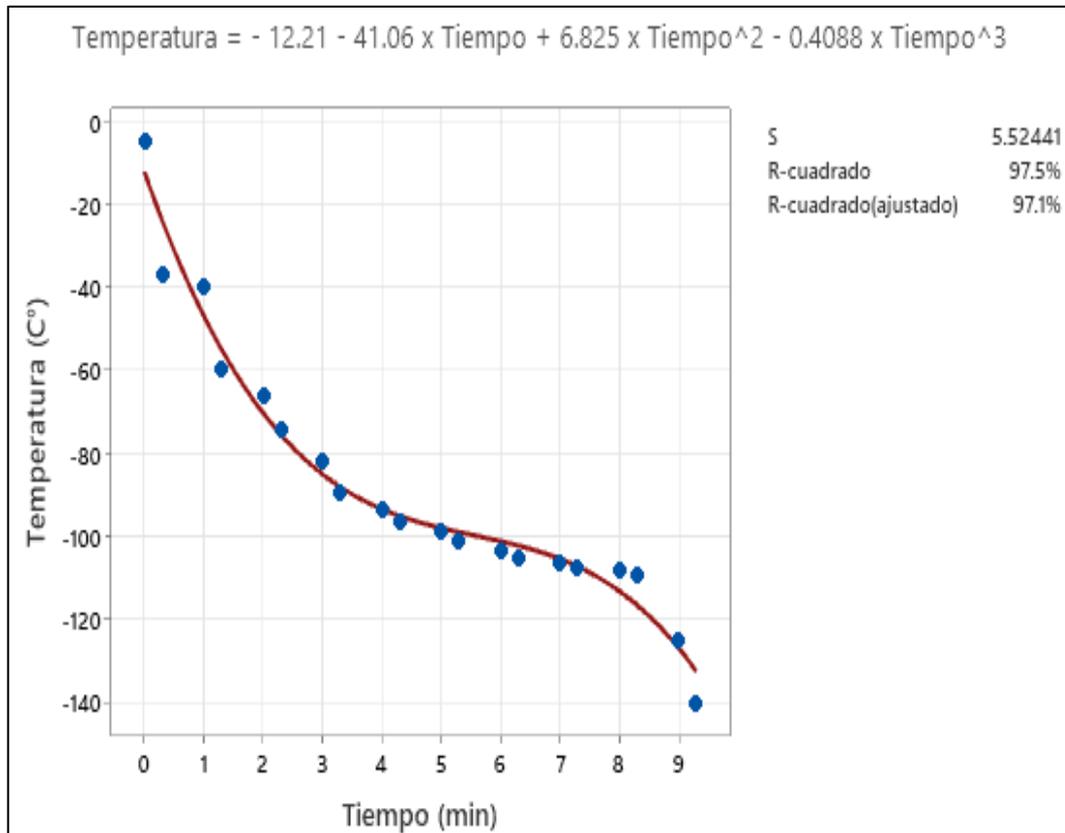
S: representa el error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo, con la finalidad de reducir el error.



**Figura 35.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C6 y R6.

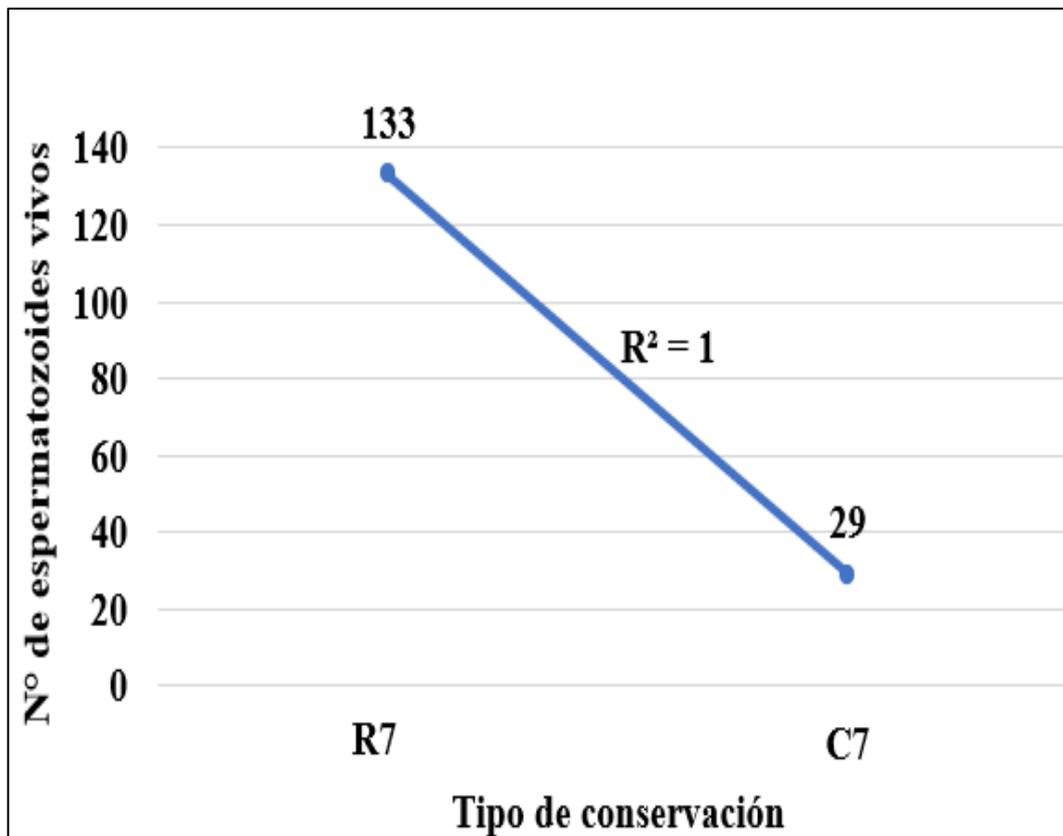
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R6) como criopreservados (C6) del cuy 6 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 36, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 9 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 97,5% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 78,19% (Figura 37) de espermatozoides muertos criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 36.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 7.

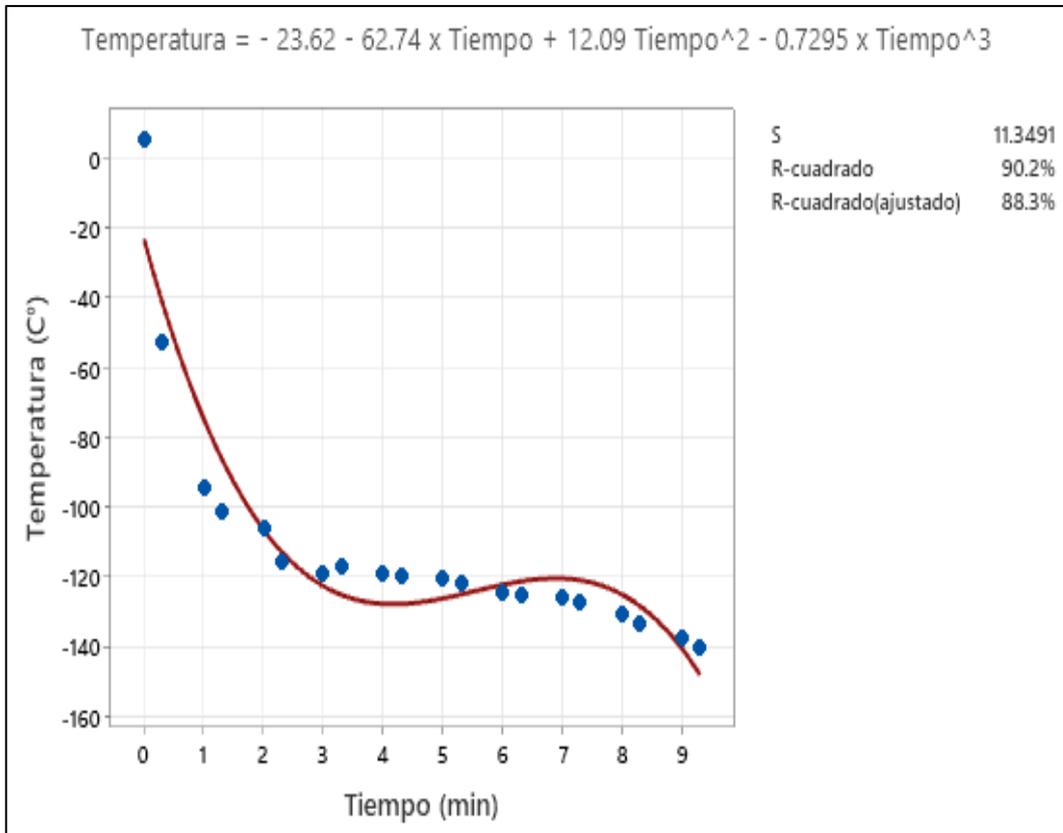
S representa el error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo, con la finalidad de reducir el error.



**Figura 37.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C7 y R7.

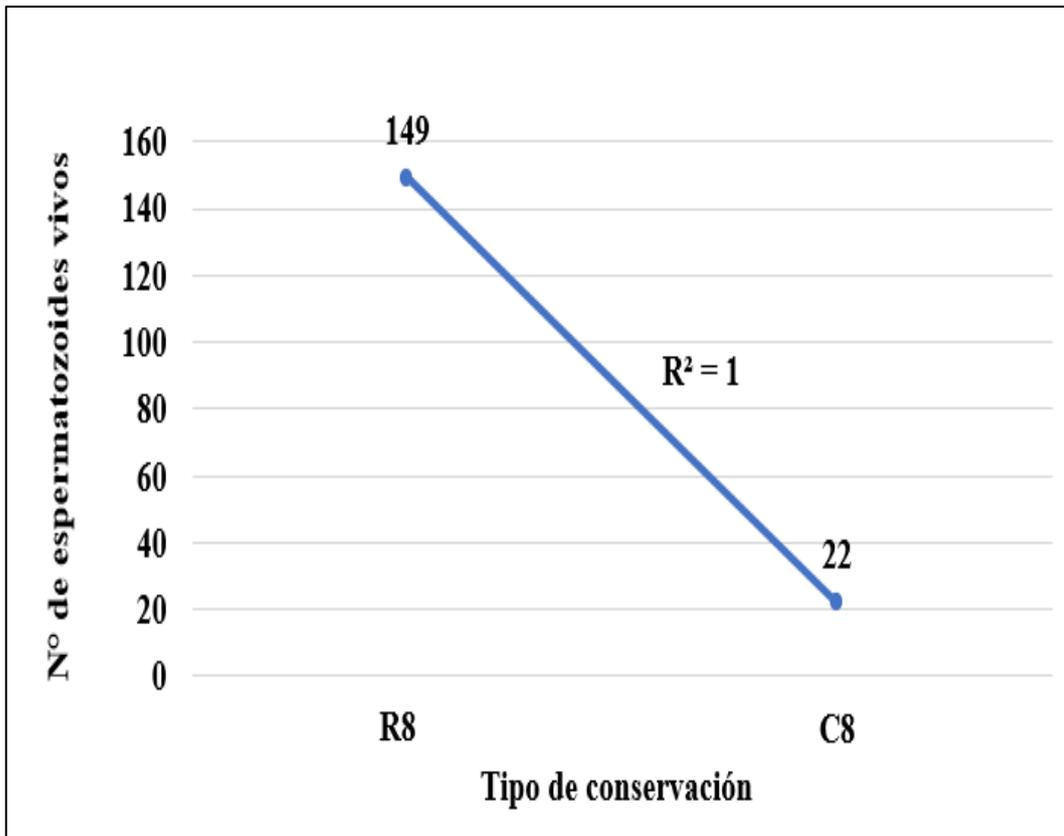
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R7) como criopreservados (C7) del cuy 7 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 38, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 9,5 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 90,2% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 85,23% (Figura 39) de espermatozoides muertos criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 38.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 8.

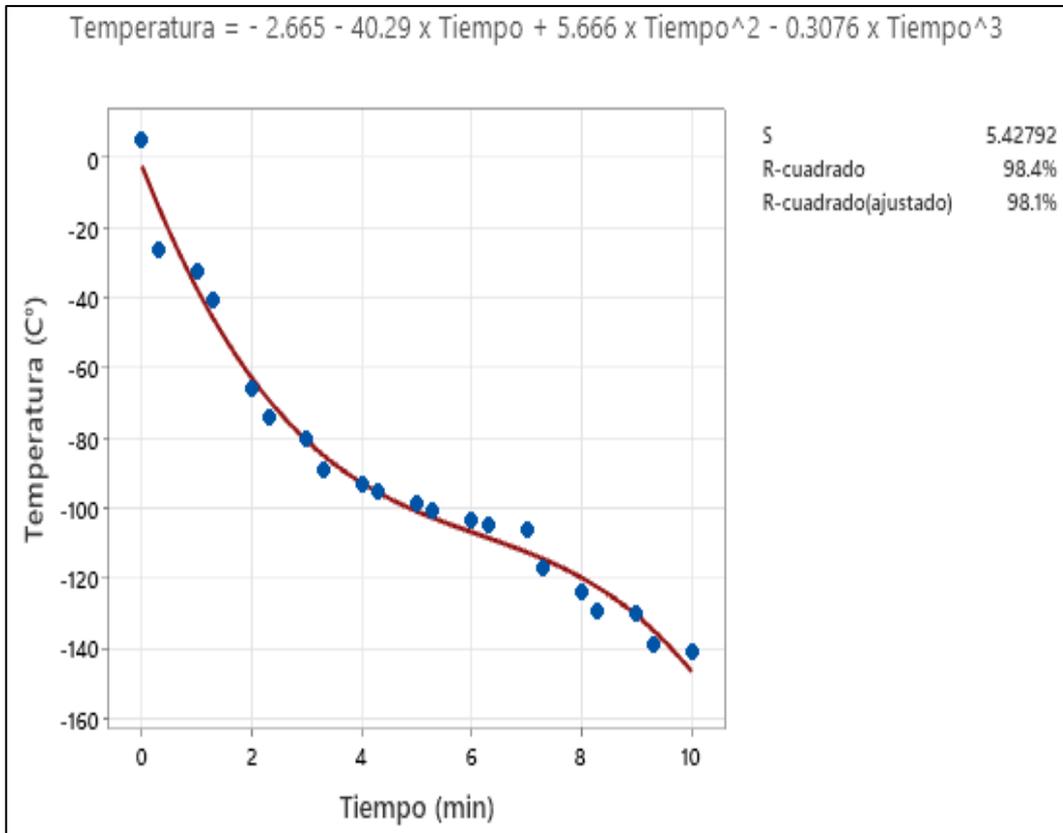
S: representa el error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo, con la finalidad de reducir el error.



**Figura 39.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C8 y R8.

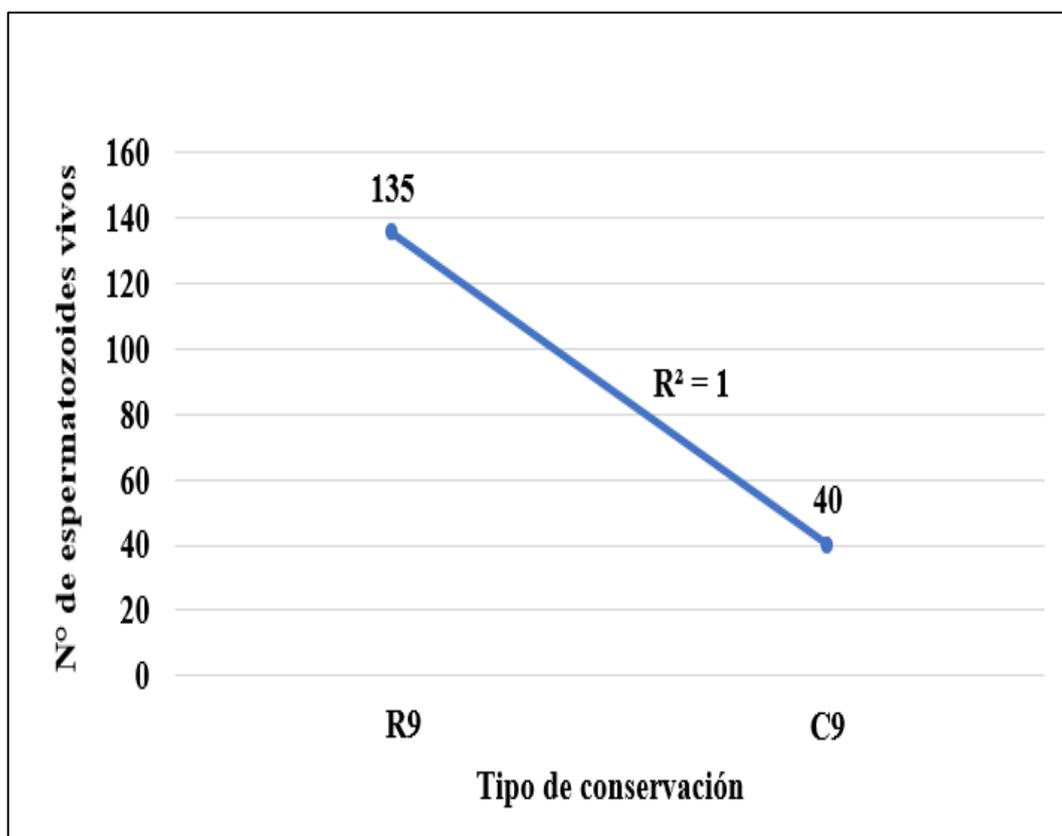
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R8) como criopreservados (C8) del cuy 8 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 40, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 10 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 98,4% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 70,37% (Figura 41) de espermatozoides muertos en criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 40.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 8.

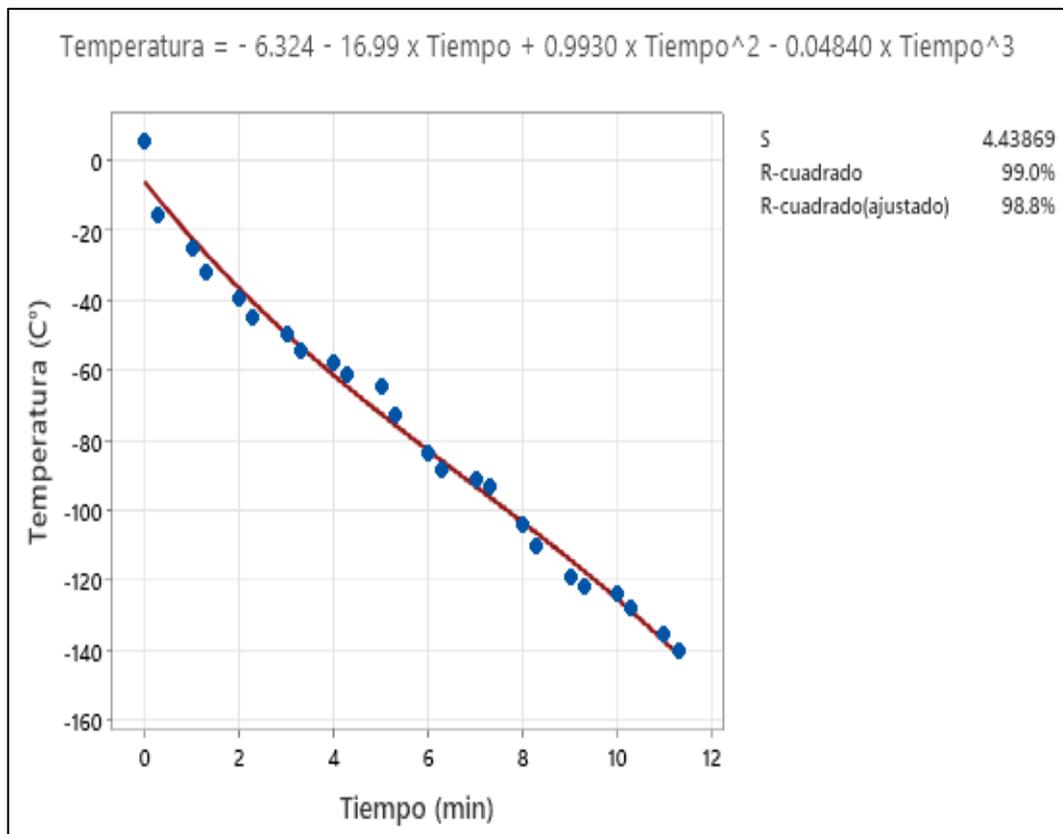
S: representa el error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo, con la finalidad de reducir el error



**Figura 41.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el R9. y C9.

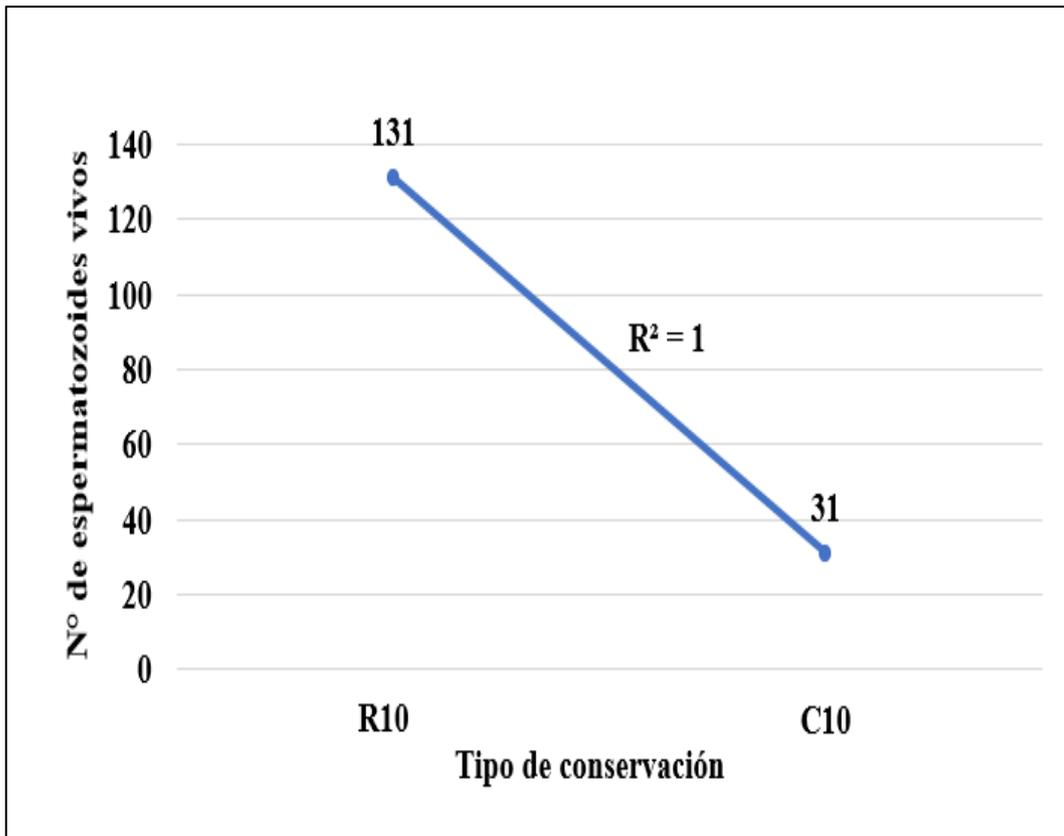
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R9) como criopreservados (C9) del cuy 9 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 42, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 11,5 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 99,0% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 76,33% (Figura 43) de espermatozoides muertos en criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 42.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 10.

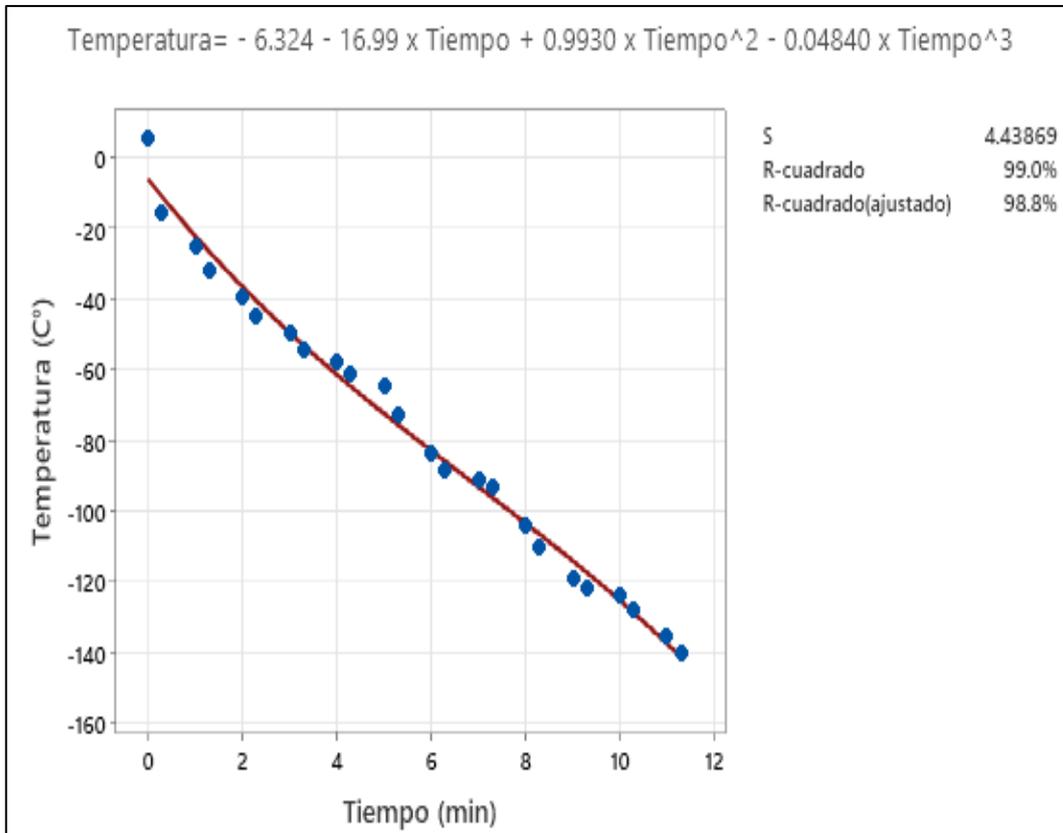
S: representa el error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo, con la finalidad de reducir el error.



**Figura 43.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C10 y R10.

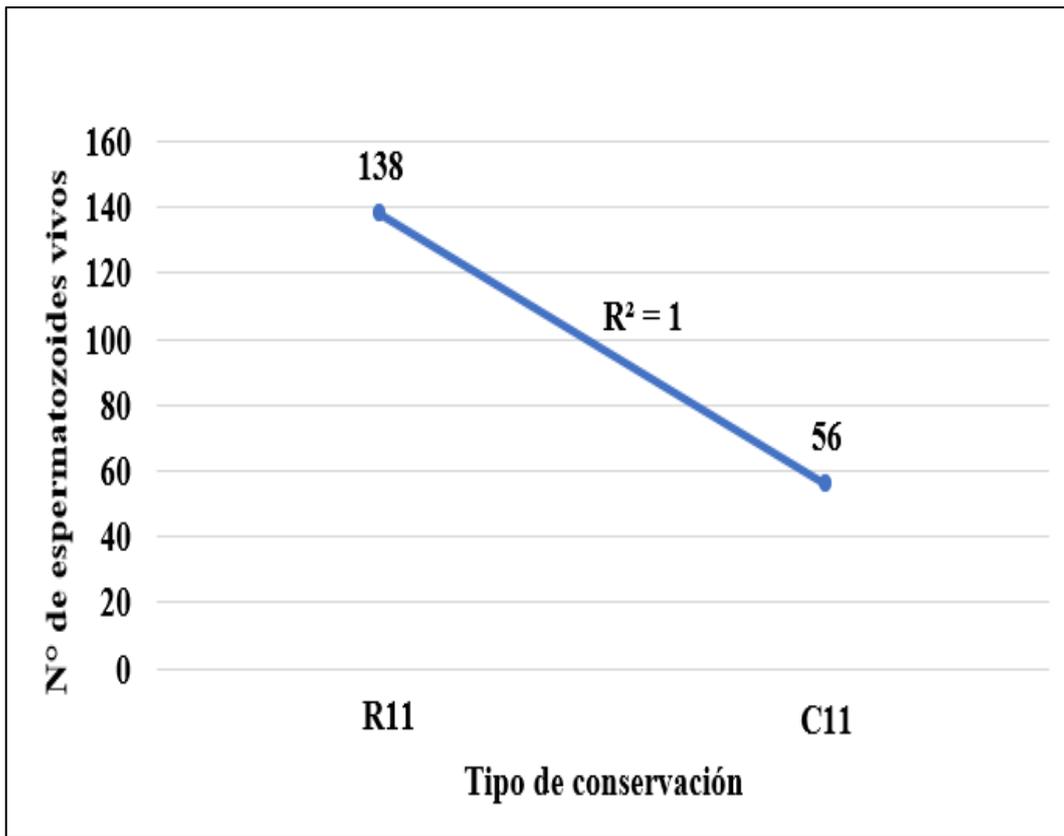
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R10) como criopreservados (C10) del cuy 10 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 44, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 12 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 99,0% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 40,57% (Figura 45) de espermatozoides muertos en criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 44.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la Temperatura y el tiempo en la muestra 11.

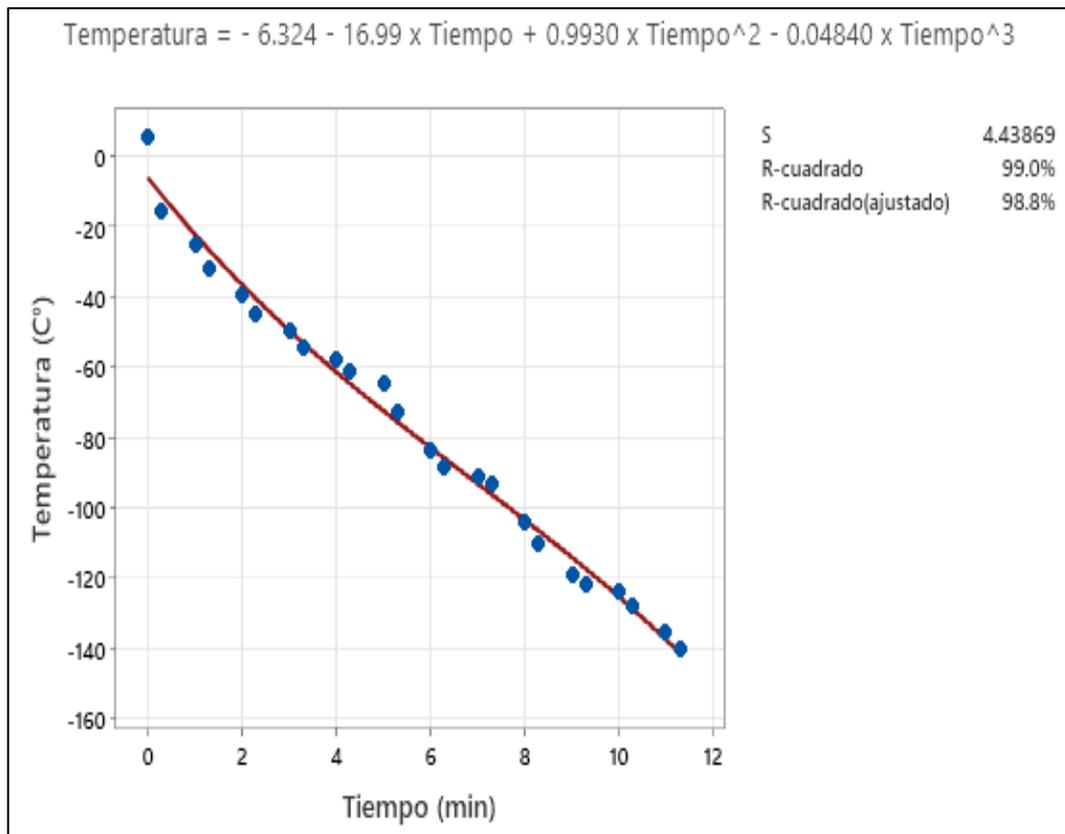
S: representa el error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo, con la finalidad de reducir el error.



**Figura 45.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C11 y R11.

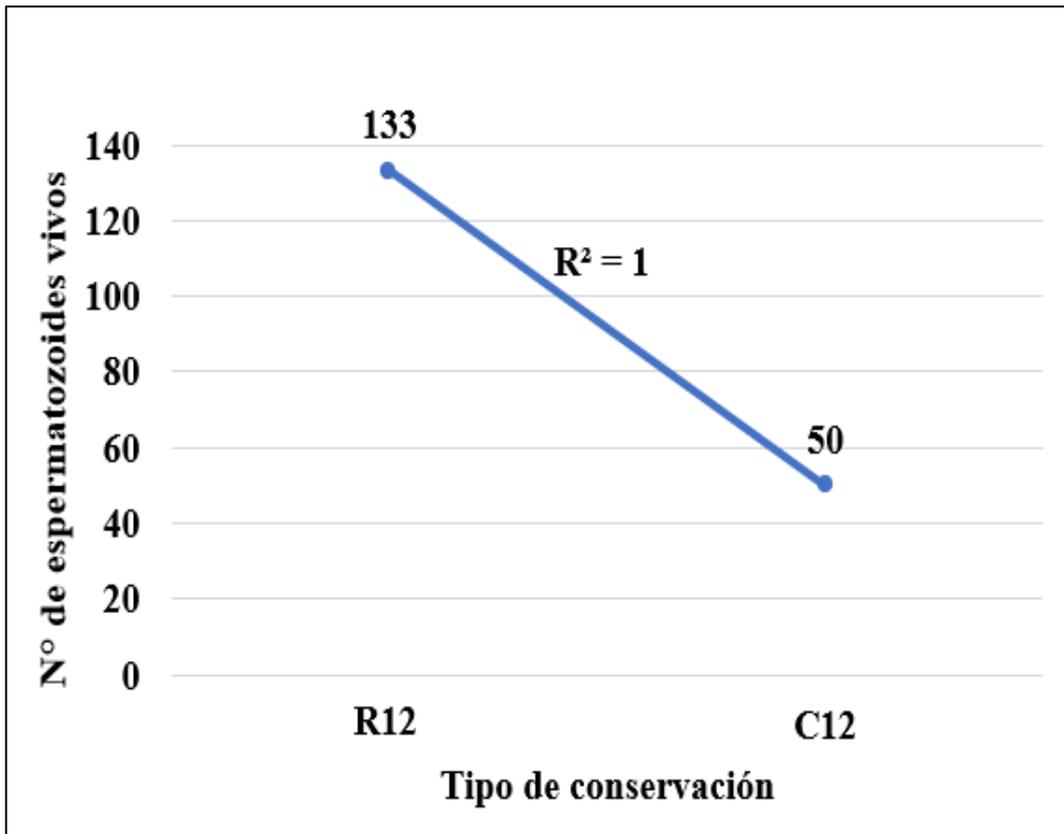
Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R11) como criopreservados (C11) del cuy 11 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

En la Figura 46, muestra la caída de temperatura de 0 a -140°C en 12 minutos siguiendo una tendencia lineal. Con una confianza de 99,0% se puede observar que con este descenso de temperatura se tuvo una pérdida de 62,40% (Figura 47) de espermatozoides muertos en criopreservados comparado a los espermatozoides refrigerados.



**Figura 46.** Gráfica lineal para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y el tiempo en la muestra 12.

S: representa el error de los datos que están dispersos para predecir la gráfica, R- cuadrado es la representación de cómo se ajusta los datos a la gráfica; es decir, que tanto la gráfica puede predecir el movimiento de los datos. R-cuadrado (ajustado) es el ajuste del modelo utilizado para determinar el nivel de regresión entre la temperatura y tiempo, con la finalidad de reducir el error.



**Figura 47.** Gráfico de dispersión para determinar la relación de la temperatura de criopreservación y el número de espermatozoides vivos entre el C12 y R12.

Gráfico de dispersión entre espermatozoides epididimarios vivos tanto refrigerado (R12) como criopreservados (C12) del cuy 12 con un número total de 200 espermatozoides evaluados para ambas formas de conservación espermática,  $R^2$  representa como los datos se ajustan a la gráfica.

## IV. DISCUSIÓN

### 4.1. Caracterización de la calidad espermática de espermatozoides epididimarios

La motilidad espermática es un indicador de vitalidad y ésta a su vez es un reflejo de la integridad de las membranas y el correcto funcionamiento del metabolismo celular, por lo que la motilidad progresiva es de mayor importancia (Quispe 2018). En esta investigación se refrigeró semen de cuy ( $4^{\circ}\text{C}$ ) por 3h, obteniendo valores de motilidad del 40% en promedio de espermatozoides evaluados, resultado similar a lo reportado por Quishpe (2021) quien encontró una motilidad progresiva de 43,48%. Así mismo, Tapia y Tello (2016), quienes obtuvieron una motilidad progresiva de 46% posterior a 2 horas de refrigeración a una temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ ; superiores a lo descrito por Valdivia (2022) en su estudio quien obtuvo 21,68% con motilidad progresiva en semen refrigerado a  $5^{\circ}\text{C}$  por 3 horas; siendo todas las muestras evaluadas procedentes de epidídimo de cuy. Por otro lado, Benavides *et al.* (2020) y Argón (2019) en sus investigaciones obtuvieron motilidades progresivas de 91% y 72,15% de espermatozoides evaluados en semen fresco colectado con el método de electroeyaculación, respectivamente. La diferencia de estos resultados quizás se deba al método de colecta de semen que puede tener un efecto determinante en la supervivencia posterior a la refrigeración y criopreservación de los espermatozoides (Vivanco, 2018).

La criopreservación es un proceso que consiste en la conservación de material genético a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido (Fumus *et al.*, 2014). En este estudio se almacenó muestras durante 3 días, obteniendo valores de 3% de espermatozoides con motilidad progresiva post descongelamiento. Valdivia (2022) en su estudio no encuentra espermatozoides con motilidad progresiva, reportando que el 0,64% de los espermatozoides evaluados presentaron motilidad no progresiva. Estos resultados quizás se deban al tiempo de exposición en el medio equilibrante el cual, tiene un papel fundamental en la criopreservación de semen, ya que penetra a la célula, protege al citoesqueleto, detiene la actividad mitocondrial y protege al espermatozoide del daño estructural ocasionado por los descensos de temperatura (Gomez 2021).

La vitalidad es un parámetro determinante del éxito en el proceso de criopreservación (Argon 2019). En la presente investigación, se obtuvieron valores de vitalidad post-refrigerado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 3h del 67% de los espermatozoides evaluados, valor similar al estudio de Valdivia (2022) el cual reporta un 64,24% de espermatozoides post-

refrigeración por 3h. Por el contrario, Loor (2015) y Cabeza (2019) reportan valores superiores de 86,7% y 72,65%, respectivamente; para espermatozoides post-refrigerados a 5°C por 3h. Tapia y Tello (2016) reportaron valores inferiores a 35,90% para espermatozoides refrigerados a 5°C por 2h. La vitalidad de espermatozoides epididimarios post- descongelamiento en este estudio fue de 17,25% similar a lo reportado por Quishpe (2021) quien halló 15,08% y 14,42% de vitalidad bajo dos curvas de congelación; la reducción considerable que se muestra es producto de la criopreservación relacionado con el tiempo de criopreservación y los rangos de temperatura (Ferrari, 2017).

En integridad acrosomal post- refrigeración del total de espermatozoides evaluados el 50,4%; 30,4% y 18,8% lograron una tinción fuerte (CB++) débil (CB+) y sin capuchón (CB-), respectivamente. Por el contrario, Valdivia (2022) reportó distintos valores para tinción fuerte (CB++) (84,05%), tinción débil (CB+) (7,28%) y sin capuchón (CB-) (8,67). Distinto a lo mencionado, Quispe (2022) reporta para tinción fuerte (CB++) y débil (CB+) valores de 66,43% y 21,38%, respectivamente. Por otra parte, Argón (2019) reportó para una tinción fuerte (CB++) de 90,24% para espermatozoides obtenidos por el método de electroeyaculación. En la presente investigación, el proceso de criopreservación afectó la integridad acrosomal, observándose la tinción fuerte (CB++), tinción débil (CB+) y sin capuchón (CB-) 13,8%, 45,6% y 40,3%, respectivamente, de igual forma Valdivia (2022), reporta para CB++, fuerte CB+ débil y sin capuchón (CB-) 5,25%, 6,07% y 88,66%, respectivamente; pues la integridad acrosomal es un aspecto crucial en la funcionalidad del espermatozoide y su capacidad para fecundar al óvulo (Chauca, 2022).

En este estudio se observó los grados de funcionalidad de la membrana mediante el test hipoosmótico (HOST+) post- refrigerado, se observó que el 34,5% no reaccionaron al test hipoosmótico, el 20% reacción débil (b), el 19% reacción débil (c), el 16,5% reacción regular (d) y el 10% reacción fuerte (e). Por su lado Valdivia (2022), Tapia y Tello (2016) y Quispe (2022) reportan 74,97%, 18% y 60,49%; respectivamente de reacción fuerte al test hipoosmótico en espermatozoides epididimarios. Por su lado Argón (2019) reporta 70,22% de reacción fuerte y 26,81% con reacción moderada, valores superiores al nuestro debido al tipo de colecta empleado (electroeyaculación) y al tiempo de refrigeración (5°C).

En este trabajo se obtuvo la funcionalidad de la membrana de espermatozoides post-criopreservado de 64,5%, 13%, 12%, 8% y 3% de sin reacción (a), reacción débil (b),

reacción débil (c), reacción regular (d) y reacción fuerte (e); respectivamente. También, Valdivia (2022), en su trabajo reporto 6,01% de funcionalidad de la membrana de reacción fuerte (e). Los valores de HOST+ después de la criopreservación se redujo considerablemente con respecto a los valores refrigerado debido al daño de la integridad de la membrana espermática por las bajas temperaturas de la criopreservación (-196 °C) (Almeida, 2016). Es por ello, que importancia de la membrana espermática es una capa que rodea al espermatozoide y desempeña un papel crucial en la protección de su contenido, manteniendo la motilidad y reconocimiento del óvulo; por ello, la integridad funcional de la misma es de suma importancia para permitir la correcta fecundación del óvulo (Lavara, 2017).

Valdivia (2022) señala que la cromatina en la calidad espermática se refiere al estado de la compactación del ADN en el núcleo de los espermatozoides. En el presente estudio post- refrigerado se obtuvo 85,3% de espermatozoides evaluados con cromatina condensada o compacta y un 14,6% de espermatozoides de cromatina descondensada post- refrigeración. En la criopreservación sorprendentemente, se obtuvo 82,6 % de cromatina condensada y 17,3% de cromatina descondensada de espermatozoides epididimarios evaluados, lo que indica que los rangos de temperatura no afectan en gran medida a la cromatina que está compuesta por el ADN y las proteínas asociadas llamadas histonas (Ferrian, 2017). La compactación adecuada de la cromatina es esencial para preservar la integridad del ADN y asegurar la fertilidad del macho (cuy). Los espermatozoides con una condensación adecuada de la cromatina se consideran de mejor calidad, ya que esto indica una menor probabilidad de daños en el ADN y una mayor capacidad fecundante (Ferrian, 2017).

#### **4.2. Correlación de la morfometría de los espermatozoides epididimarios**

En el presente estudio durante la refrigeración observamos que ancho del núcleo incrementa con el área y perímetro del núcleo en 0,48\*\*\*\* y 0,43\*\*\*\*, respectivamente, por otro lado, también se observó que el área del núcleo incrementa con el largo de la cola en 0,27\*\*\*\*, perímetro del núcleo incrementa con largo de la cola en 0,28\*\*\*\*, el largo de la pieza intermedia con ancho de la pieza intermedia en 0,36\*\*\*\*. Lo resaltante en la correlación de espermatozoides refrigerados son las correlaciones negativas entre el largo de la pieza intermedia incrementa en un 0,23\*\*\*\* y el ancho del núcleo se reduce en un -0,23\*\*\*\*. Además, con el largo de la cola incrementa y se reduce el largo y ancho de la pieza intermedia en -0,57\*\*\*\* y -

0,29\*\*\*\*, respectivamente. Las partes afectadas del espermatozoide quizás se deban a muchos factores, siendo una de ellas la velocidad de refrigeración, el tiempo de refrigeración y el modo de evaluación, produciendo deshidratación en la célula espermática.

En esta investigación durante la criopreservación observamos que el largo de la cabeza incrementa con área ( $\mu\text{m}^2$ ) del acrosoma (0,98\*\*\*\*) así mismo, el largo de la pieza intermedia con ancho del núcleo con una correlación (0,21\*\*\*), sumado a ellos el ancho de la pieza intermedia con ancho del núcleo (W) (0,23\*\*\*\*); seguidamente el largo de la cola con área ( $\mu\text{m}^2$ ) de acrosoma, perímetro del acrosoma y largo de cabeza 0,24\*\*\*\*, 0,24\*\*\*\*, 0,2\*\*\*\*, respectivamente, al mismo tiempo, con el largo de la pieza intermedia con una correlación negativa (-0,52\*\*\*\* ; significativamente). Lo interesante en esta correlación negativa de semen criopreservado es entre el largo de la cola que incrementa en un 0,52\*\*\*\* y el largo de la pieza intermedia que se reduce en -0,52\*\*\*\*, afectando de manera significativa a al largo de la pieza intermedia.

Cuando se observó el comportamiento entre las variables evaluadas de los espermatozoides refrigerados con los criopreservados observamos que existe una fuerte asociación positiva entre largo del núcleo con área del núcleo con largo del núcleo en 0,15\*\*, perímetro del núcleo con largo del núcleo en 0,13\*, área del acrosoma con perímetro del acrosoma y largo de la cabeza en 0,11\* y 0,13\*; respectivamente. Largo de la pieza intermedia con largo del núcleo y largo de la pieza intermedia en 0,17\*\* y 0,19\*\*\*\*, respectivamente; además, el ancho de la pieza intermedia con el ancho del núcleo, largo de la pieza intermedia en 0,15\*\* y 0,27\*\*\*\*, respectivamente. Asimismo, podemos observar que existe una correlación negativa entre espermatozoides refrigerados con espermatozoides criopreservados entre el perímetro del acrosoma con ancho del núcleo y área del núcleo en -0,13\* y -0,11\*, respectivamente; largo de la cabeza con el largo de la cola en -0,14\*, el largo de la pieza intermedia con área de acrosoma, perímetro del acrosoma y largo de cabeza en -0,12\*, -0,12\* y -0,13\*, respectivamente. el ancho de la pieza intermedia con área y perímetro del acrosoma, largo de cabeza y largo de cola en -0,12\*, -0,12\*, -0,13\* y -0,19\*\*\*\*; respectivamente, largo de la cola con el largo de la pieza intermedia en -0,16\*\*. Sorprendentemente, podemos observar que ya sea de forma positiva o negativa el efecto que ejerce sobre las características morfométricas de espermatozoides epididimarios refrigerados afectaran a las características morfométricas de espermatozoides criopreservados; no encontramos mayores reportes entre ellos, pero

consideramos que la refrigeración (equilibrado) es de suma importancia para la crioconservación.

#### **4.3. Estandarización de la criopreservación de semen epididimario de cuy**

La estandarización de protocolos para la criopreservación es esencial para la conservación de la diversidad genética, y facilita la investigación y el intercambio de material genético, permite la reproducción asistida y asegurar la supervivencia de especies en peligro de extinción (Chauca, 2022). En este estudio se evaluaron diferentes rangos y tiempos de criopreservación, lamentablemente no se pudieron hacer repetición ya que no se contaba con equipamiento para controlar las curvas de temperatura (Ferrian, 2017). En el presente estudio, sobresalieron los cuyes 9, 10, 11 y 12 con las características viables de espermatozoides epididimarios mejores al resto de los animales evaluados en diferentes tiempos y rangos de temperatura. En el cuy 9 la temperatura llegó a los  $-140^{\circ}\text{C}$  en 10 minutos, en el cuy 10 la temperatura de  $-140^{\circ}\text{C}$  llegó en 11,5 minutos y en el cuy 11 y 12 se llegó a  $-140^{\circ}\text{C}$  en 12 minutos.

Podemos observar que para estas muestras los mejores resultados se obtuvieron cuando se alcanzó desde  $5^{\circ}\text{C}$  hasta  $-140^{\circ}\text{C}$  en 11.4 minutos aproximadamente, estas características viables de espermatozoides se podrían mejorar quizás prolongando unos minutos más. Quishpe (2021) evaluó dos curvas de criopreservación en la curva 1 consideró que a partir de los  $5^{\circ}\text{C}$  tenía llegar a  $-5^{\circ}\text{C}$  en 10 minutos, y en 5 minutos más llegar los  $-140^{\circ}\text{C}$  y en la segunda curva fue  $5^{\circ}\text{C}$  tendría que bajar a  $-5^{\circ}\text{C}$  en 5 minutos y a  $-140^{\circ}\text{C}$  10 minutos obteniendo valores similares a los nuestros en mortalidad espermática post crioconservado fue (84.92% y 85.58%) y una vitalidad (15% y 14.42%) para la curva 1 y 2, respectivamente. Los valores obtenidos en este estudio se deben a que se trabajó con espermatozoides epididimarios y a que en la actualidad no existe aún un protocolo establecido para su crioconservación.

## V. CONCLUSIONES

- Se obtuvo mejores resultados de motilidad, vitalidad, integridad acrosomal, funcionalidad de la membrana y cromatina cuando se realizó un equilibrio por 6h, y un congelamiento no mayor en un intervalo de 11,4 minutos.
- El tiempo de refrigeración de muestras en medio equilibrante, y el intervalo de tiempo hasta llegar a los  $-196^{\circ}\text{C}$  tienen influencia directa en la motilidad, vitalidad, integridad acrosomal, funcionalidad de la membrana y cromatina de los espermatozoides criopreservados de cuy.
- Existe correlación entre las diferentes formas de conservación de espermatozoides refrigerados, criopreservados y ambas formas de conservación, lo que indica relación entre las características morfométricas distantes de los espermatozoides antes y después de la criopreservación. Estos hallazgos podrían ser útiles para evaluar la calidad y la viabilidad de los espermatozoides criopreservados, ya que cambios en la morfología pueden afectar su capacidad fecundante.
- Para las características de motilidad, vitalidad, integridad acrosomal, funcionalidad de la membrana y cromatina en la muestra 11 se obtuvo mejores resultados para las características evaluadas con un tiempo de refrigeración de 3horas, tiempo de equilibrado de 6h y una criopreservación de  $-140^{\circ}\text{C}$  en 11.5 minutos.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Es recomendable determinar el tiempo óptimo de descongelamiento de pajillas de semen de cuy criopreservado.
- La utilización de plasma seminal podría tener un efecto en la supervivencia de espermatozoides epididimarios criopreservados.
- Es necesario realizar pruebas con diferentes métodos de criopreservación con la finalidad de determinar si existe diferencia significativa en los valores de vitalidad, motilidad, integridad acrosomal, funcionalidad de la membrana y cromatina.
- Ensayar otros medios equilibrantes y evaluar su efecto en la supervivencia de los espermatozoides epididimarios.
- Desarrollar una técnica de colecta de semen por electroeyaculación.
- Dado que la cromatina no sufrió ningún cambio se sugiere probar otras técnicas de fecundación como el ICSI para evaluar su capacidad fecundante.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A. (2016). *Influencia de las espículas peneanas del cobayo sobre el comportamiento sexual, valoración espermática y fertilidad del macho* [tesis de maestría, Universidad de Cuenca]. Repositorio institucional - Universidad de Cuenca, Cuenca. Obtenido de <https://core.ac.uk/reader/38671130>
- Argon Cruz, 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, Cusco.
- Benavides, F., Sutovsky, P., López, V., Kennedy, C., & Echevarría, L. (2020). Parámetros del semen de cobayas fértiles (*Cavia porcellus*) recolectados mediante electroeyaculación transrectal. PMC PubMed Central. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7278442/#B26-animals1000767>
- Cabeza Quenta, U. (2019). *Caracterización morfológica y morfométrica del espermatozoide de cuy (cavia porcellus) colectado por electroeyaculación*. Tesis de título de Ingeniero Zootecnista, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco, Cuzco.
- Chauca de Zaldivar, L. (2022). *Investigaciones en cuyes*. Lima. Obtenido de [https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/304/1/Investigaciones\\_en\\_cuyes.pdf](https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/304/1/Investigaciones_en_cuyes.pdf)
- Ferrián, S. (2017). *Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post-descongelación* (Tesis de maestría). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia.
- Fumus, F. G., Giménez, M. L., 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.
- García Vásquez, F. A., Ramos, S., Macías García, B., & Álvarez Rodríguez, M. (2018). Evaluation of Effect of the Semen Extender and the Freezing Process on Post-thaw Sperm Quality of C57BL/6J Mice. *Reproductive Sciences*, 25(1), 111-1256.
- García, J., Martínez, E., & López, I. (2020). Concentración de semen de conejos post descongelamiento. *Revista de Reproducción Animal*, 45-56.

- Gema Gianfrancesco, P. S. (2022). *Efecto de la presencia de Ficoll-70 o Dextrano-70 en el medio de congelación de semen de conejo en su calidad y capacidad fecundante*. Tesis de el título en biotecnología, Universidad Politecnica de valencia, València. Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/188370/Gianfrancesco%20-%20Efecto%20de%20la%20presencia%20de%20Ficoll-70%20o%20dextrano-70%20en%20el%20medio%20de%20congelacion%20de%20s....pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Gómez, A., Rodríguez, D., & Fernández, J. (2019). Condensación y descondensación de la cromatina en espermatozoides post descongelamiento de conejos. *Revista de Biología Integrativa*, 12(2), 58-63.
- Gomez, V. (2021). Calidad seminal de espermatozoides criopreservados de conejo incubados con plasma seminal. CONICET. Obtenido de [https://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=buscar&id=24555&congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=1318243](https://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=buscar&id=24555&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=1318243)
- Hito Cabana , K. (2018). *Evaluación del efecto de la exposicion crónica in vivo de campos magneticos de baja frecuencia (CM-ELF) sobre la actividad enzimatica del acrosina en espermtozoides en ratones (Mus musculus)*. Tesis para de ingeniera biotecnologa, Arequipa. Obtenido de <https://repositorio.ucsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12920/8388/42.0200.IB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- IBM Corp. (2020). IBM SPSS Statistics for Windows (27.0). Obtenido de <https://www.ibm.com/es-es/products/spss-statistics>
- Johnson, B. (2015). Effect of cryopreservation on rabbit semen quality. *Theriogenology*, 379-384.
- Kim, K. S., Foster, J. A., & Gerton, G. L. (2001). Differential release of guinea pig sperm acrosomal components during exocytosis. *Biology of Reproduction*, 52(4), 45-49.
- Lavara, R. (2017). *Parametros genéticos del semen descongelado de conejos*. Tesis de título profesional de medico veterinario y zootecnista, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. Obtenido de [https://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/AIDA%202009/Lavara\\_et\\_al\\_.pdf](https://acteon.webs.upv.es/CONGRESOS/AIDA%202009/Lavara_et_al_.pdf)
- Loor Cadeño, A. I. (2015). *Caracterización morfológica del espermatozoide del cobayo (Cavia porcellus) en el cantón Latacunga*. Tesis de título medico veterinario y

- zootecnista, Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga - Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2836/1/T-UTC-00360.pdf>
- Minitab. (2020). Minitab Statistical Software. Obtenido de <https://www.minitab.com/es-mx/products/minitab/>
- Mise Chango, M. N. (2020). Evaluación de la crioconservación del semen de Cobayo (*Cavia Porcellus*). Universidad Técnica de Cotopaxi. . Latacunga: Latacunga /UTC/2014.
- Montenegro Troya, A. C. (2022). *Evaluación de tres crioprotectores para la crioconservación de semen de cuy (Cavia porcellus) extraído de la cola del epidídimo en el Centro Experimental Uyumbicho*. Tesis de título médico veterinario y zootecnista , Universidad Central del Ecuador, Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/26977/1/UCE-FMVZ-SUB-MONTENEGRO%20ANDREA.pdf>
- Orrego Vásquez, F. J. (2022). Características espermáticas y testiculares en dos edades y tres razas de cuyes diferentes. Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima. Obtenido de <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/5644/orrego->
- Pérez Rosales, M. M. (2019). *Efecto de la criopreservación en la integridad acrosomal de los espermatozoides epididimarios de alpaca (Vicugna pacos) evaluado mediante citometría de flujo*. Tesis de título médico veterinario , Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Pérez, C., Martínez, M., & García, E. (2018). Porcentaje de espermatozoides con cromatina condensada antes y después del proceso de congelación en conejos. *Journal of Reproduction Research*, 15(2), 20-25.
- Ponce de León Collado , C. (2014). *Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática en ratón*. Tesis de título biología, Universidad de Jaen. Obtenido de [https://crea.ujaen.es/bitstream/10953.1/540/1/TFG\\_PoncedeLe%c3%b3nCollado%2cCandelaria.pdf](https://crea.ujaen.es/bitstream/10953.1/540/1/TFG_PoncedeLe%c3%b3nCollado%2cCandelaria.pdf)
- Quintero, A. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. Scielo. Obtenido de [ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592009000400010](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000400010)
- Quishpe Andrade, J. A. (2021). *Evaluación de dos curvas de congelación programables para la crioconservación de semen de cuy (Cavia porcellus) en el Centro Experimental Uyumbicho*. Tesis de título médico veterinario y zootecnista,

- Universidad Central del Ecuador, Quito. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25416/1/UCE-FMVZ-SUB-QUISHPE%20JONATHAN.pdf>
- Quispe Ccasa, H. A. (2022). *La radiacion solar en el desarrollo somático, calidad seminal y fertilidad de Cavia porcellus L.* (Tesis doctoral). Chachapoyas. Obtenido de <https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/2914/Quispe%20Ccasa%20Hurley%20Abel.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Quispe Urteaga, W. (2018). *Características espermáticas y calidad del semen de dos raza de cuyes (Cavia porcellus) en el valle de Cajamarca* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Cajamarca Escuela de Posgrado, Cajamarca. Obtenido de <https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/2132/CARACTER%20C3%8DSTICAS%20ESPERM%20C3%81TICAS%20Y%20CALIDAD%20DE%20SEMEN%20DE%20DOS%20RAZAS%20DE%20CUYES%20%28Cavia>
- RStudio Team. (2020). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC. Obtenido de <https://www.rstudio.com/categories/rstudio-ide/>
- Smith, A. (2010). Evaluation of post-thaw semen quality in rabbits. *Journal of Animal Science*, 88, 1789-1794.
- Tapia Pensantez, D. A., & Tello Larriva, D. J. (2016). *Evaluación cuali-cunatitativa de espermatozoides de la cola del epididimo de cuyes (Cavia porcellus) criollos y mejorados en dos edades reproductivas*. Tesis de título Medico Veterinario y Zootecnista, Universidad de Cuenca, Cuenca. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25404/1/TESIS%20Tapia-Tello.pdf>
- Valdivia Gallardo., J. C. (2022). *Comparacion entre dilutor comercial y dilutor natural para la criopreservacion de espermatozoides epidimarios de Cavia porcellus L.* Tesis de título Ingeniero Zootecnista, Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas , Chachapoyas.
- Vivanco Mackie1, H. W. (2018). Aplicacion de biotecnologias reproductivas en el Perú, su impacto en el desarrollo ganadero, retos por enfrentar. SPERMOVA. Obtenido de [http://spermova.pe/site2/files/Revistas/Rev.%208%20vol.%202%20/09-Vivanco\\_2018a.pdf](http://spermova.pe/site2/files/Revistas/Rev.%208%20vol.%202%20/09-Vivanco_2018a.pdf)

## ANEXOS



**Anexo 1.** Extirpación de testículos.



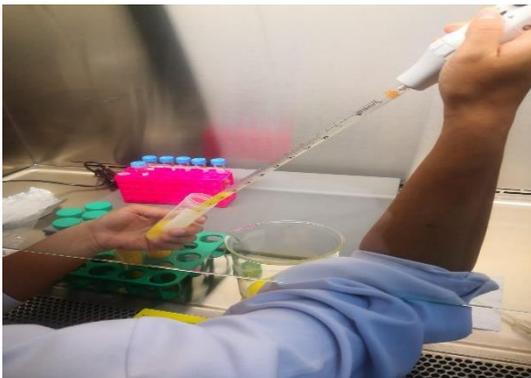
**Anexo 2.** Testículos sin adherencias.



**Anexo 3.** Técnica de Slicing.



**Anexo 4.** Semen de cuy.



**Anexo 5.** Preparación del crioprotector.



**Anexo 6.** Semen en refrigeración.



**Anexo 7.** Criopreservación de pajillas de semen de cuy.



**Anexo 8.** Pajillas a  $-196^{\circ}\text{C}$ .



**Anexo 9.** Tanque criogénico



**Anexo 10.** Pajillas criopreservadas.



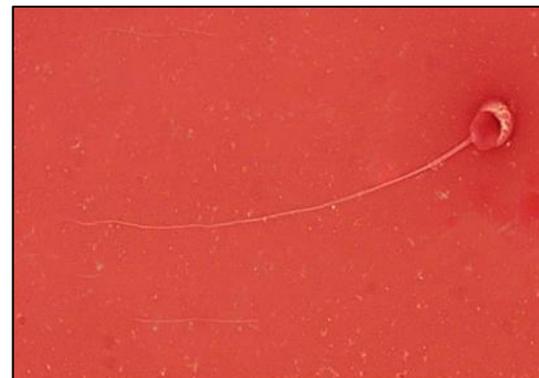
**Anexo 11.** Pajillas en descongelación.



**Anexo 12.** Muestras en incubación



**Anexo 13.** Tinciones de las características microscópicas.



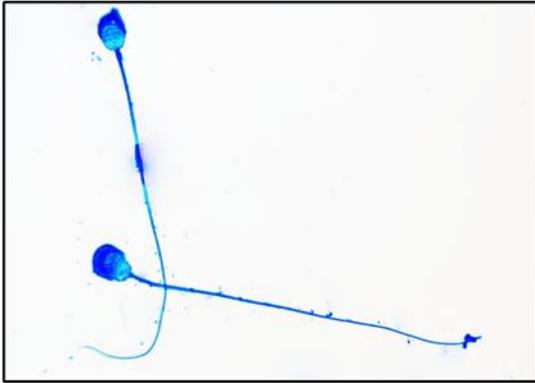
**Anexo 14.** vitalidad (vivos).



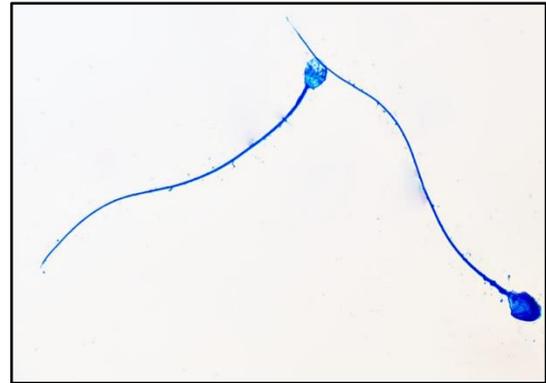
**Anexo 15.** Vitalidad (muertos).



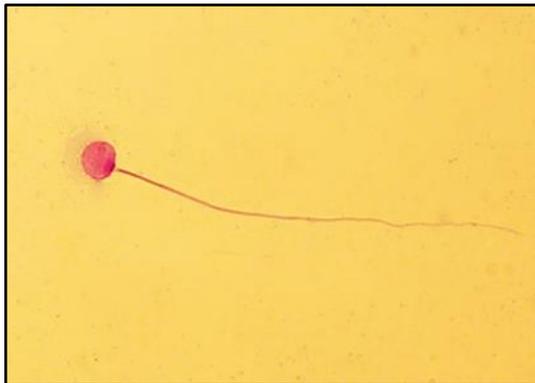
**Anexo 16.** Muestra de integridad acrosomal (CB++).



**Anexo 17.** Muestra de integridad acrosomal (CB+).



**Anexo 18.** Muestra de integridad acrosomal (CB-).



**Anexo 19.** Muestra de morfología



**Anexo 20.** Muestra de funcionalidad de la membrana sin reacción (a)



**Anexo 21.** Muestra de funcionalidad de la membrana reacción débil (b)



**Anexo 22.** Muestra de funcionalidad de la membrana reacción débil (c)



**Anexo 23.** Muestra de funcionalidad de la membrana reacción regular (d)



**Anexo 24.** Muestra de funcionalidad de la membrana reacción fuerte (e)



**Anexo 25.** Muestra de cromatina condensada.



**Anexo 25.** Muestra de cromatina descondensada.

Fórmula:

- A: Volumen
- B: Concentración
- C: Motilidad
- D: N° de espermatozoides
- $D = A \times B$
- E: N° de espermatozoides totales móviles
- $E = D \times C$
- F: N° de espermatozoides por pajuela.
- $F = 15 \times 10^6 \text{ sptz}$
- G: N° de pajuelas
- $G = E / F$
- H: Volumen total necesario (diluyente + semen)
- $H = G \times \text{vol. pajuela}$
- I: volumen del diluyente
- $I = H - A$

**Anexo 26.** Fórmula para el volumen del crioprotector.

**Anexo 27.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 1.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	22411.1	7470.36	521.35	0.000
Error	18	257.9	14.33		
Total	21	22669.0			

**Anexo 28.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 2.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	20541.8	6847.26	648.12	0.000
Error	4	42.3	10.56		
Total	7	20584.0			

**Anexo 29.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 3.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	2	17448.8	8724.40	301.36	0.000
Error	5	144.8	28.95		
Total	7	17593.6			

**Anexo 30.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 4.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	11863.3	3954.42	7.15	0.267
Error	1	552.9	552.93		
Total	4	12416.2			

**Anexo 31.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 5.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	10479.8	3493.25	22.06	0.006
Error	4	633.4	158.36		
Total	7	11113.2			

**Anexo 32.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 6.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	12450.0	4150.00	6.01	0.041
Error	5	3450.2	690.04		
Total	8	15900.2			

**Anexo 33.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 7.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	19397.1	6465.71	211.86	0.000
Error	16	488.3	30.52		
Total	19	19885.4			

**Anexo 34.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 8.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	18918.3	6306.11	48.96	0.000
Error	16	2060.8	128.80		
Total	19	20979.2			

**Anexo 35.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 9.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	30157.5	10052.5	341.20	0.000
Error	17	500.9	29.5		
Total	20	30658.3			

**Anexo 36.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 10.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	37643.6	12547.9	636.88	0.000
Error	20	394.0	19.7		
Total	23	38037.6			

**Anexo 37.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 11.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	37643.6	12547.9	636.88	0.000
Error	20	394.0	19.7		
Total	23	38037.6			

**Anexo 38.** Análisis de varianza para determinar el nivel de regresión entre el tiempo (min) y la temperatura (°C) en la muestra 12.

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	3	37643.6	12547.9	636.88	0.000
Error	20	394.0	19.7		
Total	23	38037.6			