



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Unidad de Posgrado

**Efecto del extracto de maca negra atomizada en los  
medios de criopreservación sobre los parámetros  
espermáticos postdescongelamiento en  
espermatozoides de alpaca**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica

**AUTOR**

Gloria Maria Magdalena LEVANO SANCHEZ

**ASESOR**

Dra. Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Levano G. Efecto del extracto de maca negra atomizada en los medios de criopreservación sobre los parámetros espermáticos postdescongelamiento en espermatozoides de alpaca [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina/Unidad de Posgrado; 2023.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Gloria Maria Magdalena Levano Sanchez
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	45525541
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-5400-6534">https://orcid.org/0000-0002-5400-6534</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Martha Esther Valdivia Cuya
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06449624
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-8301-5536">https://orcid.org/0000-0002-8301-5536</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Doris Virginia Huerta Canales de Miranda
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08213401
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Patricia Gloria Woll Toso
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10587728
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Nancy Joaquina Rojas Moran
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08401186
<b>Datos de investigación</b>	

Línea de investigación	A.1.3.4. Reproducción
Grupo de investigación	Biología Reproductiva para la conservación y mejora genética animal – BIOTRA
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (Concytec). Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (Fondecyt). Convenio N°428-2019-FONDECY registrado con Código N°B19106784x y aprobado con RR 00150-R-20
Ubicación geográfica de la investigación	País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.05969 Longitud: -77.08211
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2020 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Biología reproductiva <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08</a>



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú. Decana de América  
**FACULTAD DE MEDICINA**



Vicedecanato de Investigación y Posgrado  
Sección Maestría

## ACTA DE GRADO DE MAGÍSTER

En la ciudad de Lima, a los 12 días del mes de julio del año dos mil veintitrés siendo las 10:00 hrs, bajo la presidencia de la Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda con la asistencia de las Profesoras: Mg. Patricia Gloria Woll Toso (Miembro), Mg. Nancy Joaquina Rojas Moran (Miembro) y la Dra. Martha Esther Valdivia Cuya (Asesora); la postulante al Grado de Magíster en Bioquímica, Bachiller en Genética y Biotecnología, procedió a hacer la exposición y defensa pública de su tesis titulada: **“EFECTO DEL EXTRACTO DE MACA NEGRA ATOMIZADA EN LOS MEDIOS DE CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS POSTDESCONGELAMIENTO EN ESPERMATOZOIDES DE ALPACA”** con el fin de optar el Grado Académico de Magíster en Bioquímica. Concluida la exposición, se procedió a la evaluación correspondiente, habiendo obtenido la siguiente calificación **A EXCELENTE (20)**. A continuación, la Presidenta del Jurado recomienda a la Facultad de Medicina se le otorgue el Grado Académico de **MAGÍSTER EN BIOQUÍMICA**, a la postulante **GLORIA MARIA MAGDALENA LEVANO SANCHEZ**.

Se extiende la presente Acta en dos originales y siendo las 11:24 hrs, se da por concluido el acto académico de sustentación.

Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda  
Profesor Principal  
Presidente

Mg. Patricia Gloria Woll Toso  
Profesor Principal  
Miembro

Mg. Nancy Joaquina Rojas Moran  
Profesor Principal  
Miembro



Dra. Martha Esther Valdivia Cuya  
Profesor Principal  
Asesora



**CERTIFICADO DE SIMILITUD**

Yo, **Jorge Walter Calderón Morales** Jefe de la Sección de Maestría, responsable del software de similitud textual Turnitin, informar que se ha revisado y evaluado la tesis titulada: **“Efecto del extracto de Maca negra atomizada en los medios de criopreservación sobre los parámetros espermáticos postdescongelamiento en espermatozoides de alpaca”** presentado por el/la maestrando(a) **Gloria Maria Magdalena Levano Sanchez** para optar el grado en **Magíster en Bioquímica**.

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, evaluación y análisis mediante el software para la detección de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **07%** de similitud, nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación**.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para su publicación.

Firma del Jefe de Sección Maestría:

DNI: 07224844

**Jorge Walter Calderón Morales**

Nombres y apellidos del Jefe



## DEDICATORIA

*A mis padres, Gloria y Pedro, quienes son mi principal fuerza para seguir adelante.*

*A mis hermanos Milagros y Pedro, por los momentos alegres y porque a pesar de todo siempre estamos juntos.*

*A mis tíos Porfirio e Imelda por el cariño y apoyo de toda la vida.*

*A mi abuelita Gregoria, gracias por tu larga vida llena de amor y empatía hacia los demás, un abrazo al cielo.*



## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, tíos y hermanos quienes día a día se esfuerzan y me aconsejan por ser una mejor persona.

A Juanita, Diego, Ángel y Héctor, mis colegas del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de mi querida Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A Marlon García por su apoyo y amistad, gracias por todo lo aprendido y por siempre estar dispuesto a escucharme.

A mi amiga de todo los momentos y los tiempos, Elaine Siqueira, gracias por todo lo vivido, las metas y los sueños, por ser un ejemplo de vida de que todo se puede.

A mis amigos de la maestría; Cecilia, Nori, Jacqueline, Giovana, Kevin, Luis y Brayam, el tiempo compartido fueron momentos aleccionadores y más que gratos.

A Soledad por el inmenso apoyo y cariño desde que nos conocimos, la vida siempre nos conduce con las mejores personas, con el mismo camino y sueños.

A Mapi, Cristian y Erik, gracias por su apoyo y aliento en el proceso de culminación de este trabajo.

A mis queridos amigos de toda la vida, Angellos y José; por más risas y logros compartidos.

A mi jurado de tesis, gracias por todo su apoyo y aportes en la culminación de esta tesis, en especial a la Dra. Doris Huertas por todo su cariño y amistad a lo largo de la maestría.

A la Dra. Martha Valdivia Cuya por su apoyo y confianza a través de todos estos años, gracias por siempre permitirme estar en el laboratorio, donde más feliz estoy: en el laboratorio. Gracias por la libertad y la confianza para investigar juntas.

Finalmente agradezco a PROCENCIA – CONCYTEC-Proyecto Investigación Básica, 2019-01-Convenio N° 428- 2019-FONDECYT quien permitió el financiamiento de esta tesis.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	11
1.1 Situación problemática	11
1.2 Formulación del problema.	11
1.3 Justificación de la investigación	12
1.4 OBJETIVO	12
1.4.1 Objetivo general:	12
1.4.2 Objetivos específicos:	12
CAPÍTULO II: MARCO TEORICO	13
2.1 Antecedentes del problema	13
2.2 Bases teóricas	14
2.2.1. Los camélidos sudamericanos: la alpaca	14
2.2.2 Problemática en el campo de la reproducción	14
2.2.3. Maca negra	14
2.2.4 Criopreservación	15
2.2.4.1 Agentes crioprotectores	15
2.2.5 Antioxidantes	16
2.2.6 Estrés oxidativo.	16
CAPÍTULO III: HIPOTESIS Y VARIABLES	17
3.1 Hipótesis.	17
3.2 Variable independiente.	17
3.3 Variable dependiente.	18
CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA	18
4.1 Tipología de la investigación	18
4.2 Muestra:	18
Criterio de inclusión y exclusión:	18
Inclusión	18
4.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	19
4.3.1 Colección de la muestra:	19

4.3.2	Adquisición de la Maca negra atomizada	19
4.3.3	Obtención del epidídimo.	20
4.3.4	Criterio para la criopreservación de la muestra	21
4.3.4.1	Movilidad espermática	21
4.3.5	Evaluación de los Parámetros espermáticos convencionales	21
4.3.5.1	Concentración espermática.	21
4.3.5.2	Viabilidad espermática.	22
4.3.5.3	Integridad de membrana plasmática (Test de HOST).	22
4.4	Parámetros espermáticos no convencionales	22
4.4.1	Actividad mitocondrial espermática	22
4.4.2	Análisis de fragmentación del ADN por TUNEL.	23
4.4.3	Evaluación de ROS.	24
4.4.4	Método de criopreservación	26
4.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
CAPÍTULO V: RESULTADOS		30
5.1	PARÁMETROS ESPERMÁTICOS	30
5.5.1	Movilidad espermática	30
5.5.2	VIABILIDAD ESPERMÁTICA	31
5.2	INTEGRIDAD DE MEMBRANA (TEST DE HOST)	32
5.3	FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO	34
5.4	EMISIÓN TOTAL DE ESPECIES REACTIVAS AL OXÍGENO (ROS)	35
5.5	PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	37
5.6	TASA DE ACTIVIDAD	39
CAPÍTULO VI: DISCUSION DE RESULTADOS		42
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES		46
CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		47
CAPÍTULO IX: ANEXOS		54

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Metodología de la peroxidación lipídica por reducción del nitroblue tetrazolium (NBT) .....	23
<b>Figura 2</b> Metodología de la emisión de ROS total A. Medición de ROS intracelular usando sonda molecular (H <sub>2</sub> DCFDA) en espermatozoides de alpaca Producción de DCF fluorescente por ROS intracelular .....	25
<b>Figura 3.</b> Criopreservación espermática A. Congelamiento espermático B.Descongelamiento espermático .....	27
<b>Figura 4</b> Flujograma del trabajo experimental. Pre: control antes del congelamiento, medio Yolk, Maca 10mg/mL, Maca 20mg/mL, Maca 30mg/mL y Resveratrol 5mg/mL .....	28
<b>Figura 5</b> Movilidad espermática por tratamiento en fresco y congelación/descongelación. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL. * Diferencias significativa P<0,05 precongelamiento y entre cada tratamiento .....	30
<b>Figura 6.</b> Viabilidad espermática por tratamiento en fresco y congelación/descongelación. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL,T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL .....	31
<b>Figura 7</b> Integridad de membrana espermática en fresco y congelación/descongelación. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL.....	32
<b>Figura 8</b> Fragmentación relativa del ADN en fresco y congelación/descongelación. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL.....	34
<b>Figura 9</b> Porcentaje de espermatozoides con una alta cantidad de ROS en fresco y congelación/descongelación. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2 : Maca 20mg/mL,T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL	35
<b>Figura 10</b> EMISIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL OXIGENO (ROS). (a) Espermatozoides con baja emisión de ROS. (b) campo claro (c) espermatozoides con alta emisión de ROS (verde intenso).Aumento total: 400x.....	36
<b>Figura 11</b> Reacción citoquímica de reductasas endógenas en la pieza intermedia del espermatozoide. Se identificaron cuatro depósitos de formazán. C (compacto), Sc (subcompacto), F (focal) y D (difuso) en mitocondrias de espermatozoides de ratón visualizadas con la técnica NBT. Fotografías tomadas por microscopía óptica 800X....	37
<b>Figura 13</b> Tasas de actividad citoquímica según la cantidad de formazán depositada en fresco y congelación/descongelación. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2 : Maca 20mg/mL,T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL .....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Datos de parámetros espermáticos en fresco y congelación/descongelación .....	33
<b>Tabla 2</b> Datos de Índice de fragmentación de ADN, ROS e índice de actividad mitocondrial en fresco y congelación/descongelación .....	38

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar el efecto del extracto de Maca negra atomizada en los medios de criopreservación sobre los parámetros espermáticos post descongelamiento en espermatozoides de alpaca. **Diseño:** Investigación experimental en el área de Ciencias de la Vida y biotecnología. **Institución:** Laboratorio de la Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. **Material Biológico:** epidídimos de alpaca macho en edad reproductiva. Se formaron 6 grupos: precongelamiento, Medio Yolk (MY), MY+Maca 10 mg/mL, MY+Maca 20 mg/mL, MY+ Maca 30 mg/mL y MY Resveratrol (5 mg/mL).

**Metodología:** La criopreservación de semen se realizó mediante el método de congelación lenta. Se evaluaron, antes y después de la congelación, marcadores asociados con la funcionalidad, como: motilidad, viabilidad e integridad de la membrana plasmática. Los marcadores celulares asociados con el daño oxidativo, como la fragmentación del ADN, la producción total de ROS y la peroxidación lipídica. **Resultados:** Los resultados mostraron que la suplementación con Maca negra a 20 mg/mL mejoró la motilidad, viabilidad e integridad de la membrana de los espermatozoides. De manera similar, la producción total de ROS disminuyó con Maca a 10 mg/mL ( $25 \pm 2,23$  %) y 20 mg/mL ( $20 \pm 2,52$  %) ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, la fragmentación del ADN y la peroxidación lipídica fue similar en todos los grupos.

**Conclusiones:** El efecto del extracto de Maca negra atomizada en los medios de criopreservación a una concentración de 20 mg/mL mejoró la calidad de los parámetros espermáticos y tiene un efecto protector durante el proceso de congelación/descongelación de los espermatozoides del epidídimo

**Palabras clave:** Criopreservación, Maca negra, parámetros espermáticos, alpaca

## **ABSTRACT**

**Objective:** To evaluate the effect of atomized black Maca extract in cryopreservation media on post-thawing sperm parameters in alpaca spermatozoa. **Design:** Experimental research in the area of Life Sciences and biotechnology. **Institution:** Laboratory of Reproduction Physiology of the Faculty of Biological Sciences, of the Universidad Nacional Mayor de San Marcos. **Biological material:** epididymis of a male alpaca of reproductive age. 6 groups were formed: prefrozen, Yolk Medium (MY), MY+Maca 10 mg/mL, MY+Maca 20 mg/mL, MY+ Maca 30 mg/mL, and MY Resveratrol (5 mg/mL). **Methodology:** Semen cryopreservation was performed using the slow freezing method. Before and after freezing, markers associated with functionality such as: motility, viability and integrity of the plasma membrane were evaluated. Cellular markers associated with oxidative damage, such as DNA fragmentation, total ROS production, and lipid peroxidation. **Results:** The results showed that the supplementation with black Maca at 20 mg/mL improved the motility, viability and integrity of the sperm membrane. Similarly, Maca decreased total ROS production to 10 mg/mL ( $25 \pm 2.23\%$ ) and 20 mg/mL ( $20 \pm 2.52\%$ ) ( $P < 0.05$ ). However, DNA fragmentation and lipid peroxidation was similar in all groups.

**Conclusions:** The effect of atomized black Maca extract in cryopreservation media at a concentration of 20 mg/mL improved the quality of sperm parameters and has a protective effect during the freezing/thawing process of epididymal sperm.

**Keywords:** Cryopreservation, black Maca, sperm parameters, alpaca

## **CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Situación problemática**

Una de las principales actividades productivas y económicas de gran valor para la población altoandina de nuestro país es la ganadería de los camélidos sudamericanos (CSA), alpaca y llama, de ello dependen más de 150 mil familias pertenecientes, mayormente, a comunidades campesinas de departamentos considerados en situación de pobreza y extrema pobreza; para estas familias la crianza de camélidos representan del 79 al 80% del ingreso familiar anual (Ministerio de Agricultura, 2017).

El congelamiento es una herramienta muy importante para la reproducción asistida de diversos individuos y para salvaguardar la información genética de las especies, así como también para la preservación de muchas especies y razas que están en peligro de extinción (O'Flaherty *et al.*, 2003).

Es debido a la importancia que representa este camélido, en los últimos años se han venido realizando investigaciones sobre la criopreservación de espermatozoides de alpaca, sin embargo, no se ha obtenido el éxito esperado en su preservación como si sucede en otras especies domésticas (Huanca *et al.*, 2013).

### **1.2 Formulación del problema.**

¿Cuál es el efecto del extracto de Maca negra atomizada en los medios de criopreservación sobre los parámetros espermáticos post descongelamiento en espermatozoides de alpaca?



### **1.3 Justificación de la investigación**

La criopreservación es un método que nos permite mantener la viabilidad de los espermatozoides por periodos prolongados de tiempo mediante el mantenimiento de estas células en temperaturas muy bajas.

En los camélidos sudamericanos domésticos como la alpaca no existe un protocolo de congelamiento exitoso; los mecanismos de criopreservación con el uso de crioprotectores tradicionales no han logrado superar los problemas que se presentan en el congelamiento y descongelamiento de espermatozoides. Un congelamiento y un posterior descongelamiento exitoso son de vital importancia para las biotecnologías reproductivas y nos permitiría el uso masivo de la inseminación artificial en una especie de importancia económica como lo es la alpaca en nuestro país.

El éxito de la criopreservación está en la búsqueda de crioprotectores que puedan prevenir el daño del congelamiento y mantener la estructura del ADN del espermatozoide de alpaca.

La adición del extracto de Maca negra atomizado en los medios de criopreservación podría ayudar a mantener la fisiología, calidad del espermatozoide después del congelamiento debido a sus propiedades benéficas en reproducción.

### **1.4 OBJETIVO**

#### **1.4.1 Objetivo general:**

-Evaluar el efecto del extracto de Maca negra atomizada en los medios de criopreservación sobre los parámetros espermáticos post descongelamiento en espermatozoides de alpaca.

#### **1.4.2 Objetivos específicos:**

-Determinar el efecto de la Maca negra atomizada sobre la fragmentación del ADN espermático en el post descongelamiento en espermatozoides de alpaca.

-Evaluar el efecto de la Maca negra atomizada en los niveles de estrés oxidativo en el post descongelamiento de espermatozoides de alpaca.

-Determinar el efecto de la Maca negra atomizada sobre los parámetros espermáticos convencionales en el post descongelamiento.

## CAPÍTULO II: MARCO TEORICO

### 2.1 Antecedentes del problema

Los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de la alpaca tienen una baja movilidad, viabilidad e integridad de membrana en relación a las encontradas en otras especies de mamíferos post descongelamiento (Santiani et al. (2005; 2013), Banda et al. ,2010 y Juárez y Santiani, 2019, Canorio *et al.*, 2015).

La escasa supervivencia de los espermatozoides de los camélidos al proceso de criopreservación podría deberse a la susceptibilidad inherente de la especie, los componentes de los dilutores y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales han sido identificados en otras especies (Medeiros *et al.*, 2002).

En mamíferos los niveles de especies reactivas al oxígeno durante el proceso de criopreservación en semen se incrementan significativamente, evidenciándose con una significativa pérdida de movilidad y viabilidad espermática, así como una capacitación espermática prematura y fragmentación del ADN espermático. Sin embargo, se ha demostrado que el efecto negativo de los ROS puede ser prevenido parcialmente mediante la adición de antioxidantes naturales (Faridullah *et al.*, 2015). En los mamíferos la producción baja y controlada de ROS es esencial para la activación espermática, para la señalización celular y fertilización del oocito (Aitken *et al.*, 2016). Los principales efectos nocivos de ROS en la funcionalidad espermática son pérdida de movilidad, incremento de peroxidación lipídica y fragmentación del ADN espermático (Koppers *et al.*, 2008).

Los crioprotectores tradicionales más utilizados en espermatozoides y semen de alpacas son el glicerol, el etilenglicol y dimetil sulfóxido (DMSO) en diversas concentraciones (Canorio, 2008). Sin embargo, no se ha establecido el agente crioprotector y la concentración que ofrece mejores resultados posdescongelamiento del semen criopreservado (Choez *et al.*, 2017).

Por otro lado, la Maca negra tiene mejores efectos en la concentración y la movilidad espermática en animales (Gonzales *et al.*, 2014). A la Maca como suplemento se le atribuye un efecto antioxidante reduciendo el estrés oxidativo (Castillo y Lock, 2005; Choi *et al.*, 2012 y Oré, 2008).

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1. Los camélidos sudamericanos: la alpaca**

El Perú es el primer productor mundial de alpacas y el segundo de llamas. Su crianza es extensiva en un hábitat alto andino que va desde los 3800 hasta los 4800 m.s.n.m, soportan las inclemencias del frío intenso y las nevadas propias de la puna (Quina, 2017).

Además, la alpaca es una especie que representa un factor importante de la economía de nuestro país, llegando a casi a los 3 millones de cabezas y por lo menos 1.5 millones de campesinos de más de 1,000 comunidades de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Lima y Puno, teniendo un alto impacto económico y social en estas poblaciones (MINCETUR, 2018).

### **2.2.2 Problemática en el campo de la reproducción**

Las alpacas poseen una estacionalidad reproductiva, incluyendo el apareamiento y el parto los cuales se producen durante los meses de diciembre a marzo, coincidiendo con los periodos de lluvias abundantes y presencia de forraje (Smith, 1994).

La alta consanguinidad de los rebaños que presentan malformaciones congénitas estimadas en 25%, se manifiestan generalmente como criptorquidia. Las alpacas presentan alta tasa de fragmentación de ADN además de parámetros espermáticos muy variables y no existe un protocolo de criopreservación de rutina para los espermatozoides epididimarios de alpaca (Carretero *et al.*, 2017).

### **2.2.3. Maca negra**

La Maca (*Lepidium meyenii* Walpers o *Lepidium peruvianum* Chacón) forma parte de la familia Brassicaceae, es una planta nativa de los andes centrales que crece dentro de los 4000 a 4500 msnm. Se le atribuyen beneficios como mejorar la función sexual, la espermatogénesis, el aprendizaje, la memoria, la disminución del estrés; solucionar la fatiga incrementando la resistencia física e incluso mejorar la fertilidad tanto femenina como la masculina (Gonzales *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha observado que la Maca reduce la fragmentación del ADN espermático en ratones con subfertilidad química, y también produce un incremento de la producción diaria de espermatozoides e incrementa la movilidad espermática (Valdivia *et al.* 2016).

#### **2.2.4 Criopreservación**

A través del tiempo, las biotecnologías reproductivas buscan conservar animales élite con técnicas como la criopreservación que es una forma de congelamiento lento que tiene la capacidad de preservar diversos tipos de células a largo plazo (Aliakbari *et al.*, 2016).

Durante la criopreservación, los espermatozoides sufren diferentes niveles de estrés, tales como los cambios en el equilibrio osmótico, así como cambios en la temperatura durante el enfriamiento, el congelamiento y el recalentamiento (O'Neill, *et al.*, 2015).

Estos cambios conducen a la formación de cristales de hielo, que se encuentran entre uno de los principales factores biofísicos que causan la muerte de los espermatozoides (Rosato y Iaffaldano, 2013).

##### **2.2.4.1 Agentes crioprotectores**

Los agentes crioprotectores (ACP) penetrantes son compuestos con la capacidad de ingresar a las células, reduciendo la concentración de electrolitos y aumentando su resistencia a bajas temperaturas. El mecanismo con las que actúan estos compuestos es aumentando la viscosidad del citoplasma, variando las tasas de difusión de las moléculas de agua y alterando las propiedades lipídicas de la membrana (Mazur, 1984).

Los ACP no penetrantes son proteínas que se encuentran en la leche, yema de huevo y azúcares de gran peso molecular que ayudan a prevenir la formación de cristales de hielo y estabilizan las proteínas de membrana, debido al tamaño de las moléculas, estas no pueden atravesar la membrana por lo que cumple un rol extracelular siendo un apoyo fundamental en la disminución de la concentración de ACP penetrantes (Fahy, 1986).

##### **2.2.5 Antioxidantes**

Tanto las vitaminas E y C pueden proteger a los espermatozoides contra el daño oxidativo endógeno del DNA, así como del daño a la membrana celular, reconociendo su efecto significativo en la mejora de los parámetros espermáticos (Amidi *et al.*, 2016)

La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) cuenta con una actividad antioxidante que se basa principalmente en la reducción de la peroxidación lipídica iniciada por los ROS, además de la captura de los radicales hidroxilos libres como de los radicales superóxidos,

protegiendo a los componentes de la membrana celular espermática del daño y, en menor medida, se indica que disminuye la producción de los ROS (Majzoub y Agarwal, 2020)

El Resveratrol es un antioxidante, que contiene compuestos polifenólicos no flavonoides sintetizado por una gran variedad de plantas en respuesta al estrés ambiental. Se ha reportado que la actividad biológica de estos polifenoles depende principalmente del número y la posición de los grupos hidroxilo (OH), y que esta estructura molecular le permite: eliminar radicales libres, inhibir la oxidación lipídica, reducir la formación de hidroperóxidos e interactuar con el sistema antioxidante endógeno incrementando la actividad catalítica de enzimas como la glutatión-peroxidasa (GPx), la glutatión-reductasa (GR), la catalasa y la superóxido-dismutasa (SOD) y esto en consecuencia inhibiría la peroxidación lipídica y disminuiría la fragmentación del ADN espermático (Gülçin, İ., 2010).

### **2.2.6 Estrés oxidativo.**

El estrés oxidativo es un efecto secundario del desequilibrio de las especies reactivas de oxígeno. Los espermatozoides son susceptibles al estrés oxidativo durante su preparación y selección, por lo cual se considera una de las causas del bajo porcentaje de las tasas de fecundación afectando principalmente los parámetros de movilidad (Du Plessis *et al.*, 2008).

Es un factor importante en la etiología de la infertilidad masculina. A nivel del espermatozoide aislado, los ROS pueden inducir la peroxidación lipídica y la fragmentación del ADN, interrumpiendo la movilidad de estas células y su capacidad de formar embriones viables (Aitken, 2008).

El daño acrosomal por efecto del estrés oxidativo es causado durante el transporte de los espermatozoides por el epidídimo, principalmente, por el peróxido de hidrógeno, el cual daña al acrosoma e inhibe la inducción de la reacción acrosomal (Rezaei, *et al.*, 2020).

Las investigaciones en los últimos años que se vienen desarrollando permiten detectar y cuantificar compuestos como los ROS que reducen la calidad espermática, tanto en especies animales como en humanos (Agarwal, Cho, Esteves y Majzoub, 2017).

Para las evaluaciones de ROS en el estrés oxidativo, se analizaron reacciones que involucraron el citocromo c-Fe<sup>3+</sup> o Nitroblue de tetrazolium (NBT), complejos que miden los ROS en la superficie de la membrana celular. Este último método de detección abarca quizá un mayor rango de los ROS que afecta directamente a los espermatozoides, pues no solo detecta un producto final como es el malondialdehído (MDA) detectado mediante el ensayo con ácido tiobarbitúrico (TBA) luego de la peroxidación lipídica (LPO), sino que interacciona con todo el ROS que está diluido en el medio y es fácilmente detectable por la presencia de depósitos de formazán, compuestos reducidos del NBT (Sikka, 1996)

### **CAPÍTULO III: HIPOTESIS Y VARIABLES**

#### **3.1 Hipótesis.**

El efecto del extracto de Maca negra atomizada en los medios de criopreservación es mejorar la calidad de los parámetros espermáticos post descongelamiento en espermatozoides de alpaca.

#### **3.2 Variable independiente.**

Extracto de Maca negra atomizado

#### **3.3 Variable dependiente.**

Calidad de los parámetros espermáticos post descongelamiento

### **CAPÍTULO IV: METODOLOGÍA**

#### **4.1 Tipología de la investigación**

Este estudio corresponde a una investigación experimental puro con grupo control con post prueba (Hernández 2014).

#### **4.2 Muestra:**

**Unidad de análisis:** epidídimo de alpaca macho

**Material de Laboratorio.**

**Material biológico:** Los epidídimos fueron obtenidas del matadero Municipal de Huancavelica. Se utilizaron un total de 60 epidídimos.

**a. Reactivos.**

Cloruro de nitroblue tetrazolium (NBT)

Kit de TUNEL

2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate

**b. Equipos.**

- Cryobath CRIOGEN 4.0
- Microscopio de fluorescence.
- Microscopio de luz (EUROMEX, Arnhem, Holland)

**Criterio de inclusión y exclusión:**

**Inclusión**

- Alpacas de 4 a 6 años.
- Testículos con peso mayor o igual a 8g.
- Espermatozoides epididimarios móviles ( $\geq 70\%$ ).

**Exclusión**

- Alpaca macho que hayan recibido algún tratamiento antes de su beneficio.
- Alpacas que hayan sido descartados por enfermedad por los veterinarios en el matadero Municipal de Huancavelica.
- Testículos que no tengan las condiciones fisiológicas adecuadas.

## **4.3 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **4.3.1 Colección de la muestra:**

Los testículos de alpaca fueron obtenidos desde el Camal Municipal de Huancavelica, en la provincia de Huancavelica (3000 – 3700 m.s.n.m, temperatura promedio anual entre los 8°C y 10°C) y corresponderán a muestras de alpacas machos de entre 4 a 6 años de edad. Las muestras fueron almacenadas en suero fisiológico a 4°C y transportadas al laboratorio de Fisiología de la Reproducción en la ciudad de Lima (101 msnm, temperatura promedio anual entre los 11°C y 28°C). En el laboratorio, dentro de las 14 horas *post mortem* del animal se procedió a aislar los epidídimos de los testículos de alpaca (Ratto *et al.*, 1999; Morton *et al.*, 2007, 2010). Las colectas de muestras fueron realizadas una vez cada dos semanas en un periodo de 4 meses.

### **4.3.2 Adquisición de la Maca negra atomizada**

El medio utilizado para la criopreservación fue Tris Yolk Medium (YM) con 10% de suero fetal bovino (FBS) que contenía 0.25M de Fructosa y 10% de Dimetilsulfóxido, adicionalmente se complementó con el extracto hidroalcohólico (metanol) atomizado de Maca negra comercial en polvo (JUVENS® Cayenatur, Lima, Perú) según descrito por el Círculo de Investigación de Plantas con Efecto en la Salud (Beca N° 010-2014-FONDECYT). Este medio se dividió en cuatro tratamientos donde se añadió Maca negra en tres concentraciones de 10 mg/mL, 20 mg/mL y 30 mg/mL, y 5 mg/mL de Resveratrol (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) Como control antioxidante.

La Maca negra JUVENS fue adquirida de la Universidad Cayetano Heredia, es un extracto hidroalcohólico atomizado de Maca (ver anexos 5 y 6).



Los medios de crioprotección a utilizados fueron los siguientes.

**Precongelamiento:** Muestras en fresco con Medio HAM F10 suplementado con 4% de suero bovino de albumina (BSA)

**Medio Yolk :** Medio Yolk con 10% de suero bovino fetal (SBF) conteniendo 0,2M de Fructosa, 10% de Dimetilsufóxido.

**Tratamiento I:** Medio Tris yolk con 10% de SBF, 0,2M de Fructosa 10% Dimetilsufoxido suplementado con 10mg/mL del extracto atomizado de Maca negra JUVENS.

**Tratamiento II:** Medio Tris yolk con 10% de SBF, 0,2M de Fructosa 10% Dimetilsufoxido suplementado con 20mg/mL del extracto atomizado de Maca negra JUVENS.

**Tratamiento III:** Medio Tris yolk con 10% de SBF, 0,2M de Fructosa 10% Dimetilsufoxido suplementado con 30mg/mL del extracto atomizado de Maca negra JUVENS.

**Resveratrol (control positivo):** Medio Tris yolk suplementado con 10% de SBF, 0,2M de Fructosa 10% Dimetilsufoxido suplementado con Resveratrol 5 mg/mL

### **4.3.3 Obtención del epidídimo.**

En el laboratorio, dentro de las 22 horas post mortem del animal se procedió y a aislar los epidídimos, de los cuales sólo se utilizó la región de la cola, la cual fue removida y cortada en piezas pequeñas, durante la disección se utilizó suero fisiológico al 9% a 37°C. Luego la suspensión con los espermatozoides fue transferida a tubos de plástico de 1,5 mL, y fueron colocados luego en una incubadora a 37°C por quince minutos para permitir que los espermatozoides se recuperen. Pasado este tiempo se separó la muestra en dos partes, la primera para determinar los parámetros espermáticos convencionales como la movilidad, viabilidad e integridad de membrana plasmática, posteriormente se lavó la muestra con medio HAM F10 por medio de centrifugaciones para poder remover restos de tejidos, quedando solo los espermatozoides. El primer lavado fue a 700 RPM por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 1200 RPM por 5 minutos. Se separó el sobrenadante del precipitado, en la fracción del precipitado se obtuvo la mayor cantidad de espermatozoides que de acuerdo al criterio de inclusión se usó para la criopreservación.

#### **4.3.4 Criterio para la criopreservación de la muestra**

Para realizar la criopreservación de los espermatozoides se tomó como referencia que el valor de la movilidad sea mayor o igual a 70%.

##### **4.3.4.1 Movilidad espermática**

La movilidad espermática fue evaluada de acuerdo al criterio del Organismo Mundial de la Salud (OMS, 2021). Se tomó 10ul de la muestra espermática, se colocó sobre un portaobjetos previamente atemperado a 37°C y se observó al microscopio de campo claro a una magnificación de 400X. La movilidad de cada espermatozoide encontrado fue clasificada de la siguiente forma: P: movilidad progresiva, NP: movilidad no progresiva

Se evaluaron varios campos microscópicos hasta obtener un total de 100 espermatozoides de los cuales se tomaron en cuenta la movilidad progresiva (P). Los valores fueron expresados en porcentajes en base a 100 espermatozoides del campo observado.

#### **4.3.5 Evaluación de los Parámetros espermáticos convencionales**

Los parámetros espermáticos fueron evaluados pre y post descongelamiento.

De los testículos de alpaca se aislaron los epidídimos y se realizó el análisis de los parámetros espermáticos convencionales, movilidad espermática, concentración espermática, viabilidad espermática e integridad de membrana plasmática (Test de HOST).

##### **4.3.5.1 Concentración espermática.**

La concentración de espermatozoides fue evaluada de acuerdo al criterio del Organismo Mundial de la Salud (OMS,2021) se determinó usando el método del hemocitómetro, para lo cual usamos la cámara Neubauer, la cual contiene 2 cuadrados grandes y cada uno de estos está dividido en 16 cuadrados pequeños.

Para realizar el conteo, se realizó una dilución de 10 µL de muestra en 990 µL de agua destilada luego se colocó 10 µL de esta dilución en el centro de la cámara, se dejó reposar 5 minutos y se realizó el conteo de los 32 cuadrados. El resultado final del conteo se expresó en millones de espermatozoides por mililitro.

#### **4.3.5.2 Viabilidad espermática.**

La viabilidad espermática se realizó mediante el uso del colorante vital Eosina Y al 0.5% para evaluar la viabilidad de los espermatozoides y encontrar la proporción de espermatozoides vivos y muertos. Sobre un portaobjeto previamente atemperado a 37°C se colocó 5µL de la muestra espermática y luego se añadió 5µl de eosina, se mezclaron ambas gotas y se dejó la muestra incubando por 2 minutos. Se colocará en un cubreobjeto y se observó bajo el microscopio de luz a 400X de magnificación. Los criterios para evaluar los espermatozoides fueron:

- 1- Espermatozoides muertos: cabeza rosada.
- 2- Espermatozoides vivos: cabeza blanca.

#### **4.3.5.3 Integridad de membrana plasmática (Test de HOST).**

El resultado fue expresado en porcentaje de espermatozoides con membrana intacta, es decir el porcentaje de espermatozoides que responden al test Hiposmótico.

La evaluación fue mediante el test hipo osmótico, también conocido como test HOST, se preparó una solución hipoosmótica con una osmolaridad final de 100 mOsm. 30 µL de la preparación de espermatozoides fueron transferidos a 270µL de la solución hipoosmótica (1:10, v/v) por 30 minutos a 37°C. Se evaluó la proporción de espermatozoides mostrando el típico enrollamiento de la cola (causado por el hinchamiento) con respecto del número total de espermatozoides evaluados.

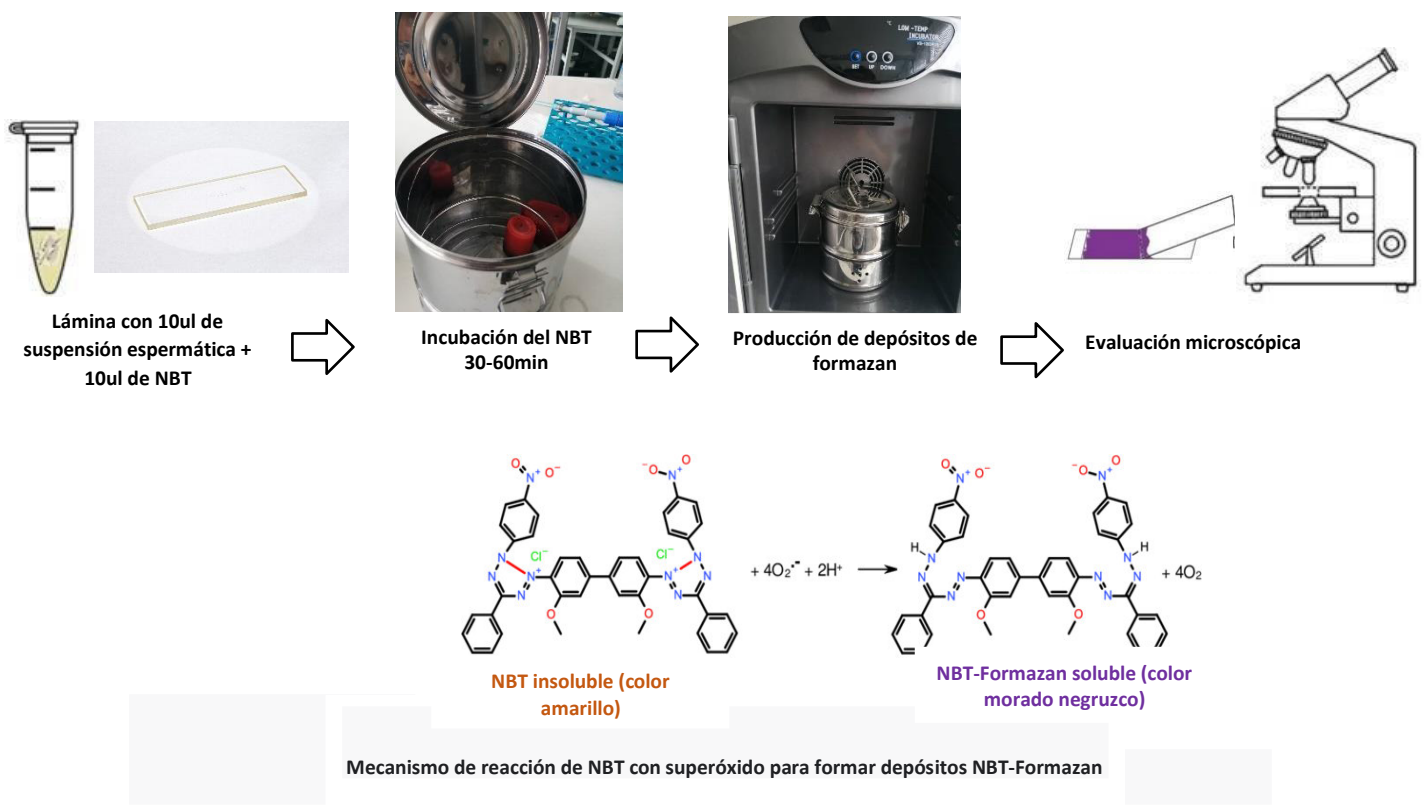
### **4.4 Parámetros espermáticos no convencionales**

De los testículos de alpaca se aislaron los epidídimos y se realizó el análisis de los parámetros espermáticos no convencionales, actividad mitocondrial espermática pre y postdescongelamiento

#### **4.4.1 Actividad mitocondrial espermática**

Para medir la actividad mitocondrial se analizó mediante el NBT, en un sistema de oscuridad. A una gota de 10 µL del homogenizado de espermatozoides fue mezclada con 10 µL de NBT 1X sobre un portaobjetos pre-calentado a 37°C en una platina térmica,

la mezcla fue cubierta con una laminilla previamente acondicionada para que ésta no toque la superficie de la lámina, es así que se forma una columna líquida entre el portaobjeto y cubre-objeto (sistema de óxido reducción) y otra lámina en la que la gota de 10  $\mu\text{L}$  no fue mezclada con NBT, considerada como el control. El sistema de óxido reducción fue colocado en una cámara anaeróbica durante 45 minutos a 37°C. Los sistemas fueron evaluados al microscopio con el objetivo de aceite de inmersión 100X, la actividad mitocondrial fue determinada de acuerdo a la clasificación en cada categoría (Compacto: “C”, Subcompacto: “SC”, Focal: “F”, Residual: “R”) y su correspondiente factor (1, 0.7, 0.3, 0.1, respectivamente) de acuerdo a Hrudka (1979).



**Figura 1** Metodología de la peroxidación lipídica por reducción del nitroblue tetrazolium (NBT)

#### 4.4.2 Análisis de fragmentación del ADN por TUNEL.

La evaluación se realizó mediante un kit comercial (*In situ* cell death detection Kit, Fluorescein Roche® Mannheim, BW, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones para las muestras de alpaca.

El tratamiento de la muestra fue siguiendo lo descrito por Santiani *et al.*, (2012) con algunas modificaciones, se usó una suspensión espermática de concentración conocida de

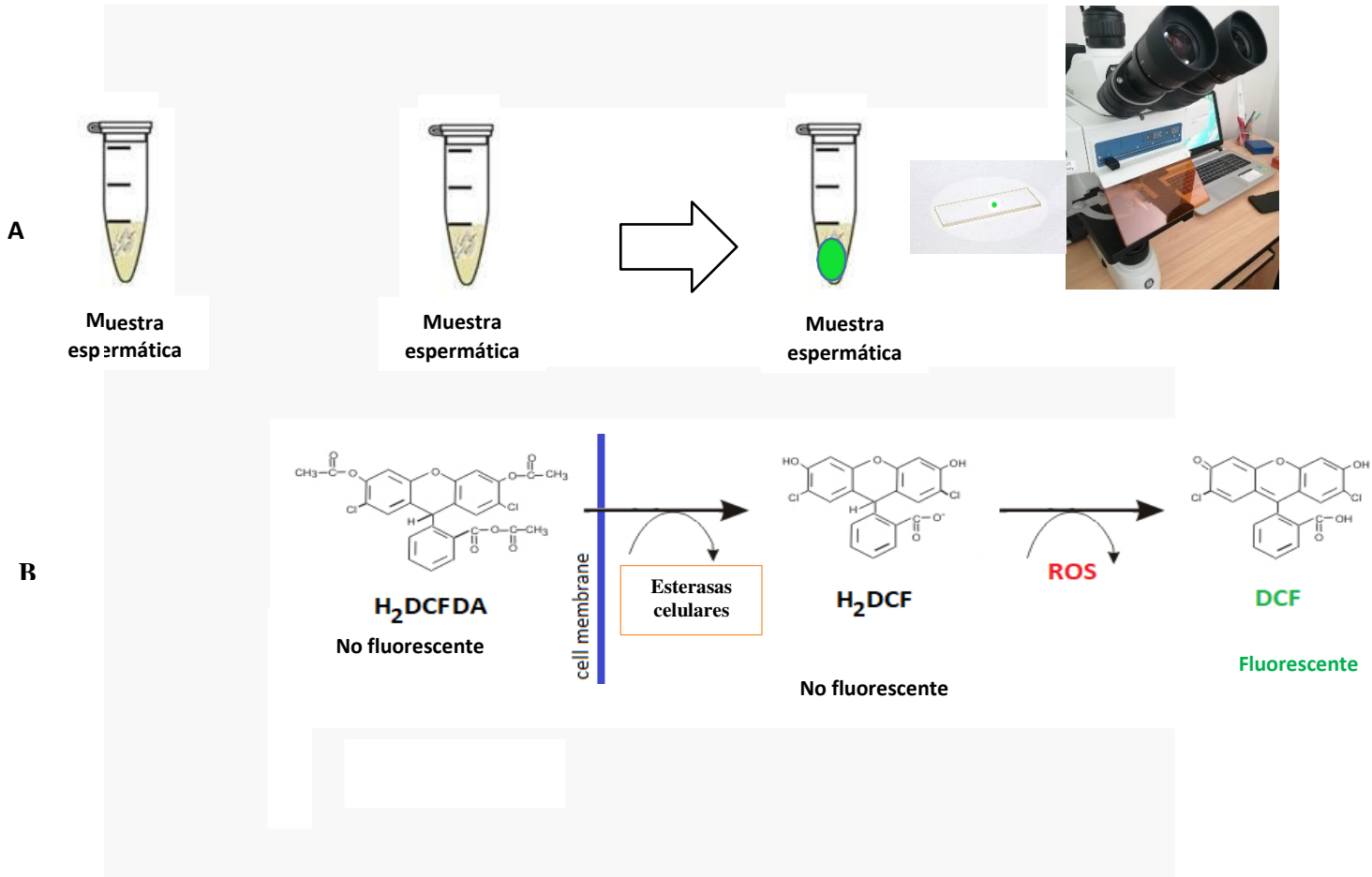
$2 \times 10^6$  espermatozoides /mL para luego ser fijada en formaldehído 4% por 15 minutos a 4°C. Posteriormente se realizaron dos lavados con solución salina fosfatada (PBS) para eliminar el fijador. Seguidamente la muestra fue sometida a permeabilización, resuspendiéndose en 100  $\mu$ L con Triton X-100 al 0.5% diluido en 0.1% en Citrato de sodio durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de permeabilización fue retirada mediante lavados por centrifugación en PBS.

Las muestras en estudio se resuspendieron en 50  $\mu$ L de solución de trabajo de TUNEL y se incubaron por 60 minutos en cámara húmeda y oscura a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adicionaron 500  $\mu$ L de PBS y fueron lavadas a 500 g por 6 minutos. Los pellets se resuspendieron en 400  $\mu$ L de PBS y 2  $\mu$ L de Ioduro de propidio (Live/Dead® Sperm Viability Kit, Molecular Probes L-7011, EEUU), de una solución stock de 2.4 mM. Las muestras se mantuvieron en todo momento a 4 °C en una cámara oscura hasta su lectura por fluorescencia. El control negativo fue solamente con 50  $\mu$ L de solución de marcado del control y al control positivo post permeabilización se le sometió a incubación con 2 UI de DNasa I por 10 minutos a 37 °C. El índice de fragmentación se definió como los espermatozoides fluorescentes vivos positivos para TUNEL, sobre espermatozoides negativos a Ioduro de propidio (TUNEL/PI). Para detectar espermatozoides positivos para TUNEL se utilizó la espectroscopia de fluorescencia con filtros de excitación/emisión a 515 nm/555 nm con el láser azul y para evaluar la permeabilidad de los espermatozoides se utilizó Ioduro de propidio se detectó por espectroscopia de fluorescencia con el láser verde a una excitación/emisión a 338 nm/617 nm.

#### **4.4.3 Evaluación de ROS.**

La evaluación del ROS intracelular fue mediante el kit de ensayo de especies reactivas de oxígeno (Beyotime Institute of Biotechnology) se aplicó para medir el nivel de ROS intracelulares siguiendo las instrucciones del fabricante. El diacetato de 2',7'-diclorofluorescina (H<sub>2</sub>DCFDA) es un reactivo no fluorescente permeable a las células que se desacetila mediante esterasas celulares a 2'7'-diclorofluorescina (H<sub>2</sub>DCF) no fluorescente después de su difusión en la célula. El H<sub>2</sub>DCF luego es oxidado por ROS en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente. (Nova,Z et al., 2020) Los resultados se expresaron como el porcentaje de espermatozoides positivos a ROS (ROS+), fueron evaluados 100 espermatozoides por cada muestra. Las muestras se mantuvieron en cámara oscura y se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia

(EUROMEX, Zeiss Axio Scope A, Holanda), con excitación/emisión a 485 nm/535 nm, con el filtro azul.



**Figura 2** Metodología de la emisión de ROS total A. Medición de ROS intracelular usando sonda molecular (H<sub>2</sub>DCFDA) en espermatozoides de alpaca Producción de DCF fluorescente por ROS intracelular.

#### **4.4.4 Método de criopreservación**

Luego de colocar la suspensión de espermatozoides en las pajuelas, éstas fueron selladas y colocadas en el sistema de congelamiento termocontrolado haciendo uso del sistema CRYOBATH a través del software Cryogenesis Versión 4.0 (Cryologics), el protocolo de congelamiento que se siguió fue el siguiente: La temperatura inicial fue de 4°C, las muestras fueron mantenidas en esa temperatura por cinco minutos. El segundo periodo fue el descenso de la temperatura de 4°C a 2°C a una velocidad de 3°C/min, manteniendo a 2°C por un minuto. El tercer periodo fue desde 2°C hasta -30°C con una velocidad de congelamiento de 5°C por minuto y finalmente de -30°C a -80°C con una velocidad de congelamiento de 8°C/min. Después de este punto se colocaron las pajuelas en nitrógeno líquido. Se utilizaron proporciones iguales de suspensión celular y medio de enfriamiento a -196°C y fueron mantenidas a esta temperatura hasta su descongelamiento y respectiva evaluación. Las muestras fueron descongeladas a 50°C por 7 segundos, lavándose las muestras con medio HAM F10 libre de BSA. Luego se procedió a evaluar el estado de los espermatozoides (Canorio P, *et al* 2015)

## A. CONGELAMIENTO ESPERMÁTICO

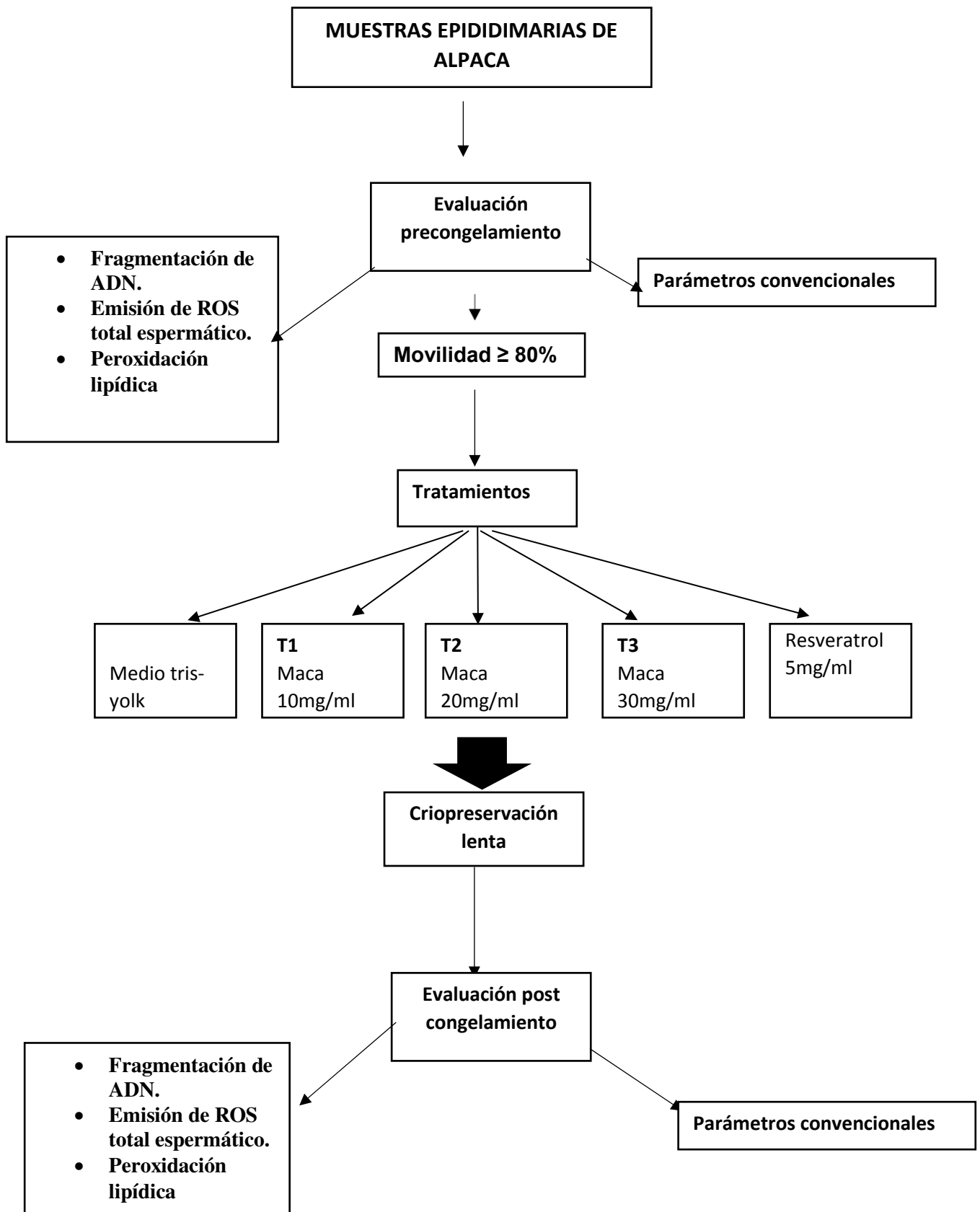


## B. DESCONGELAMIENTO ESPERMÁTICO



**Figura 3.** Criopreservación espermática **A.** Congelamiento espermático  
**B.** Descongelamiento espermático





**Figura 4** Flujoograma del trabajo experimental. Pre: control antes del congelamiento, medio Yolk, Maca 10mg/mL, Maca 20mg/mL, Maca 30mg/mL y Resveratrol 5mg/mL.

## 4.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

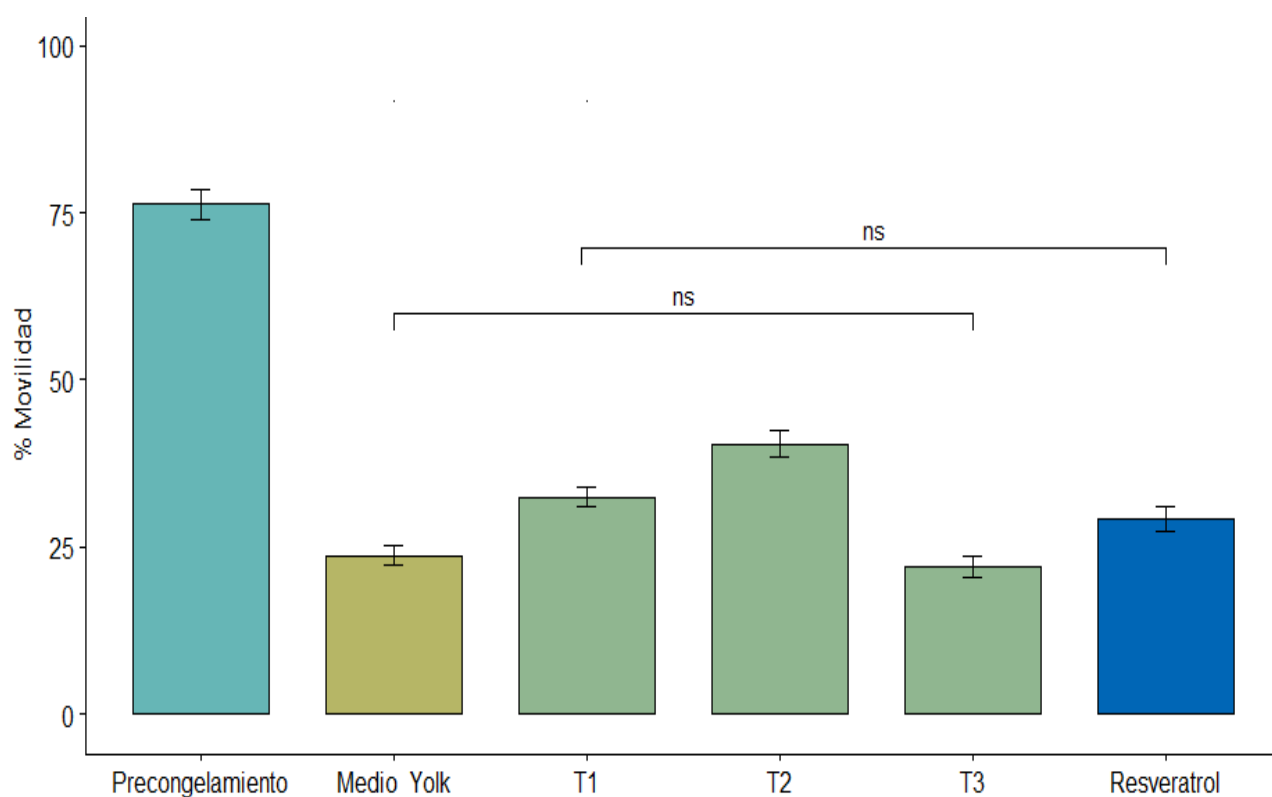
Los datos se analizaron utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y ANOVA para la distribución. Los datos (media  $\pm$  DE) se compararon mediante la prueba t de comparaciones múltiples (prueba no paramétrica). Se utilizó el Test de Wilcoxon para analizar los datos de NBT que no presentaban una distribución normal. El análisis estadístico y la representación gráfica se realizaron utilizando la versión R R-studio 1.4.17173

## CAPÍTULO V: RESULTADOS

### 5.1 PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

#### 5.5.1 Movilidad espermática

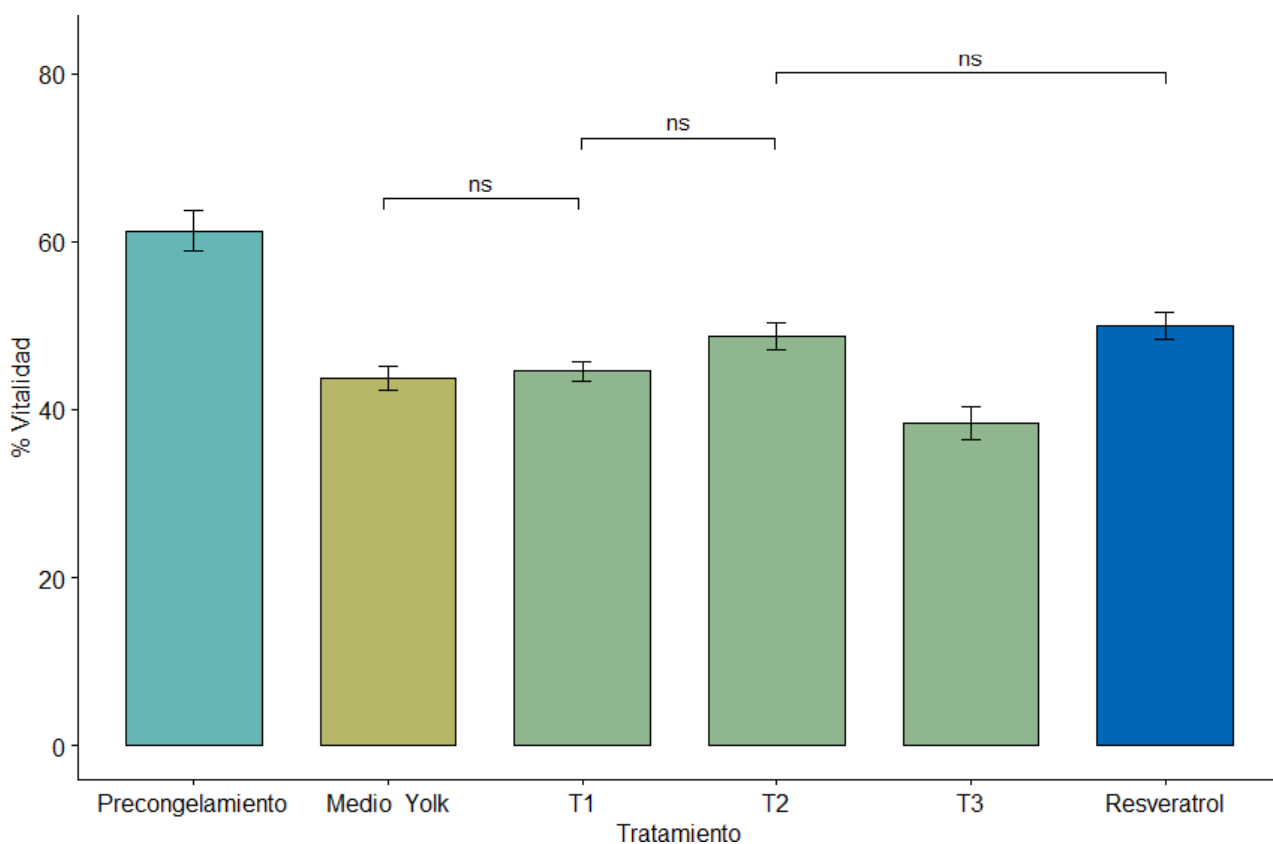
La movilidad espermática se vio afectada significativamente ( $P < 0.05$ ) por el proceso de criopreservación (Fig. 5), la adición de Maca a concentraciones de 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL (T1, T2, y T3) y Resveratrol, mejoraron la movilidad espermática respecto al medio de pre congelamiento. Posterior al congelamiento, el medio con Maca a 20 mg/mL (T2) presentó una mayor movilidad de ( $40.4 \pm 7.22$ ) en comparación con el medio Yolk ( $23.8 \pm 5.28$ )



**Figura 5** Movilidad espermática por tratamiento en fresco y congelación/descongelación. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL. \* Diferencias significativa  $P < 0,05$  precongelamiento y entre cada tratamiento

### 5.5.2 VIABILIDAD ESPERMÁTICA

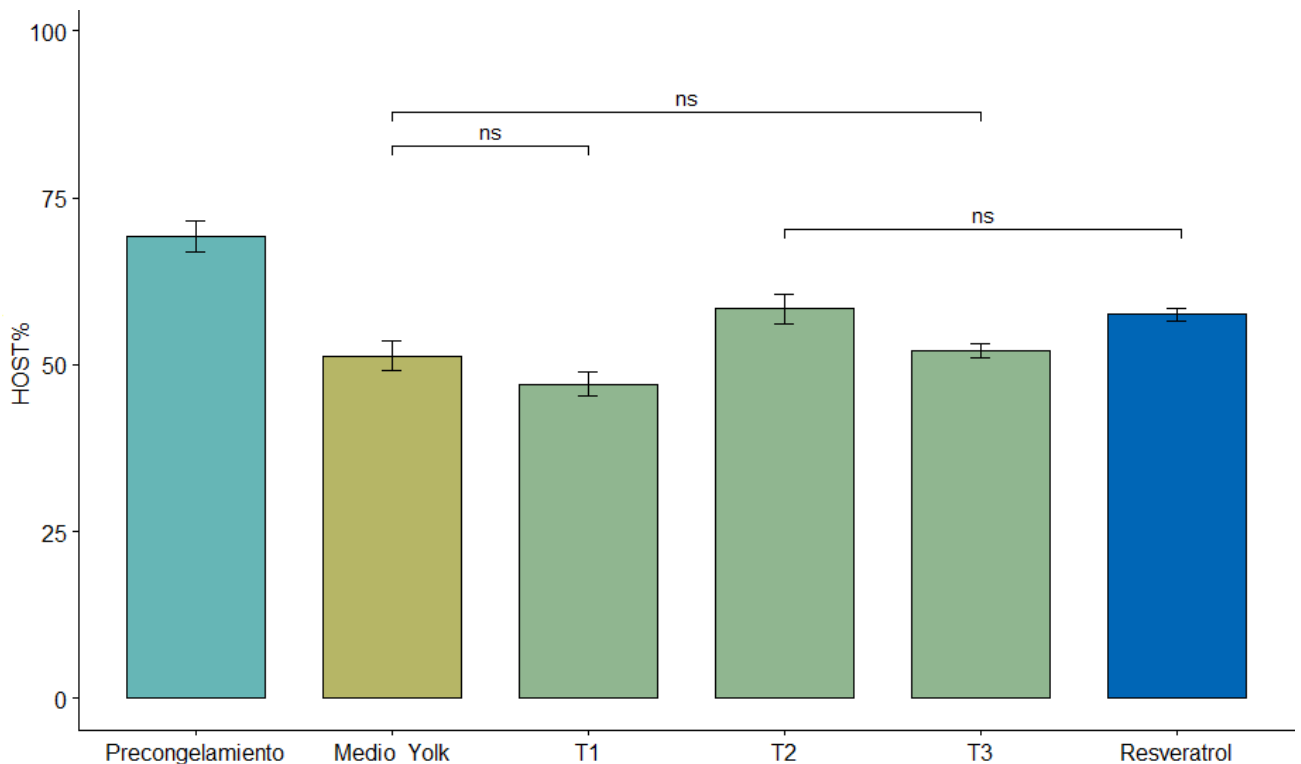
La viabilidad espermática se vio afectada significativamente ( $P < 0.05$ ) por el proceso de criopreservación (Fig. 6), la adición de Maca a concentraciones de 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL (T1, T2, T3) y Resveratrol disminuyeron la viabilidad espermática respecto al medio precongelamiento. Posterior al congelamiento, el medio con Maca a 20 mg/mL (T2) presentó una mejor viabilidad espermática ( $48.8 \pm 5.69$ ) y el Resveratrol ( $50.0 \pm 5.64$ ) en comparación con el medio Yolk ( $43.8 \pm 4.83$ ) (Tabla 1 y Figura 6)



**Figura 6. Viabilidad espermática por tratamiento en fresco y congelación/descongelación.** Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL Diferencia significativa  $P < 0,05$ ; entre el control y cada grupo de tratamiento

## 5.2 INTEGRIDAD DE MEMBRANA (TEST DE HOST)

La integridad de membrana se vio afectada significativamente ( $P < 0.05$ ) por el proceso de criopreservación (Fig. 7), posterior al congelamiento la adición de Maca a 20 mg/mL (T2) presento mayores valores de integridad de membrana de ( $58.33 \pm 7.78$ ) en comparación con el medio Yolk ( $51.25 \pm 7.72$ ) (Tabla 1 y Figura 7).



**Figura 7 Integridad de membrana espermática en fresco y congelación/descongelación.** Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL .

**Tabla 1** Datos de parámetros espermáticos en fresco y congelación/descongelación

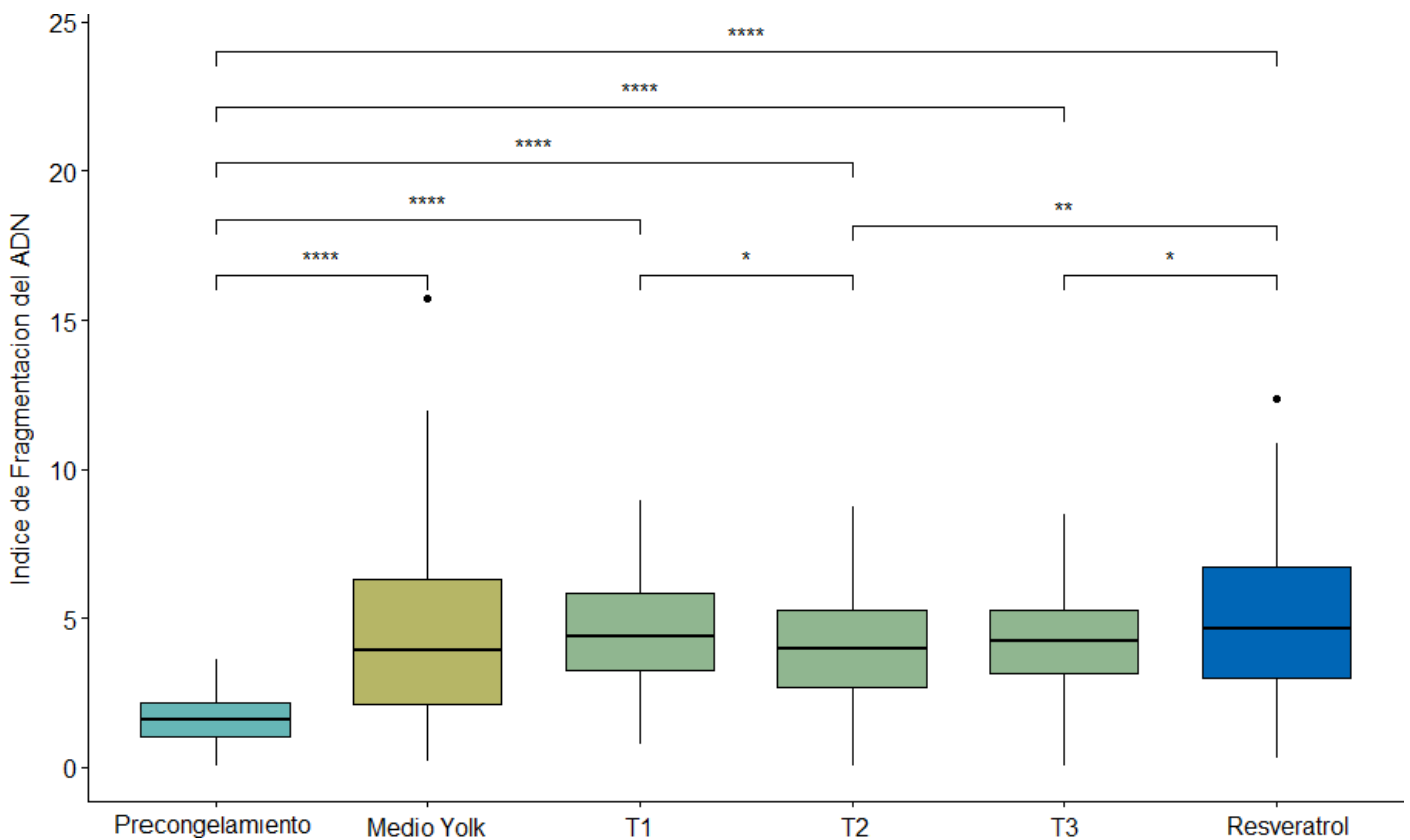
<b>Grupos</b>	<b>% movilidad</b>	<b>% Viabilidad</b>	<b>% HOST</b>
<b>Pre congelamiento</b>	76.2 ± 7.72 <sup>a</sup>	61.25 ± 8.29 <sup>a</sup>	69.16 ± 8.21 <sup>a</sup>
<b>Medio Yolk</b>	23.8 ± 5.28 <sup>b</sup>	43.8 ± 4.83 <sup>b</sup>	51.25 ± 7.72 <sup>b</sup>
<b>T1</b>	32.5±5 <sup>c</sup>	44.6 ± 3.96 <sup>b</sup>	47.1 ± 6.20 <sup>b</sup>
<b>T2</b>	40.4 ± 7.22 <sup>d</sup>	48.8 ± 5.69 <sup>c</sup>	58.33 ± 7.78 <sup>c</sup>
<b>T3</b>	22.1 ±5.42 <sup>b</sup>	38.3 ±6.85 <sup>d</sup>	52.1 ± 3.96 <sup>b</sup>
<b>Resveratrol</b>	29.2 ± 6.34 <sup>c</sup>	50.0 ±5.64 <sup>c</sup>	57.5 ± 3.37 <sup>c</sup>

Diferencia significativa P<0,05; entre el control y cada grupo de tratamiento. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL

<sup>abcd</sup> Letras diferentes entre filas indican diferencia significativa entre grupos

### 5.3 FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO

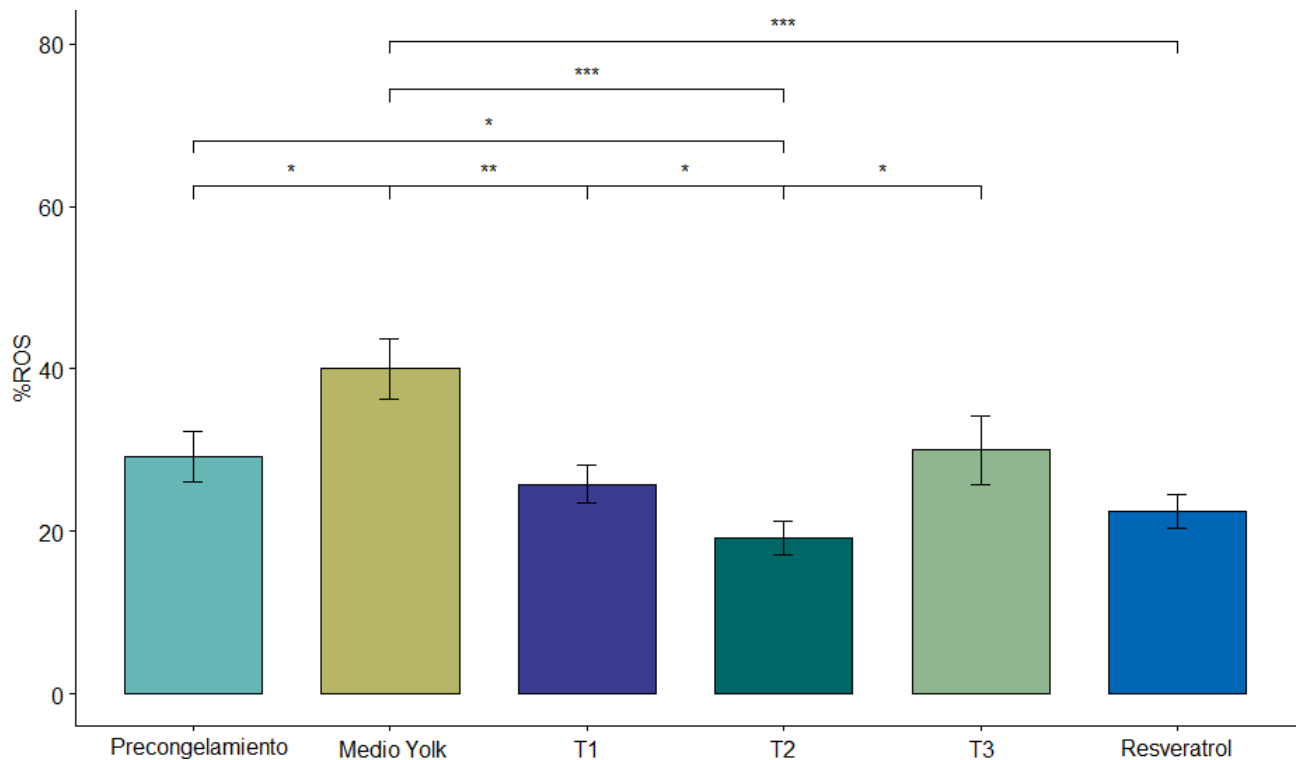
Los siguientes gráficos resaltan los resultados de la fragmentación relativa de ADN por cada individuo. La fragmentación de ADN experimentó un aumento significativo después del congelamiento respecto al medio Yolk, los tratamientos con Maca (T1, T2, T3) y Resveratrol, lo que evidencia daño a nivel del ADN espermático (Tabla 2 y Figura 8)



**Figura 8 Fragmentación relativa del ADN en fresco y Postcongelación/descongelación.** Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL .Las diferencias significativas  $p \leq 0.05$ ; ns:  $p > 0.05$ , \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.00$

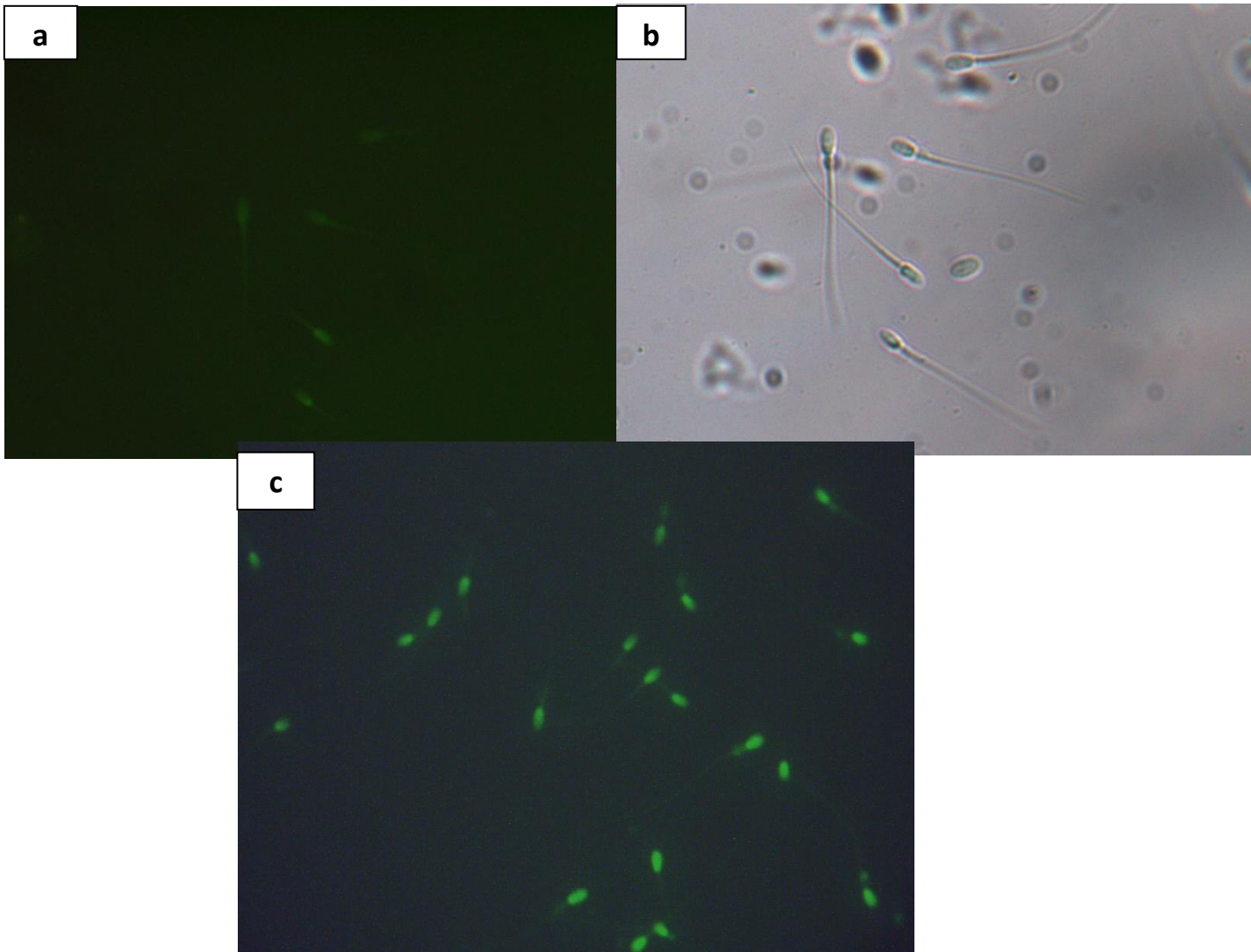
## 5.4 EMISIÓN TOTAL DE ESPECIES REACTIVAS AL OXÍGENO (ROS)

La emisión de especies reactivas al oxígeno (ROS) total de los espermatozoides de alpaca aumentó en el medio Yolk ( $40 \pm 12.6$ ) respecto al estado inicial de pre congelamiento ( $29.2 \pm 10.7$ ). Posterior al congelamiento, los medios con Maca a 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL (T1, T2, T3) y Resveratrol, presentaron menores valores de emisión de ROS total, siendo la Maca a 20 mg/mL con ( $19.2 \pm 7.33$ ) (tabla 2 y figura 9)



**Figura 9 Porcentaje de espermatozoides con una alta cantidad de ROS en fresco y congelación/descongelación.** Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1 :Maca 10mg/mL, T2 : Maca 20mg/mL,T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL .Las diferencias significativas  $p \leq 0.05$ ; ns:  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.00$





**Figura 10 EMISIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL OXIGENO (ROS).** (a) Espermatozoides con baja emisión de ROS. (b) campo claro (c) espermatozoides con alta emisión de ROS (verde intenso). Aumento total: 400x

## 5.5 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

El índice de actividad y función mitocondrial para cada muestra se realizaron en base a la clasificación de depósitos de formazán (ver Fig. 11 y 12), obtenidos del número de celdas clasificadas en cada categoría (Compacto: “C”, Subcompacto: “SC”, Focal: “F”, Residual: “R”).

No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos post descongelamiento



**Figura 11 Depósitos de formazán en la pieza intermedia del espermatozoide.** Se identificaron cuatro depósitos de formazán. C (compacto), Sc (subcompacto), F (focal) y D (difuso) en mitocondrias de espermatozoides de alpaca visualizadas con la técnica NBT. Fotografías tomadas por microscopía óptica 800X

**Tabla 2** Datos de Índice de fragmentación de ADN, ROS e índice de actividad mitocondrial en fresco y post descongelamiento

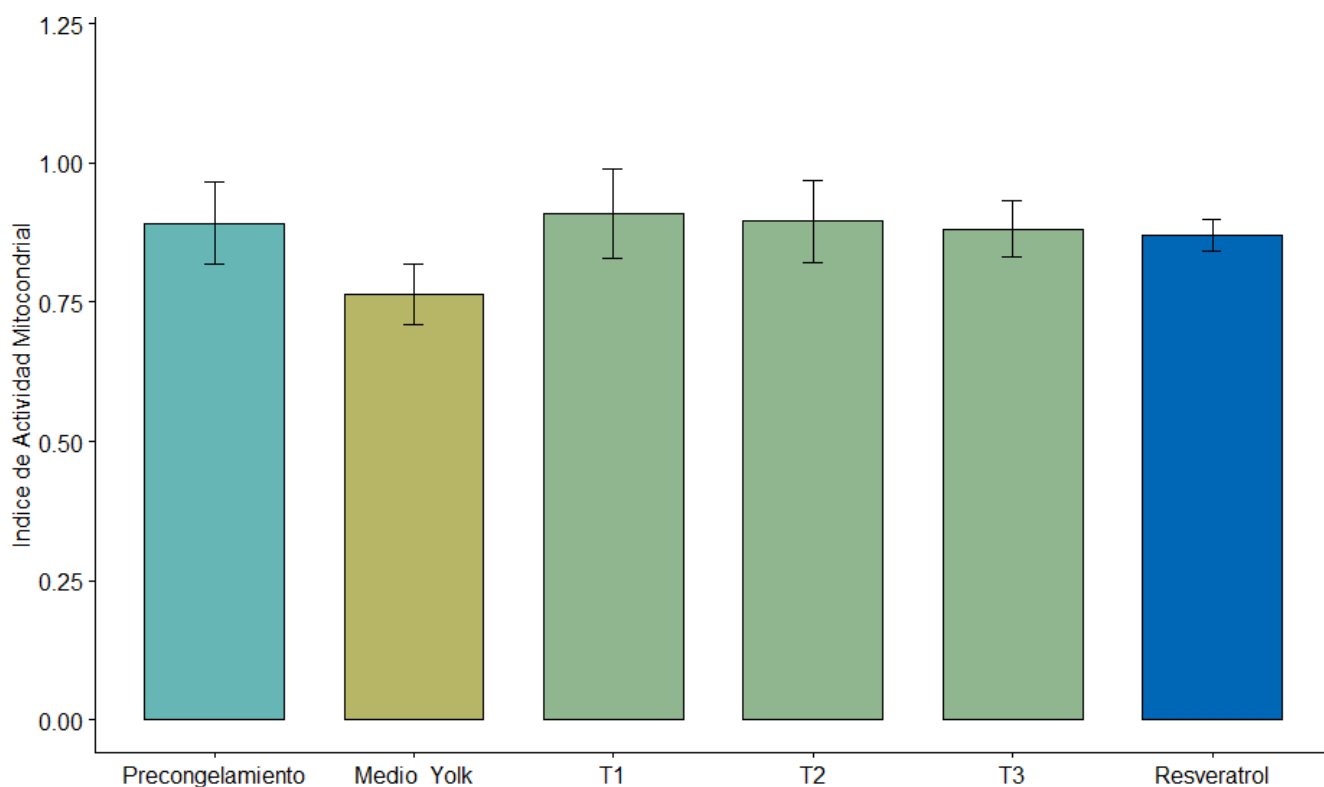
<b>Fragmentación de ADN</b>	<b>ROS %</b>	<b>Índice de actividad mitocondrial</b>
1.64 ± 0.83 <sup>a</sup>	29.2 ± 10.7 <sup>a</sup>	0.89±0.26 <sup>a</sup>
4.47 ± 3.10 <sup>a</sup>	40 ± 12.6 <sup>b</sup>	0,91 ± 0,28 <sup>a</sup>
4.55 ± 1.91 <sup>a</sup>	25.8 ± 7.93 <sup>a</sup>	0,896 ± 0,26 <sup>a</sup>
3.95 ± 1.88 <sup>a</sup>	19.2 ± 7.33 <sup>c</sup>	0,882 ± 0,17 <sup>a</sup>
4.16 ± 1.77 <sup>a</sup>	30 ± 14.8 <sup>a</sup>	0,765± 0,19 <sup>a</sup>
4.90 ± 2.65 <sup>a</sup>	22.5 ± 7.23 <sup>ac</sup>	0.872 ± 0.09

Diferencia significativa P<0,05; entre el control y cada grupo de tratamiento. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL

<sup>abcd</sup> Letras diferentes entre filas indican significativo entre grupos

## 5.6 TASA DE ACTIVIDAD

Se identificaron las tasas de actividad citoquímica según la cantidad de formazán depositada en la vaina mitocondrial donde los patrones Compacto (tinción fuerte y uniforme) y Subcompacto (depósito medio a fuerte) se asociaron con las tasas estándar y sub estándar respectivamente; ambos fueron clasificados como Reacciones Intensivas. Por otro lado, los patrones Focales (pocos depósitos localizados) y Difusa (reacción débil y/o ausente) fueron relacionados con las tasas Baja y Residual respectivamente, agrupados como reacciones reducidas. La comparación de porcentajes de actividad citoquímica espermáticos (Fig. 12) se resume en la Tabla 9



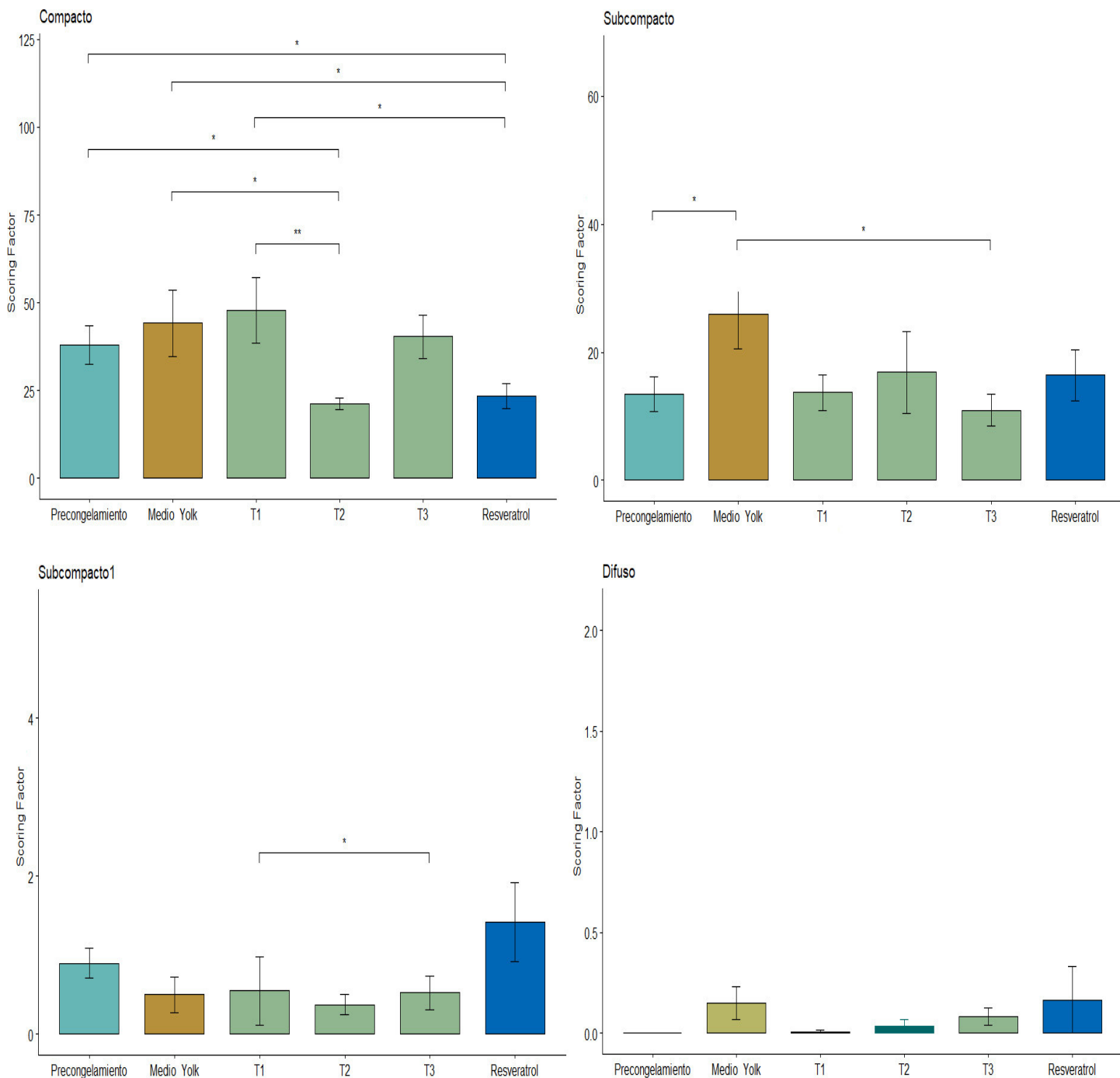
**Figura 12** Índice de actividad mitocondrial en fresco y congelación/descongelación Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL. Las diferencias significativas  $p \leq 0.05$ ; ns:  $p > 0.05$ , \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.00$

**TABLA 3.** Tasas de Actividad Citoquímica de Oxidorreductasas en fresco y postdescongelamiento

	Tasa de actividad (%)					
	Estandar (St)	Sub-estándar (Sub-st)	Bajo (Low)	Residual (Res)	Reacción intensiva (St + Sub- st)	Reacción reducida (Low + Res)
<b>Pre congelamiento</b>	38 ± 19.4	13.5± 9.42	0.90 ±0.65	0	51.5 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>
<b>Medio Yolk</b>	44.2± 32.8	26.0 ± 19.2	0.50 ±0.79	0.15± 0.28	70.2 <sup>b</sup>	0.65 <sup>b</sup>
<b>T1</b>	47.9 ± 32.1	13.7 ± 9.50	0.55 ±1.50	0.01 ±0.03	61.6 <sup>b</sup>	0.55 <sup>c</sup>
<b>T2</b>	21.3 ± 5.61	16.9 ± 22.4	0.38 ±0.45	0.03± 0.12	38.2 <sup>c</sup>	0.41 <sup>c</sup>
<b>T3</b>	40.3 ± 21.2	11.0 ± 8.44	0.53 ±0.73	0.08±0.15	51.3 <sup>a</sup>	0.61 <sup>d</sup>
<b>Resveratrol</b>	23.5 ± 12.4	11.5 ± 9.66	2.22 ±0.46	0.02±0.06	35 <sup>c</sup>	2.22 <sup>c</sup>

Tasas de Actividad citoquímica de oxidorreductasas en los Grupos de Evaluación. Precongelamiento y Post descongelamiento: medio Yolk, T1: Maca 10mg/mL, T2: Maca 20mg/mL, T3: Maca 30mg/mL y Resveratrol Diferencia significativa P<0.05; entre el control y cada grupo de tratamiento. <sup>abcd</sup> Letras diferentes entre filas indican diferencia significativa entre grupos.

Entre los tratamientos con Maca se encontró una reacción significativamente intensiva en el medio Yolk (70,2 %), cercana a l valor del medio T1 con Maca 10mg/mL (71,1 %). La Maca a 30mg/mL presento T3 (51.3%), los menores valores lo presentaron la Maca a 20 mg/mL (T2) y el Resveratrol, 38,2% y 35 % respectivamente. Respecto a las reacciones reducidas, el medio Yolk y Maca a 30mg/mL ( T3) y el Resveratrol mostraron los mayores valores (0,65 %) , (0,61) y ( 2,22) respectivamente , el menor valor fue de la Maca a 20 mg/mL con (0.408) %, evidenciando pobre función mitocondrial .



**Figura 13** Tasas de actividad citoquímica según la cantidad de formazán depositada en fresco y congelación/descongelación. Pre congelamiento: antes del congelamiento, T1 :Maca 10mg/mL, T2 : Maca 20mg/mL,T3: Maca 30mg/mL y control positivo: Resveratrol 5mg/mL .Las diferencias significativas  $p < 0.05$ ; ns:  $p > 0.05$ , \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.00$

## CAPÍTULO VI: DISCUSION DE RESULTADOS

El presente estudio muestra los efectos crioprotectores de *L. meyenii* en los medios de congelamiento sobre los parámetros espermáticos de espermatozoides epididimarios. Además, se incluyó un grupo control antioxidante suplementado con resveratrol como control positivo por sus propiedades antioxidantes.

En este estudio, evaluamos varias características celulares asociadas con la funcionalidad y fertilidad de los espermatozoides, como la viabilidad, la integridad de la membrana plasmática, la integridad del ADN y la función mitocondrial. Nuestros datos sugieren que la adición de maca negra atomizada protege contra el daño post congelamiento a niveles de la movilidad, integridad de membrana y disminución de ROS espermático.

Durante la criopreservación y descongelamiento de gametos, e incluso durante el almacenamiento en nitrógeno líquido se producen daños en los espermatozoides debido a los cambios biofísicos que se dan en este proceso (Grötter *et al.*, 2019). Por ello es importante, utilizar medios con crioprotectores que puedan disminuir el daño fisiológico y bioquímico en los espermatozoides.

Diversos estudios han demostrado que la Maca tiene un efecto sobre la calidad seminal en humanos y sementales que se relaciona con su alto poder y capacidad antioxidante (Buyanbadrakh *et al.*, 2020). Los componentes de *L. meyenii* se han estudiado ampliamente en los últimos años debido a su capacidad antioxidante. La presencia de glucosinolatos y Macamidas, permite que la Maca proteja a las células del daño producido por el estrés oxidativo (Ciani *et al.*, 2017). Por lo tanto, la suplementación del medio de congelación con maca puede considerarse una estrategia válida para reducir el daño criogénico en esta especie.

Uno de los parámetros más relevante debido a su potencial fecundante es la movilidad espermática, en nuestro estudio este parámetro se vio afectado significativamente por el proceso de criopreservación (Fig. 5), la adición de Maca a los medios post congelamiento a concentraciones de 10 mg/mL, 20 mg/mL, 30 mg/mL (T1, T2, T3) mejoraron la movilidad espermática respecto al medio Yolk, existiendo un aumento más significativo en T2 (20mg/mL), con una movilidad de  $(40 \pm 2.45)$  (Tabla 1), estos resultados son

comparables con lo observado en los procesos de criopreservación en espermatozoides de alpaca cuya movilidad inicial que era del 46% descendió hasta el 24% luego del proceso de congelamiento ( Juárez y Santiani, 2019 y Canorio et al., 2015).

Además, en cuanto a la movilidad espermática, algunos investigadores han estudiado el patrón de fosforilación de los espermatozoides, y se especula que inmediatamente después del descongelamiento, el semen criopreservado mostraría un patrón de fosforilación similar al observado en semen fresco sometido a capacitación, por lo que también podría ser un factor adicional al aumento de la movilidad en los espermatozoides post descongelamiento (Pommer *et al.*, 2003).

Por otra parte, Rubio *et al.*, 2006 demostró que en la rata macho con daño inducido por acetato en la espermatogénesis y tratadas con Maca mostraron una mejora en la espermatogénesis. Además, otros estudios demostraron que la suplementación con Maca negra en medios de crioconservación mejoraron la supervivencia y conservaron intacta la actividad de la membrana mitocondrial en células madre espermatogoniales de alpaca (Valdivia *et al.*, 2021).

Otro de los parámetros estudiado fue la prueba HOST, que evalúa si una membrana intacta es bioquímicamente activa, además que la evaluación de la función de la membrana espermática parece ser un marcador significativo de la capacidad fecundante de espermatozoides. También se evaluó la viabilidad espermática para corroborar los resultados del HOST. Se observó que estos parámetros son severamente afectados en los procesos de congelamiento/descongelamiento de espermatozoides epididimarios (Santiani et al. (2005; 2013), Mamani, 2019), Banda et al. ,2010 y (Juárez y Santiani, 2019). Acorde a ello, nuestros datos muestran que estos parámetros fueron afectados por el congelamiento, sin embargo la adición de maca T1 (20 mg/ml) al medio de congelación mejoró la viabilidad y la integridad de la membrana plasmática significativamente.

También se estudió el estrés oxidativo relacionado con la emisión de ROS total, la fragmentación de ADN y la función mitocondrial.

Es importante destacar que la suplementación con maca y resveratrol redujo el flujo de entrada de ROS durante la criopreservación entre todos los grupos de maca y resveratrol en comparación con el grupo medio de yolk. Además, la suplementación con 20 mg/ml de maca mostró la proporción más baja ( $p < 0,05$ ) de células ROS positivas.



Esta disminución del flujo de ROS , es debido a las altas concentraciones de antioxidantes, *L. meyenii* que contiene varios metabolitos secundarios que ayudan a mantener bajos los niveles de ROS, es por ello que los efectos citoprotectores de la Maca están asociados con su actividad antioxidante, al aumentar la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y mediante la eliminación directa de radicales libres (Dzięcioł *et al.*; 2023). Un estudio en ratones ha demostrado que los metabolitos secundarios de la Maca participan en la eliminación de radicales hidroxilo y en la capacidad de eliminación de radicales libres de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, aumentando la actividad de la superóxido dismutasa y glutatión lo que disminuiría el estrés oxidativo (N. Inoue *et al.*, 2016). Sin embargo , existen diversos factores como la coloración de los hipocótilos de Maca o el uso de diferentes métodos de criopreservación, procesamiento y tipos de extracción (metanol, cloroformo, DMSO y agua) de Maca que pueden modificar las concentraciones de metabolitos bioactivos y producir estrés oxidativo (Tafuri *et al.*, 2019).

Además, es importante notar que la dosis más alta de Maca evaluada en este estudio no mostró efectos beneficiosos sobre los parámetros evaluados. De manera similar a lo informado por Leiva-Revilla *et al.* (2022) en bovinos, a este efecto potencialmente dañino de dosis muy altas se le conoce como “efecto hormético”.

La hormesis se define como una respuesta adaptativa a los factores estresantes que resulta en una bifásica relación dosis-respuesta, de modo que la estimulación con dosis bajas da como resultado una adaptación beneficiosa, mientras que una estimulación con dosis altas la dosis produce un efecto tóxico ( Calabrese *et al.*, 2010) . Además, este efecto nocivo podría ser seguido por un exceso de concentración de antioxidantes que al reducir demasiados oxidantes se observaría una eliminación excesiva de ROS , lo que podría ser perjudicial para la función de los espermatozoides que en baja concentraciones, son necesarias para las funciones de los espermatozoides ( Rashki, *et al.*, 2021).

Por lo tanto, es muy recomendable determinar el rango óptimo de concentraciones de cada extracto de maca para ser utilizado posteriormente en estudios *in vitro*.

Otro de los indicadores potenciales de fecundación estudiados fue la fragmentación de ADN espermático. Aunque no encontramos diferencias en la tasa de fragmentación del ADN entre los grupos, si hubo una tendencia hacia una mayor tasa en las muestras criopreservadas acorde a estudios anteriores( Mamani *et al.* , 2019 y Santiani *et al.*, 2005).

En cuanto a la función mitocondrial analizada en este estudio está relacionada con la membrana mitocondrial que contiene ácidos grasos poliinsaturados y, por lo tanto, estos son muy susceptibles a la oxidación por radicales libres, especialmente durante los procedimientos de congelación (Drevet, *et al.*, 2022) .

Respecto a la función mitocondrial, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos post descongelamiento. Resultados similares se observaron en equinos alimentados con Maca en un periodo entre 30 y 120 días, los espermatozoides fueron almacenados a 5°C y posteriormente evaluados a las 24, 48, y 72 horas, aun cuando otros parámetros espermáticos si disminuyeron debido al daño producido por el ROS, no se detectó ninguna diferencia significativa en la peroxidación de lípidos (Del Prete *et al.*, 2018). °

Acorde a ello, Restrepo *et al* (2019), observó la pérdida de movilidad en espermatozoides de equino post descongelamiento pero sin diferencias significativas en la peroxidación lipídica. Esto estaría relacionado debido a que los daños en las membranas biológicas de los espermatozoides pueden causar fusión y pérdida de ácidos grasos saturados e insaturados, lo que podría explicar la menor presencia de lípidos peroxidados. Se podría también especular que este efecto puede estar asociado con una eliminación optimizada de ROS, manteniendo así una actividad mitocondrial controlada. Sin embargo, esta suposición requiere mayores investigaciones a futuro que puedan dilucidar estos mecanismos bioquímicos.

Finalmente es importante investigaciones a futuro que puedan dilucidar marcadores moleculares relacionados con la movilidad, la fertilidad y la capacidad de congelación de los espermatozoides epididimario de alpaca suplementados con maca.

## **CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES**

En conclusión, la suplementación con 20 mg/mL de Maca negra en los medios mejora los parámetros espermáticos como la movilidad espermática, la viabilidad espermática y la integridad de la membrana, también disminuye la emisión de ROS espermáticos totales después de la congelación mostrando la propiedad antioxidante natural de la Maca Negra. Así, la Maca es una alternativa válida como suplemento natural citoprotector en el medio de criopreservación de espermatozoides epididimales de alpacas. Estudios adicionales se centrarán en el uso de espermatozoides crioalmacenado suplementado con Maca en las capacidades de fecundación *In vitro* (IVF) o *in vivo* mediante inseminación artificial (IA).

## CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aitken, R. J., Gibb, Z., Baker, M. A., Drevet, J., & Gharagozloo, P. (2016). Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 1-10.
2. Agarwal, A., Cho, C. L., Esteves, S. C., & Majzoub, A. (2017). Reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Translational Andrology and Urology*, 6(Suppl 4), S695
3. Aliakbari, F., Gilani, M. A. S., Amidi, F., Baazm, M., Korouji, M., Izadyar, F., Yazdekhasti H. & Abbasi, M. (2016). Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. *Cellular Reprogramming (Formerly" Cloning and Stem Cells")*, 18(2), 87-95.
4. Amidi, F., Pazhohan, A., Nashtaei, M. S., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking*, 17(4), 745-756.
5. Banda J, Canorio Pariona, N., Paredes Arnedo, F., & Valdivia Cuya, M. (2015). Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(3), 434-443.
6. Buyanbadrakh, E., Hong, H.S., Lee, K.W., Huang, W.Y. and Oh, J.H. (2020) Anti-oxidant activity, Macamide B content and muscle cell protection of Maca (*Lepidium meyenii*) extracted using ultrasonication-assisted extraction. *Microbiol. Biotechnol. Lett.*, 48(2): 129–13
7. Calabrese, E.J., Mattson, M.P. and Calabrese, V. (2010) Resveratrol commonly displays hormesis: Occurrence and biomedical significance. *Hum. Exp. Toxicol.*, 29(12): 980–1015 fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(12), 561-569.  
<https://doi.org/10.1007/s10815-007-9177-y>

8. Carretero, M. I., Giuliano, M. S., & Neild, D. M. (2017). Evaluación de la calidad del ADN espermático en camélidos sudamericanos y otras especies domésticas.
9. Castillo P, Lock O. (2005) Compuestos con actividad antioxidante en la especie *Lepidium meyenii* (Walp). *Rev Soc Quim Peru.*;71(4):227-36.
10. Choez, K., Ruiz, L., Sandoval, R., Evangelista, S., & Santiani, A. (2017). Determinación de la concentración óptima de tres crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(3), 619-628
11. Choi EH, Kang JI, Cho JY, Lee SH, Kim TS, Yeo IH, et al. (2012) Supplementation of standardized lipid-soluble extract from Maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats. *Journal of Functional Foods*. 4(2):568-73.
12. Ciani F, Cocchia N, Del Prete C, Palumbo V, Carotenuto D, Pasolini MP, Tafuri S. (2017). Sperm chromatin integrity in stallions with *Lepidium meyenii* (Maca) dietary supplementation. *Reprod Domest Anim*. 52(3):7
13. Del Prete, C., Tafuri, S., Ciani, F., Pasolini, M. P., Ciotola, F., Albarella, S., ... & Cocchia, N. (2018). Influences of dietary supplementation with *Lepidium meyenii* (Maca) on stallion sperm production and on preservation of sperm quality during storage at 5 C. *Andrology*, 6(2), 351-361.

14. Du Plessis S., Makker K., Desai N.& Agarwal A. (2008) The impact of oxidative stress on in vitro fertilization. *Expert Review Of Obstetrics & Gynecology* 3(4),539–554
15. Drevet, J. R., Hallak, J., Nasr-Esfahani, M. H., & Aitken, R. J. (2022). Reactive oxygen species and their consequences on the structure and function of mammalian spermatozoa. *Antioxidants & Redox Signaling*, 37(7-9), 481-500.
16. Dzięcioł, M., Wróblewska, A., & Janda-Milczarek, K. (2023). Comparative Studies of DPPH Radical Scavenging Activity and Content of Bioactive Compounds in Maca (*Lepidium meyenii*) Root Extracts Obtained by Various Techniques. *Applied Sciences*, 13(8), 4827.
17. Faridullah, H., Eva, T., Peter, M., Robert, S., & Norbert, L. (2015). Effects of biological active substances to the spermatozoa quality. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2019, 263-267.
18. Fahy GM., (1986). The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*. 23: 1-13.
19. Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Alvarez, J. G., Thomas Jr, A. J., & Agarwal, A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction*, 16(9), 1922-1930.
20. Grötter, L. G., Cattaneo, L., Marini, P. E., Kjelland, M. E., & Ferré, L. B. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(4), 655-665.
21. Gonzales, G. F., Villaorduña, L., Gasco, M., Rubio, J., & Gonzales, C. (2014). Maca (*Lepidium meyenii* Walp), una revisión sobre sus propiedades biológicas. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 31(1), 100-110
22. Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of Resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative food science & emerging technologies*, 11(1), 210-218.
23. Huanca, W. (2013). Los desafíos en el manejo reproductivo de los camélidos sudamericanos. *ALPA*, 21(4), 233-236.

24. Hrudka, F. (1979). Cytochemistry of oxidoreductases in spermatozoa: The technique revisited. *Andrologia*, 11(5), 337-353.
25. Juárez, J., & Santiani, A. (2019). Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(3), 1175-1183.
26. Koppers, A. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., McLaughlin, E. A., & Aitken, R. J. (2008). Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(8), 3199-3207.
27. Leiva-Revilla, J., Rolón, M., Siyadatpanah, A., de Lourdes Pereira, M., & Nissapatorn, V. (2022). First study of in vitro protective effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on frozen–thawed bovine spermatozoa. *Veterinary World*, 15(6), 1481.
28. Majzoub, A., & Agarwal, A. (2020). Antioxidants in Sperm Cryopreservation. In *Male Infertility* (pp. 671-678). Springer, Cham.
29. Mamani-Mango, G.; Gonzales, M.M.; Hidalgo, M.R.; Mallma, J.M.; Béjar, J.R.; Palma, V.R.; Salas, E.M. Effect of Extender and Freezing Rate on Quality Parameters and In Vitro Fertilization Capacity of Alpaca Spermatozoa Recovered from Cauda Epididymis. *Biopreservation Biobanking* 2019, 17, 39–45. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0021>
30. Mazur P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am JPhysiol*. 247: C125-C142.
31. Medeiros CM, Forel F, Oliveira AT, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00674-4
32. MINCETUR. Informe 113-2018- PROMPERU. PROMPERU. 2018:20pp.
33. Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca sperm: a comparison of citrate- Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev* 19:792-796.
34. Morton K, Evans G, Maxwell W. (2010). Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the

- motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74:311-316.
35. Naresh, S., & Atreja, S. K. (2015). The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. *Cryobiology*, 70, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.03.008>
  36. Nicolás-Méndez, T., Ortiz-Muñiz, A. R., Mendoza-Núñez, V. M., & García-Rodríguez, M. D. C. (2020). El papel del Resveratrol sobre el estrés oxidante inducido por metales pesados. *Nutrición Hospitalaria*, 37(2), 374-383.
  37. Nova, Z., Skovierova, H., Strnadel, J., Halasova, E., & Calkovska, A. (2020). Short-term versus long-term culture of A549 cells for evaluating the effects of lipopolysaccharide on oxidative stress, surfactant proteins and cathelicidin LL-37. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1148.
  38. N. Inoue, C. Farfan and G. F. Gonzales. (2016) Effect of butanolic fraction of yellow and black Maca (*Lepidium meyenii*) on the sperm count of adult mice, *Andrology*, 48, 915–921.
  39. O'Flaherty, C., Beorlegui, N., & Beconi, M. T. (2003). Participation of superoxide anion in the capacitation of cryopreserved bovine sperm. *International journal of andrology*, 26(2), 109-114.
  40. Organización Mundial de la Salud. OMS "WHO Laboratory Manual for the examination and processing of human semen" ,6ta edición. (2021)
  41. O'Neill, H. C., Nikoloska, M., Ho, H., Doshi, A., & Maalouf, W. (2019). Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 36(8), 1713-1720.
  42. Oré MR. Efectos hipolipémicos y antioxidante de *Lepidium meyenii* Walp en ratas [Tesis para optar el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
  43. Pariona, C., & Milagro, N. (2009). Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*).
  44. Pommer, A. C., Rutllant, J., & Meyers, S. A. (2003). Phosphorylation of protein tyrosine residues in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa under capacitating conditions. *Biology of reproduction*, 68(4), 1208-1214.
  45. Quina, E. (2017). Inseminación artificial de alpacas en un contexto de crianza campesina.



46. Rashki Ghaleno, L., Alizadeh, A., Drevet, J. R., Shahverdi, A., & Valojerdi, M. R. (2021 ) Oxidation of sperm DNA and male infertility. *Antioxidants*, , 10(1), 97. <https://doi.org/10.3390/antiox10010097>
47. Ratto M, Wolter M, Gómez C, Berland M. (1999). Refrigeration of epididymal sperm from lama with three different extenders. En: II Congreso Mundial sobre camélidos. Cusco
48. Restrepo, G., Varela, E., Duque, J. E., Gómez, J. E., & Rojas, M. (2019). Freezing, vitrification, and freeze-drying of equine spermatozoa: Impact on mitochondrial membrane potential, lipid peroxidation, and DNA integrity. *Journal of equine veterinary science*, 72, 8-15.
49. Rezaei, N., Mohammadi, M., Mohammadi, H., Khalatbari, A., & Zare, Z. (2020). Acrosome and chromatin integrity, oxidative stress, and expression of apoptosis-related genes in cryopreserved mouse epididymal spermatozoa treated with L-Carnitine. *Cryobiology*.
50. Rosato, M. & Laffaldano, N. (2013). Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79(3), 508-516
51. Rubio, J., Riqueros, M.I., Gasco, M., Yucra, S., Miranda, S. and Gonzales, G.F. (2006) *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-damage on reproductive function in male rats. *Food Chem. Toxicol.*, 44(7): 1114–1122. 39.
52. Santiani A. ( 2003). Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis Magister en Ciencias. Temuco, Chile: Univ. La Frontera. 95p.
53. Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.* 7:303-309.
54. Santiani A, Ruiz L, Sandoval R, Evangelista S, Urviola M, Catacora N, Coronado L, Delgado A. (2007). Incremento de la tasa de no retorno en celo en ovejas utilizando un antioxidante análogo a superóxido dismutasa (Tempo) durante la criopreservación de semen. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15 (Suppl 1):347.

55. Sikka, S. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1, e78-86.
56. Tafuri, S.; Cocchia, N.; Carotenuto, D.; Vassetti, A.; Staropoli, A.; Mastellone, V.; Peretti, V.; Ciotola, F.; Albarella, S.; Del Prete, C.; et al. (2019) Chemical analysis of *Lepidium meyenii* (Maca) and its effects on redox status and on reproductive biology in stallions. *Molecules* , 24, 1981
57. Valdivia, M., Bravo, Z., Reyes, J., & Gonzales, G. F.(2021) Rescue and conservation of male adult alpacas (*Vicugna pacos*) based on spermatogonial stem cell biotechnology using atomized Black Maca as a supplement of cryopreservation medium. *Frontiers in Veterinary Science* , 8, 597964. DOI: 10.3389/fvets.2021.597964
58. Valdivia M, Yarasca K, Lévano G, Vásquez J, Temoche H, Torres L, et al. (2016). Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on testicular function of mice with chemically and physically induced subfertility. *Andrologia*.;48(8):927-34

## CAPÍTULO IX: ANEXOS

### Anexo N°1. Datos y estadísticos de parámetros espermáticos

#### Movilidad espermática (%)

MUESTRA	PRECONG ELAMIEN TO	Medio Yolk	maca 10mg/ml	maca 20mg/ml	maca 30mg/m l	resveratrol
1	75	10	15	25	10	15
2	80	25	30	40	35	35
3	90	45	40	50	20	30
4	85	35	30	40	30	35
5	85	25	30	35	30	18
6	80	25	30	35	30	30
7	75	20	30	45	30	35
8	80	15	30	40	20	30
9	90	10	15	20	15	15
10	75	20	15	30	20	15
11	80	20	15	25	20	20
12	75	15	20	25	20	15

#### Estadísticos descriptivos

```
# A tibble: 6 x 4
  Tratamiento    mean    SD    CV
  <chr>          <dbl> <dbl> <dbl>
1 Medio_yolk    23.8  5.28  22.2
2 Precongelamiento 76.2  7.72  10.1
3 Resveratrol   29.2  6.34  21.7
4 T1            32.5  5     15.4
5 T2            40.4  7.22  17.9
6 T3            22.1  5.42  24.5
```

### Viabilidad espermática (%)

MUESTRA	PRECONGELAMIENTO	Medio Yolk	maca 10mg/ml	maca 20mg/ml	maca 30mg/ml	resveratrol
1	75	10	15	25	10	15
2	80	25	30	40	35	35
3	90	45	40	50	20	30
4	85	35	30	40	30	35
5	85	25	30	35	30	18
6	80	25	30	35	30	30
7	75	20	30	45	30	35
8	80	15	30	40	20	30
9	90	10	15	20	15	15
10	75	20	15	30	20	15
11	80	20	15	25	20	20
12	75	15	20	25	20	15

### Estadísticos descriptivos

Tratamiento <chr>	mean <dbl>	SD <dbl>	CV <dbl>
1 Medio_yolk	43.8	4.83	11.0
2 Precongelamiento	61.2	8.29	13.5
3 Resveratrol	50	5.64	11.3
4 T1	44.6	3.96	8.89
5 T2	48.8	5.69	11.7
6 T3	38.3	6.85	17.9

## HOST(%)

MUESTRA	PRECONGELAMIENTO	Medio Yolk	T1	T2	T3	Resveratrol
1	70	45	60	65	60	55
2	75	50	45	65	55	60
3	65	45	45	55	50	55
4	60	65	55	45	50	55
5	65	50	45	65	55	60
6	60	45	45	55	50	55
7	70	50	40	65	55	60
8	60	45	45	55	50	55
9	85	50	45	65	45	60
10	75	45	40	55	50	55
11	80	65	55	45	50	65
12	65	60	45	65	55	55

### Estadísticos descriptivos

Tratamiento	mean	SD	CV
<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>
Medio_yolk	51.2	7.72	15.1
Precongelamiento	69.2	8.21	11.9
Resveratrol	57.5	3.37	5.86
T1	47.1	6.20	13.2
T2	58.3	7.78	13.3
T3	52.1	3.96	7.61

**Anexo N°3.** Datos y estadísticos de ROS, fragmentación de ADN y peroxidación lipídica

**ROS (%)**

	<b>Precongelamiento</b>	<b>Medio Yolk</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>Resveratrol</b>
<b>1</b>	50	30	10	10	20	10
<b>2</b>	40	30	25	20	25	20
<b>3</b>	25	40	25	20	50	15
<b>4</b>	15	25	35	30	30	25
<b>5</b>	20	30	25	35	60	20
<b>6</b>	18	25	20	15	30	30
<b>7</b>	25	50	25	10	25	25
<b>8</b>	25	60	35	20	30	30
<b>9</b>	25	50	25	15	45	35
<b>10</b>	28	40	25	20	20	25
<b>11</b>	38	40	20	15	15	20
<b>12</b>	41	60	40	20	10	15

**Descriptivos**

<b>Grupo s</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Estandar</b>
Pre	29.2	10.7
T1	40	12.6
T2	25.8	7.93
T3	19.2	7.33
T4	30	14.8
T5	22.5	7.23

### Análisis Estadístico (wilcox.test)

Comparaciones		p value	
Pre	T1	0.030	*
Pre	T2	0.509	ns
Pre	T3	0.0153	*
Pre	T4	0.930	ns
Pre	T5	0.159	ns
T1	T2	0.0038	**
T1	T3	0.00024	***
T1	T4	0.069	ns
T1	T5	0.000971	***
T2	T3	0.0229	*
T2	T4	0.637	ns
T2	T5	0.310	ns
T3	T4	0.0426	*
T3	T5	0.224	ns
T4	T5	0.241	ns

## Fragmentación de ADN

### Descriptivos

Grupos	Media	Desv. Estandar
Pre	1.201644	0.2652162
T1	3.790630	0.6670843
T2	3.349094	0.6365475
T3	3.320535	0.5134133
T4	3.268735	0.5249112

### Análisis Estadístico (T-Test)

Comparaciones		p value	
Pre	T1	0.000000102	****
Pre	T2	0.000000413	****
Pre	T3	0.0000000216	****
Pre	T4	0.0000000411	****
T1	T2	0.147	ns
T1	T3	0.0955	ns
T1	T4	0.0685	ns
T2	T3	0.913	ns
T2	T4	0.762	ns
T3	T4	0.826	ns



## Peroxidación lipídica

Data de patrones de NBT

Muestra		Tasa de actividad (%)			
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
1	Precongelamiento	28	17	7	0
	Medio Yolk	17	76	6	5
	T1	33	39	0	0
	T2	11	2	1	0
	T3	15	5	0	0
	Resveratrol	18	32	4	2
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
2	Precongelamiento	29	9	2	0
	Medio Yolk	34	13	0	0
	T1	92	33	0	0
	T2	24	6	0	0
	T3	53	2	1	0
	Resveratrol	30	6	0	0
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
3	Precongelamiento	32	4	0	0
	Medio Yolk	28	11	0	0
	T1	92	23	0	0
	T2	10	3	1	0
	T3	54	12	0	5
	Resveratrol	18	45	2	0
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
4	Precongelamiento	27	9	0	0
	Medio Yolk	6	10	2	0
	T1	31	17	0	0
	T2	24	13	1	0
	T3	16	5	2	1
	Resveratrol	27	3	0	0
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
5	Precongelamiento	24	15	6	0

	Medio Yolk	35	46	0	0
	T1	86	44	0	0
	T2	25	12	1	0
	T3	16	1	0	0
	Resveratrol	29	15	4	0
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
6	Precongelamiento	17	40	4	0
	Medio Yolk	67	18	8	9
	T1	92	23	0	0
	T2	21	3	0	0
	T3	55	22	1	1
	Resveratrol	21	19	4	0
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
7	Precongelamiento	67	13	2	0
	Medio Yolk	30	53	1	0
	T1	27	2	0	0
	T2	22	4	2	0
	T3	30	13	2	1
	Resveratrol	9	35	2	0
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
8	Precongelamiento	74	18	2	0
	Medio Yolk	95	5	0	1
	T1	27	12	17	1
	T2	18	14	5	0
	T3	19	15	9	0
	Resveratrol	58	16	1	0
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
9	Precongelamiento	58	10	3	0
	Medio Yolk	115	19	0	0
	T1	35	17	0	0
	T2	24	17	0	0
	T3	32	20	2	0
	Resveratrol	19	7	0	0

		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
10	Precongelamiento	42	48	2	0
	Medio Yolk	54	59	1	1
	T1	14	16	5	0
	T2	28	89	3	4
	T3	70	38	1	2
	Resveratrol	16	6	0	0
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
11	Precongelamiento	44	17	5	0
	Medio Yolk	24	56	2	2
	T1	16	4	0	0
	T2	25	90	1	0
	T3	70	35	1	0
	Resveratrol	19	6	0	0
		Compacto	Subcompacto	Subcompacto	Difuso
12	Precongelamiento	14	31	3	0
	Medio Yolk	25	80	0	0
	T1	30	5	0	0
	T2	24	36	0	0
	T3	54	20	2	0
	Resveratrol	18	7	0	0

### Índice de actividad mitocondrial

<b>Muestra</b>		<b>Índice de actividad mitocondrial</b>
1	Precongelamiento	0,807
	Medio Yolk	0,697
	T1	0,838
	T2	0,907
	T3	0,925
	Resveratrol	0,746
2	Precongelamiento	0,8975
	Medio Yolk	0,458
	T1	0,9208
	T2	0,94
	T3	0,977
	Resveratrol	0,95
3	Precongelamiento	0,966
	Medio Yolk	0,457
	T1	0,94
	T2	0,8857
	T3	0,8859
	Resveratrol	0,771
4	Precongelamiento	0,916
	Medio Yolk	0,7556
	T1	0,8937
	T2	0,8789
	T3	0,841
	Resveratrol	0,97
5	Precongelamiento	0,8066

	Medio Yolk	0,8296
	T1	0,89846
	T2	0,8868
	T3	0,9823
	Resveratrol	0,84791
6	Precongelamiento	0,757377
	Medio Yolk	0,8127
	T1	0,94
	T2	0,9625
	T3	0,8962
	Resveratrol	0,80681
7	Precongelamiento	0,9353
	Medio Yolk	0,802
	T1	0,9793
	T2	0,907
	T3	0,8652
	Resveratrol	0,741
8	Precongelamiento	0,9255
	Medio Yolk	0,986
	T1	0,6881
	T2	0,6976
	T3	0,7155
	Resveratrol	0,926
9	Precongelamiento	0,9281
	Medio Yolk	0,9503
	T1	0,8849
	T2	1,025
	T3	0,8792
	Resveratrol	0,919

10	Precongelamiento	1.588
	Medio Yolk	0,91142
	T1	0,7628
	T2	1.5266
	T3	1,277
	Resveratrol	0,808
11	Precongelamiento	0,6239
	Medio Yolk	0,556
	T1	0,4947
	T2	0,712
	T3	0,8540
	Resveratrol	1.05454
12	Precongelamiento	0,554
	Medio Yolk	0,964
	T1	1,675
	T2	0,424
	T3	0,5444
	Resveratrol	0,916

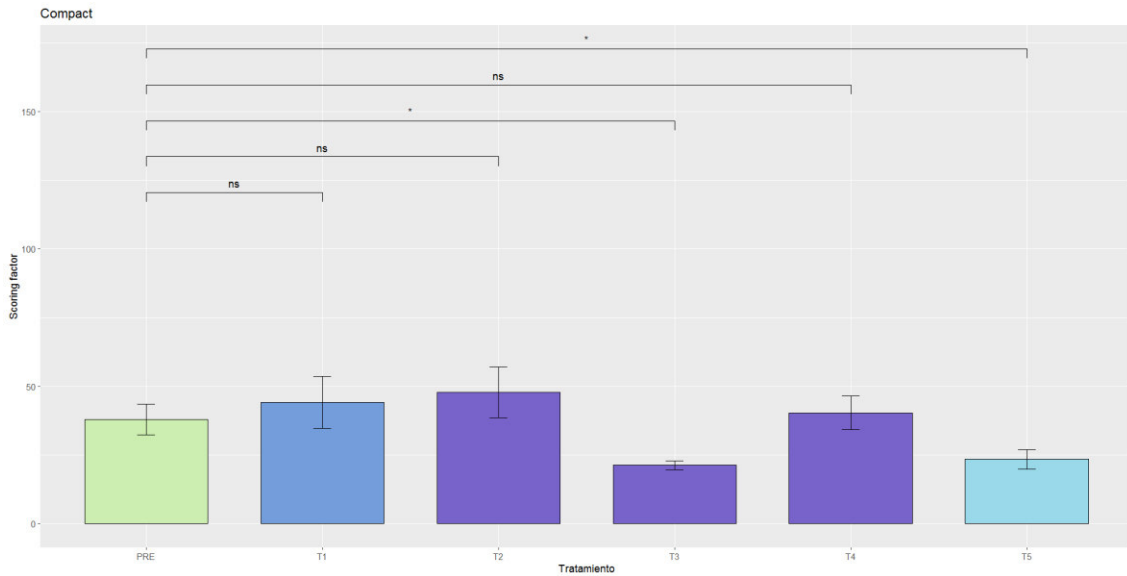
### Estadístico índice de actividad mitocondrial

Tratamiento	mean	SD	CV
<chr>	<dbl>	<dbl>	<dbl>
Before.freezing	0.892	0.255	28.5
Rezveratrol	0.871	0.0992	11.4
T1	0.910	0.277	30.4
T2	0.896	0.255	28.5
T3	0.882	0.171	19.4
yolk.medium	0.765	0.188	24.6

**Análisis Estadístico (wilcox.test)**

<b>Comparaciones</b>		<b>p value</b>	
Pre	T1	0.772	ns
Pre	T2	0.977	ns
Pre	T3	1	ns
Pre	T4	0.885	ns
Pre	T5	0.977	ns
T1	T2	0.817	ns
T1	T3	0.729	ns
T1	T4	0.583	ns
T1	T5	0.685	ns
T2	T3	0.908	ns
T2	T4	0.977	ns
T2	T5	0.977	ns
T3	T4	0.729	ns
T3	T5	1	ns
T4	T5	0.79	ns

## SCORING FACTOR COMPACT



**Figura 1.** Se aplicó la prueba wilcox.test para muestras pareadas. ns:  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.00$

### Descriptivos

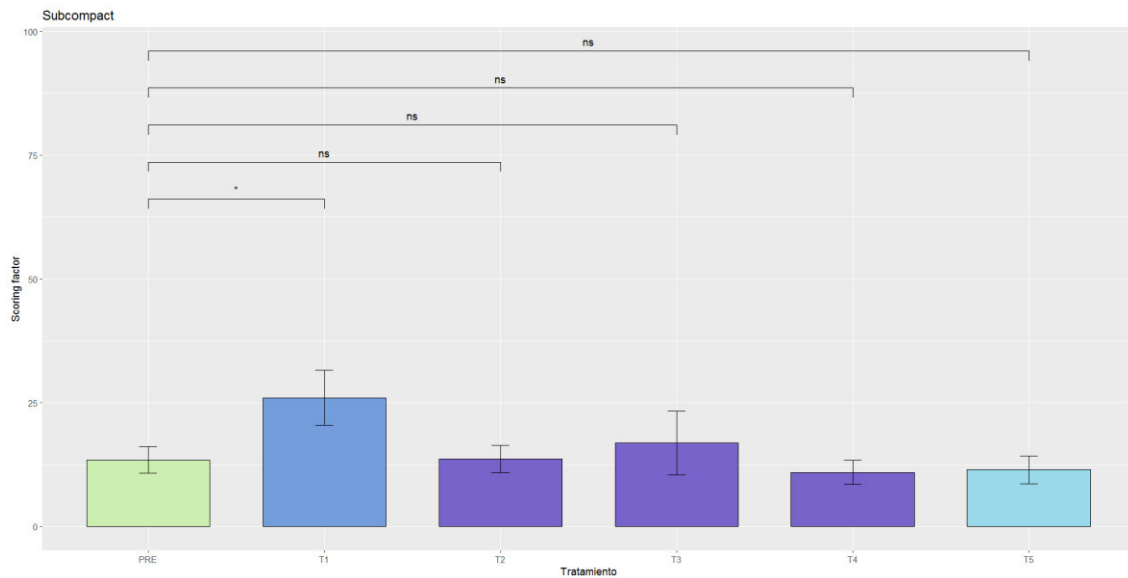
Grupos	Media	Desv. Estandar
Pre	38	19.4
T1	44.2	32.8
T2	47.9	32.1
T3	21.3	5.61
T4	40.3	21.2
T5	23.5	12.4



### Análisis Estadístico (wilcox.test)

Comparaciones		p value	
Pre	T1	0.885	ns
Pre	T2	0.563	ns
Pre	T3	0.009	**
Pre	T4	0.862	ns
Pre	T5	0.049	*
T1	T2	0.885	ns
T1	T3	0.014	*
T1	T4	0.954	ns
T1	T5	0.049	*
T2	T3	0.004	**
T2	T4	0.685	ns
T2	T5	0.0257	*
T3	T4	0.0598	ns
T3	T5	0.750	ns
T4	T5	0.118	ns

### SUBCOMPACTO



**Figura 2.** Se aplicó la prueba wilcox.test para muestras pareadas. ns:  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.00$

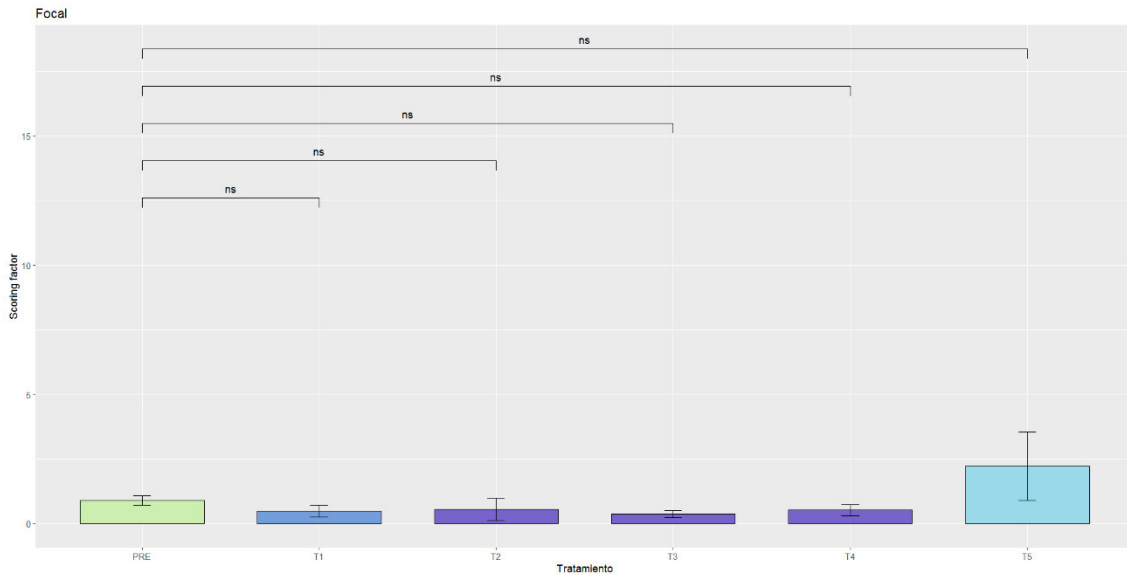
### Descriptivos

Grupos	Media	Desv. Estandar
Pre	13.5	9.42
T1	26.0	19.2
T2	13.7	9.50
T3	16.9	22.4
T4	11.0	8.44
T5	11.5	9.66

### Análisis Estadístico (wilcox.test)

Comparaciones		p value	
Pre	T1	0.0437	*
Pre	T2	0.908	ns
Pre	T3	0.370	ns
Pre	T4	0.623	ns
Pre	T5	0.386	ns
T1	T2	0.133	ns
T1	T3	0.133	ns
T1	T4	0.0829	ns
T1	T5	0.0461	*
T2	T3	0.452	ns
T2	T4	0.435	ns
T2	T5	0.603	ns
T3	T4	0.908	ns
T3	T5	0.623	ns
T4	T5	0.885	ns

## FOCAL



**Figura 3.** Se aplicó la prueba wilcox.test para muestras pareadas. ns:  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.00$

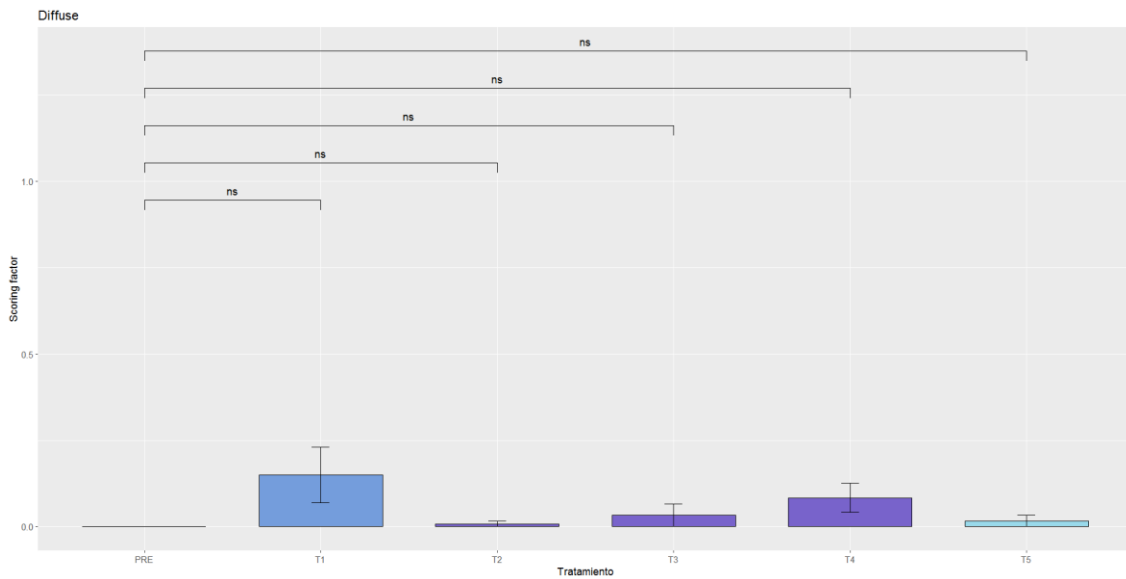
### Descriptivos

Grupos	Media	Desv. Estandar
Pre	0.9	0.652
T1	0.5	0.792
T2	0.55	1.50
T3	0.375	0.445
T4	0.525	0.725
T5	2.22	4.58

### Análisis Estadístico (wilcox.test)

Comparaciones		p value	
Pre	T1	0.0659	ns
Pre	T2	0.0533	ns
Pre	T3	0.0597	ns
Pre	T4	0.0542	ns
Pre	T5	0.172	ns
T1	T2	0.179	ns
T1	T3	0.832	ns
T1	T4	0.451	ns
T1	T5	0.780	ns
T2	T3	0.069	ns
T2	T4	0.034	*
T2	T5	0.139	ns
T3	T4	0.566	ns
T3	T5	1	ns
T4	T5	0.787	ns

### DIFFUSO



**Figura 4.** Se aplicó la prueba wilcox.test para muestras pareadas. ns:  $p > 0.05$ , \*:  $p \leq 0.05$ , \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.00$

Descriptivos

Grupos	Media	Desv. Estandar
Pre	0	0
T1	0.15	0.278
T2	0.008	0.0289
T3	0.033	0.115
T4	0.0833	0.147
T5	0.0167	0.0577

**Análisis Estadístico (wilcox.test)**

Comparaciones		p value	
Pre	T1	0.0564	ns
Pre	T2	0.359	ns
Pre	T3	0.359	ns
Pre	T4	0.0563	ns
Pre	T5	0.359	ns
T1	T2	0.0574	ns
T1	T3	0.0808	ns
T1	T4	0.846	ns
T1	T5	0.0743	ns
T2	T3	1	ns
T2	T4	0.0620	ns
T2	T5	1	ns
T3	T4	0.0945	ns
T3	T5	1	ns
T4	T5	0.0871	ns

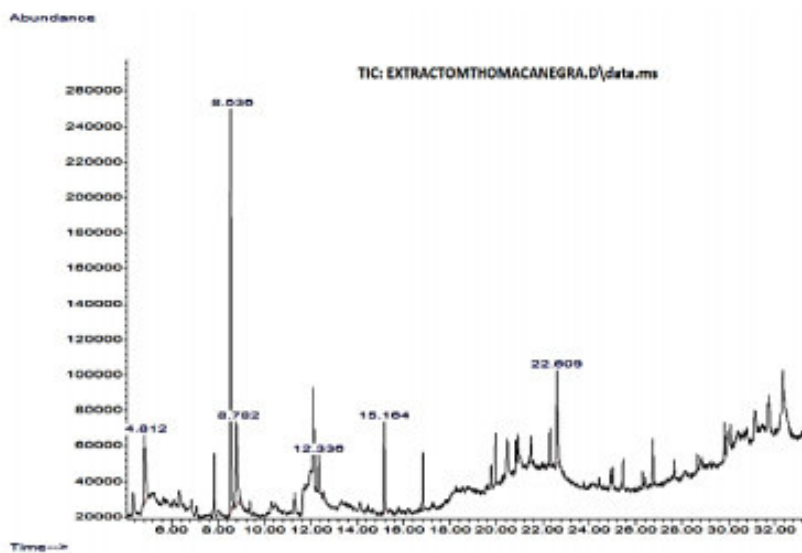
## Anexo N°4. Composición de la Maca Juvens Negra



Compound	Maca Samples	
	Black Maca	Red Maca
Formic acid	4.10	6.94
Adenine	6.23	5.06
Fumaric acid	13.79	15.43
Uridine	10.82	10.71
Sucrose	1632.36	1368.35
Glucotropaeolin	77.50	72.08
Macamides	55.21	39.86
Choline	327.44	366.99
GABA	40.09	76.59
Malic acid	83.88	92.81
Glutamine	132.01	118.27
Proline	875.25	832.98
Fatty acids	504.55	378.36
Alanine	156.22	152.41
Valine	111.48	107.61
Phytosterols	24.23	21.10

## Anexo N°5. Cromatograma de la Maca negra

Fondo del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica/Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC/FONDECYT), Perú, Círculo de Investigación de Plantas con Efecto en la Salud, (Grant no. 010-2014-FONDECYT). Cromatograma del extracto metanólico de Maca negra



Cromatograma del extracto acuoso de Maca negra

