Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
Unidad de Posgrado

Efecto del tiempo y la criopreservación sobre la apoptosis de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) obtenidos de epidídimo

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal

AUTOR

Carlos Alonso SEGURA ZEVALLOS

ASESOR

Dr. Alexei Vicent SANTIANI ACOSTA

Lima, Perú

2024



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

Segura C. Efecto del tiempo y la criopreservación sobre la apoptosis de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) obtenidos de epidídimo [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2024.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	CARLOS ALONSO SEGURA ZEVALLOS
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	46212965
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7049-6019
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10650758
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-9740-5490
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	WILFREDO HUANCA LÓPEZ
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10036341
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	MARTHA ESTHER VALDIVIA CUYA
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06449624
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	JOEL IVÁN PACHECO CURIE
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40112676
Miembro del jurado 3	
Nombres y apellidos	ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10650758

Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.2.3. Reproducción animal
Grupo de investigación	Grupo de Investigación en Reproducción y Sanidad Animal - GIRESA
Agencia de financiamiento	Perú. Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica - FONDECYT. Proyectos de Investigación Básica – Convocatoria 2020-01. 135-2020-FONDECYT.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Medicina Veterinaria, Laboratorio de Reproducción Animal País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Calle: Av. Circunvalación Cuadra 28 Latitud: -12.081479 Longitud: -76.987562
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencia animal https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.02.01 Ciencia veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIA ANIMAL CON MENCIÓN EN PRODUCCIÓN Y REPRODUCCIÓN ANIMAL

En la Sala de Posgrado, siendo las 10:00 horas del día jueves 20 de junio de 2024, el Jurado de Tesis conformado por los siguientes docentes: Presidente Mg. Wilfredo Huanca López, Miembros Mg. Joel Iván Pacheco Curie, Dra. Martha Esther Valdivia Cuya y Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta (asesor), se reunieron para la sustentación de la tesis oral y pública titulada:

"EFECTO DEL TIEMPO Y LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA APOPTOSIS DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA (*Vicugna pacos*) OBTENIDOS DE EPIDÍDIMO", presentada por el Bachiller:

CARLOS ALONSO SEGURA ZEVALLOS

Quien sustentó la tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **_____EXCELENTE, (19) DIECINUEVE _____**

A continuación, el jurado por intermedio de su presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal, al Bachiller Carlos Alonso Segura Zevallos.

Siendo las 11:20 horas, del día jueves 20 de junio del 2024, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente acta, mediante las firmas del jurado y asesor de la tesis.

Mg. Wilfredo Huanca López (P.P.D.E.)
Presidente

UNMSM
Firmado digitalmente por PACHECO CURIE Joel Ivan FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.06.2024 12:24:14 -05:00

Mg. Joel Iván Pacheco Curie (P.A.T.C.)
Miembro

Dra. Martha Esther Valdivia Cuya (P.P.D.E.)
Miembro

Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta (P.P.T.C.)
Asesor

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, ALEXEI VICENT SANTIAN ACOSTA en mi condición de asesor acreditado con la Resolución Directoral N°062-UPG-FMV-2022 de la tesis, cuyo título es **EFECTO DEL TIEMPO Y LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA APOPTOSIS DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA (*Vicugna pacos*) OBTENIDOS DE EPIDÍDIMO,** presentado por el M.V.Z. Carlos Alonso Segura Zevallos para optar el grado académico de magister, 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, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 15% de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Tesis:

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

UNMSM Firmado digitalmente por SANTIANI ACOSTA Alexei Vicent FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 17.06.2024 15:19:38 -05:00

Firma del Asesor _____



Documento de Identidad: 10650758

Nombres y apellidos del asesor: ALEXEI VICENT SANTIAN ACOSTA

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres Kike y Pochita, que sin ellos nada de esto hubiese sido posible. Su incansable apoyo y aliento a que sea un mejor profesional ha rendido sus frutos. A ellos les debo todo lo que soy y por ellos siempre voy a buscar ser mejor. Los amo.

A mi Yoyita, la mejor abuela del mundo. Viejita no sabes cómo hubiese querido tenerte aquí para que estés con nosotros en este momento, siempre pensé que estarías en mi sustentación, pero, te me fuiste un poco antes. Sé que estás aquí conmigo siempre y te extraño demasiado.

A mis tíos y padrinos Pani y Pompo, que siempre preguntan cómo van las cosas con los estudios y trabajo, siempre me alientan y dan fuerzas para seguir con lo que hago. También a mi abuelo Apa, ya no estás aquí pero donde quiera que estés sé que nos acompañas así sea a regañadientes.

A Dios, por permitir que todo se de en el tiempo y de la forma que debe ser y por permitirme tener a mi familia unida.

AGRADECIMIENTO

Esta tesis fue posible gracias al financiamiento del proyecto 135-2020-FONDECYT: Indicadores de fertilidad en espermatozoides criopreservados de alpaca: estudio de la apoptosis espermática, despolarización de membrana, integridad de ADN y estabilidad de cromatina.

Agradezco de manera especial al Dr. Alexei Santiani y a la Mg. Shirley Evangelista, a quienes considero que han sido una parte esencial y muy importante en mi formación profesional. Son los profesionales a los que admiro mucho y los considero mis amigos. Gracias a ambos por haber sido mis asesores tanto en pregrado como en posgrado.

Gracias también a mis amigos y compañeros tesistas, José Miguel La Rosa, Luis Báez, Alfredo Gutiérrez, Jefry Pérez y Sandrita Montes, haber trabajado con ustedes, enseñarles un poco del manejo de muestras en el laboratorio y apoyarnos entre todos para lograr el objetivo de sacar nuestras tesis adelante pese a todas las dificultades que tuvimos por pandemia y demás sucesos en el país ha sido muy satisfactorio para mí como persona.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN vi
ABSTRACT vii
LISTA DE TABLAS viii
LISTA DE FIGURAS ix
I.INTRODUCCIÓN 10
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 12
2.1 Fisiología reproductiva del macho alpaca 12
2.2 Características del semen 13
2.3 Características de los espermatozoides recuperados de epidídimo 15
2.4 Criopreservación 16
2.4.1 Proceso de criopreservación 16
2.4.2 Criopreservación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) 17
2.4.3 Estrés oxidativo 18
2.4.4 Esermatozoides de alpaca y la criopreservación 19
2.4.5 Fisiología del espermatozoide durante la criopreservación 20
2.5 Apoptosis 21
2.5.1 Mecanismos de la apoptosis 21
2.5.1.a Ruta extrínseca de apoptosis 21
2.5.1.b Ruta intrínseca de apoptosis 22
2.5.2 Marcadores de apoptosis 23
2.5.3 Apoptosis en espermatozoides 24
2.5.4 Criopreservación y su efecto sobre la apoptosis de espermatozoides 25
III. MATERIALES Y MÉTODOS 26
3.1 Lugar del estudio 26
3.2 Tamaño de la muestra 26
3.3 Proceso de muestras 27
3.4 Recuperación de espermatozoides 28
3.5 Preparación de reactivos 29

3.5.1 CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (C10723, Invitrogen) 30
3.5.2 Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI (V13242, Invitrogen) 30
3.5.3 Yoduro de Propidio PI (L7011, Molecular Probes) 30
3.5.4 MitoTracker Deep Red FM (M22426, Molecular Probes) 31
3.6 Diseño experimental 31
3.7 Criopreservación 32
3.8 Evaluación del efecto del tiempo sobre la apoptosis 33
3.9 Evaluación del congelamiento sobre la apoptosis 34
3.10 Citometría de flujo 34
3.11 Análisis de datos 35
IV. RESULTADOS 36
V. DISCUSIÓN 46
VI. CONCLUSIONES 52
VII. RECOMENDACIONES 53
VIII. LITERATURA CITADA 54

RESUMEN

La apoptosis es un modo programado de muerte celular que puede ocurrir en espermatozoides durante la espermatogénesis o el tránsito epididimario, así como también en el eyaculado. Un alto porcentaje de espermatozoides apoptóticos sería un pobre indicador de la congelabilidad de una muestra de semen fresco. Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue determinar la activación de caspasas y traslocación de fosfatidilserina durante la incubación a 37°C y luego del proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca. 23 muestras fueron incubadas durante 4 horas a 37°C, y otras 23 muestras fueron congeladas utilizando un sistema automatizado. La activación de Caspasa-3/7 y la traslocación de la fosfatidilserina fue evaluada a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas en muestras incubadas a 37°C; y antes y después de la criopreservación utilizando CellEventTM Caspase-3/7 Green Detection Reagent, Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI y citometría de flujo. El porcentaje de espermatozoides con activación de Caspasa-3/7 activada se incrementó ($p<0.05$) después de 3-4 horas de incubación a 37°C y el porcentaje de fosfatidilserina traslocada disminuyó de 3-4 después de incubación, mientras, la activación de caspasas antes y después de la criopreservación fue similar (36.2 ± 11.21% vs 36.6 ± 33.7%, $p >0.05$), la traslocación de fosfatidilserina disminuyó de 21.93 ± 9.83% a 7.47 ± 6.51%. Aparentemente la criopreservación no produce cambios apoptóticos en los espermatozoides, pero, la desviación estándar encontrada es alta después del congelamiento, ya que se encontraron dos poblaciones: en las que la apoptosis disminuye debido a la criopreservación (de 36.6 ± 9.1% a 1.5 ± 2.2%); y las que aumenta posterior de la criopreservación (de 37.7 ± 13.0% a 64.3 ± 16.7). Por esto se concluye la apoptosis de espermatozoides de alpaca aumenta luego de 3 a 4 horas de incubación, y que la criopreservación afecta a los espermatozoides de alpaca aumentando o disminuyendo (modulando) el porcentaje de apoptosis, lo cual se ve reflejado en una disminución de la viabilidad espermática.

Palabras clave: alpaca, espermatozoides, criopreservación, apoptosis, caspasa 3/7, anexina v

ABSTRACT

Spermatozoa that have undergone ejaculation or are in the process of spermatogenesis or epididymal transit may undergo apoptosis, a type of controlled cell death. In a raw seminal sample, a high percentage of apoptotic sperm would be a poor indicator of freezability. Thus, the goals of these investigations were to examine the activation of caspase and the translocation of phosphatidylserine during incubation period (37ºC) as well as the cryopreservation of alpaca spermatozoa. Twenty-three sperm samples were frozen using an automated system, and the remaining twenty-three samples were incubated for four hours at 37°C. In samples incubated at 37°C, Caspase-3/7 activation and phosphatidylserine translocation were measured before and after cryopreservation; and at 0, 1, 2, 3, and 4 hours. CellEventTM Caspase 3/7 Green Detection Reagent, Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI, and flow cytometry were used to measure these events. In contrast, caspase activation before and after cryopreservation were similar (36.2 ± 11.2% vs. 36.6 ± 33.7%, $P>0.05$), and phosphatidylserine translocation decreased from 21.93 ± 9.83% to 7.47 ± 6.51%. The percentages of alpaca spermatozoa with caspase-3/7 activated increased ($P<0.05$) after 3–4 hours of incubation at 37°C, while the percentage of phosphatidylserine translocated decreased after 3–4 hours of incubation. It appears that cryopreservation does not cause apoptotic changes in alpaca spermatozoa. Nevertheless, the high standard deviation observed following freezing may be explained by the fact that we observed two different types of samples: one where apoptosis increased (from 37.7 ± 13.0% to 64.3 ± 16.7), and the other where it decreased (from 36.6 ± 9.1% to 1.5 ± 2.2%). It is concluded that alpaca sperm apoptosis increases after 3–4 hours of incubation and that alpaca sperm samples are affected by cryopreservation increasing or decreasing apoptosis percentage, which can be observed as a lower viability sperm sample.

Keywords: alpaca, spermatozoa, cryopreservation, apoptosis, caspase 3/7, annexin v

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tiempos de estabilización de la curva de congelamiento utilizados en distintas especies. 20

Tabla 2. Parámetros de los testículos y de los espermatozoides epididimarios de las muestras utilizadas y totales. 40

Tabla 3. Efecto del tiempo (horas) sobre la activación de Caspasas-3/7 de espermatozoides vivos, muertos y apoptóticos incubados a 37°C. 41

Tabla 4. Efecto del tiempo (horas) sobre la traslocación de fosfatidilserina de espermatozoides vivos, muertos, muertos por apoptosis y apoptóticos incubados a 37°C. 42

Tabla 5. T-Student de porcentajes de espermatozoides vivos, muertos y apoptóticos de las muestras pre y post criopreservación evaluadas por CellEvent™ caspase 3-7. 43

Tabla 6. Promedio y D.S de los porcentajes de espermatozoides vivos, muertos y apoptóticos de muestras donde se eleva y reduce el porcentaje de apoptosis pre y post congelamiento evaluado por CellEvent™ Caspase 3-7. 44

Tabla 7. T-Student de porcentajes de espermatozoides vivos, muertos necróticos, muertos apoptóticos y apoptóticos de las muestras pre y post criopreservación evaluados por Annexin V FITC. 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recuperación de espermatozoides epididimarios de alpaca en dilutor. A) Cola de epidídimo separada y limpia, lista para ser trabajada. B) Cortes seriados de la cola de epidídimo. C) Dilutor conteniendo espermatozoides epididimarios. 29

Figura 2. Curva de congelamiento del programa #7 Cryobath (Cryologic®) utilizado para el congelamiento de las muestras. 33

Figura 3. Gráfico tipo Dot Plot para muestras trabajadas con el fluorocromo CellEventTM Caspase-3/7 Green Detection Reagent (C10723, Invitrogen), dónde se aprecian distintos cuadrantes dentro de una población espermática, mostrando espermatozoides vivos, necróticos y apoptóticos, tanto antes del congelamiento (A), como luego del descongelamiento (B). 37

Figura 4. Gráfico tipo Dot Plot para muestras trabajadas con el fluorocromo Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI (V13242, Invitrogen), dónde se aprecian distintos cuadrantes dentro de una población espermática, mostrando espermatozoides vivos (cuadrante inferior izquierdo), necróticos (cuadrante superior izquierdo), apoptóticos (cuadrante inferior derecho) y muertos apoptóticos (cuadrante superior derecho), tanto antes del congelamiento (A), como luego del descongelamiento (B). 38

Figura 5. Imágenes tomadas por medio de citometría de flujo y análisis con imágenes por medio del Citómetro de Flujo FlowSight® Amnis, mostrando un espermatozoide apoptótico (A) y un espermatozoide vivo (B). 39

Figura 6. Imágenes tomadas por medio de citometría de flujo y análisis con imágenes por medio del Citómetro de Flujo FlowSight® Amnis, mostrando un espermatozoide apoptótico (A) y un espermatozoide muerto (B). 39

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de espermatozoides de alpaca es una biotecnología no muy bien desarrollada. Diferentes estudios como los desarrollados por Santiani et al. (2005), Morton et al. (2007) y Morton et al. (2013), muestran que la motilidad y viabilidad se reducen drásticamente después del descongelamiento. Además, según Morton et al. (2010), Santiani et al. (2013) y Kershaw et al. (2016), la criopreservación causa daños a las células espermáticas, como la pérdida de la integridad de la membrana, reducción del potencial de membrana mitocondrial (MMP), pérdida de integridad del ADN, fragmentación del ADN llevando a porcentajes bajos de motilidad y a la muerte del espermatozoide. Estos daños están relacionados al proceso de congelamiento, en el cual se ha observado el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en carneros (Santiani et al., 2014), humanos (Karimfar et al., 2015) y alpacas (Evangelista y Santiani, 2017). Se ha encontrado que los ROS están relacionados con el proceso apoptótico en espermatozoides (Villegas et al., 2005; Mahfouz et al., 2010).

De acuerdo con Said et al. (2010) y Anglada et al. (2015), la apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que regula el conteo celular y elimina células innecesarias. Como lo indican Agarwal y Said (2004) y D'Arcy (2019), inicia por medio de una vía intrínseca o extrínseca como lo indica, activando caspasas llevando a que el ADN se fragmente por medio de las endonucleasas activas, la escisión de proteínas a nivel del citoesqueleto y núcleo, el entrecruzamiento de proteínas, los ligandos para células fagocíticas que son expresados y la presencia de cuerpos apoptóticos. Los indicadores apoptóticos asociados a la criopreservación de espermatozoides incluyen la fragmentación del ADN, la translocación de la fosfatidilserina, la modificación del MMP y la activación de las caspasas (Martin et al., 2004). Las Caspasas son proteasas cisteinil-aspartato específicas que juegan un rol fundamental en la iniciación y ejecución de la apoptosis terminando en una muerte celular

apoptótica al igual que la Anexina V que es una proteína del grupo de las anexinas la cual se une a la fosfatidilserina que se encuentra traslocada en el exterior de la membrana celular durante la apoptosis (Earnshaw et al., 1999).

La apoptosis es un paso crucial en el proceso de espermatogénesis ya que garantiza la preservación de la homeostasis y permite un delicado equilibrio entre las células de Sertolli y las células germinales dentro del organismo (Caselles et al., 2014). En los testículos de los mamíferos, las células germinales sufren divisiones basadas en la mitosis hasta que pasan por un proceso denominado diferenciación, que produce espermatozoides maduros. Debido a la excesiva división, los niveles normales de proliferación espermática deben regularse mediante un proceso como la apoptosis (Chaveiro et al., 2007). La criopreservación aumenta los porcentajes de Caspasa 3 y 7 de las muestras frescas a las descongeladas, según estudios en varias especies, igualmente para la Anexina V. En espermatozoides de humano van desde 21% a 47% (Said et al., 2010), espermatozoides de caballo de 20% a 60% (Martin et al., 2015) y en espermatozoides de toro de 2% a 12% (Martin et al., 2004). No obstante, No existen estudios previos que hayan identificado la activación de las Caspasas o la traslocación de fosfatidilserina en espermatozoides durante la incubación o que hayan pasado por un proceso de criopreservación. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue determinar la activación de las Caspasas y traslocación de fosfatidilserina durante la incubación a 37°C, como también antes y después del proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fisiología reproductiva del macho alpaca

De acuerdo a lo mencionado por Bustinza (2001), las alpacas presentan una actividad reproductiva entre los meses de enero a abril, siendo estos los meses en los que hay más precipitaciones, más cálidos y donde se encuentra más forraje (Sumar, 1996), por lo que, en esta época, se incrementa la calidad seminal (Montalvo et al., 1979). Según Brown (2000), el sistema nervioso central se ve afectado por una serie de variables climáticas, como la temperatura ambiental, la humedad y la presencia de luz, que incluyen estímulos visuales y olfativos, y esto repercute en el comportamiento reproductivo.

La pubertad se ha determinado mediante niveles de la testosterona sérica. La producción de testosterona aumenta a partir del decimoprimer mes (Losno y Coyotupa, 1981). Al momento que los machos alcanzan la pubertad, los testículos aumentan de tamaño y los niveles de testosterona en sangre aumentan, esto sucede alrededor de los 10 meses de edad como menciona Bravo (1995; 2000). Como menciona Sumar (2002), al año de edad, sólo el 8% de los machos muestran una adherencia pene prepucial completamente separada, necesario para la cópula. A los tres años, momento en que se consideran alpacas adultas, el 100% de los machos no presentan adherencias, lo que indica la madurez sexual y la capacidad de la alpaca para tener una erección completa.

De acuerdo a lo observado por Novoa (1970) y England et al. (1971), la alpaca macho descansa en posición decúbito ventral sobre la hembra durante la cópula. El macho introduce el pene en la cérvix depositando el semen a nivel de ambos cuernos uterinos (Franco et al., 1981; Bravo, 1994; 2002). El tiempo de la cópula dura en promedio 25 minutos, teniendo rangos variables de entre 5 a 50 minutos (Bravo, 2002). La cópula de las alpacas se caracteriza por su tiempo de duración,

el depósito del semen intracornual y el comportamiento del macho (Brown, 2000; Bravo, 2002).

2.2. Características del semen

El semen de las alpacas tiene características que ya son conocidas y fueron descritas por Garnica et al. (1993), Flores et al. (2002) y Urquieta et al. (2015), el color predominante es el blanco, el cual varía en tonalidades, como blanco opalescente, incoloro, translúcido y blanco amarillento. En cuanto a la cantidad de eyaculado, este varía entre 0.8 a 3.1 mL, y el pH es de alrededor de 7.2; la concentración espermática presenta rangos entre 82,000 a 250,000 espermatozoides/mL, y se puede observar espermatozoides que muestran movilidad de su cola, sin que se llegue a evidenciar progresividad en su motilidad, debido a la gran viscosidad que presenta el semen lo cual ha sido descrito por Bravo et al. (1997, 2000) y Flores et al. (2002).

Según Garnica et al. (1993) y Bravo et al. (200), la viscosidad es una característica considerada negativa en la especie es por esta razón que se prefiere trabajar con espermatozoides obtenidos por otras técnicas. La proteína Mucina 5B es quien se encarga de producir esta alta viscosidad, esto hace que los espermatozoides se muevan de forma oscilatoria, dificultando la evaluación del semen y limitando la interacción de los espermatozoides con sustancias como crioprotectores durante procesos de biotecnologías reproductivas como la criopreservación (Abraham et al., 2017).

El conteo espermático a diferencia de otras especies es mucho menor, y esto puede deberse al hecho que la eyaculación es intrauterina, lo cual podría reducir la necesidad de un mayor volumen de eyaculado para hacer efectiva la fecundación (Urquieta et al., 2005). Según lo demostrado por Bravo et al. (2000), Flores et al. (2002), Evangelista-Vargas et al. (2016) y Juárez y Santiani (2019), los espermatozoides vivos en una muestra seminal se encuentran en una proporción de 50%, en espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo se encuentran alrededor de 48% de viabilidad. Estos estudios mencionan que morfológicamente el 50% de espermatozoides viables son normales, mientras

que al utilizar un método diferente como el digital no automatizado, este porcentaje es del 48% de espermatozoides con presencia de una cabeza normal. Además, Giuliano et al. (2018), trabajó con eyaculados de llama y evaluó la morfología espermática utilizando tinción Feulgen, obteniendo rangos 78.36% hasta 93.92% de espermatozoides normales. Cucho et al. (2019) mencionan que existen diferencias en la morfología del espermatozoide de la alpaca, que son atribuidos a el factor de la persona que realiza las tinciones, y otro el hecho de no tener un procedimiento específico para la especie.

Según Bravo et al. (2000), quienes trabajaron con semen obtenido por medio de vagina artificial, los espermatozoides de alpaca pueden presentar anomalías como colas retorcidas, colas múltiples, cabezas de espermatozoides con ausencia de cola, cabezas dobles y presencia de gotas citoplasmáticas. Según diferentes reportes en semen colectado por medio de vagina artificial (Flores et al., 2002; Urquieta et al., 2005), el 20% de las muestras son azoospérmicas como consecuencia de una abstinencia sexual prolongada, que hace que las reservas de espermatozoides del epidídimo se agoten y pierdan viabilidad.

A partir de lo mencionado por Banda et al. (2010), se ha demostrado que el plasma seminal no constituye ni confiere ningún tipo de protección durante la criopreservación, además que al momento de separar los espermatozoides de este por medios mecánicos como el pipeteo o centrifugación genera daño a los espermatozoides por la formación y aumento de especies reactivas de oxígeno (Evangelista, 2014), por esto es que los espermatozoides obtenidos de epidídimo son un buen modelo de estudio para esta especie. La utilización de espermatozoides epididimarios según Abraham et al. (2017), se ha dado para poder recuperar material genético de especies que se encuentran en peligro de extinción, también pueden ser utilizados para el desarrollo y mejora de técnicas y protocolos de criopreservación de espermatozoides.

2.3. Características de los espermatozoides recuperados de epidídimo

Los espermatozoides recuperados de cola de epidídimo están siendo utilizados en diversos estudios por sus características, como por ejemplo el hecho de no haber estado en contacto con plasma seminal, lo que favorece su manejo al momento de aplicar metodologías diferentes, como por ejemplo la criopreservación. (Santiani et al., 2016; Bravo 2023)

En el caso de especies como los equinos está demostrado que mantener los testículos a 4ºC hasta un máximo de 96 horas previas a la recuperación de espermatozoide de cola de epidídimo, mantiene los porcentajes normales de motilidad (Guimarães et al., 2012). En el caso de alpacas Banda et al., 2010 mencionan que la utilización de espermatozoides recuperados de cola de epidídimo se puede dar hasta las 35 horas post beneficio del animal, sin afectar la calidad de los espermatozoides, siempre y cuando los testículos hayan sido mantenidos a 5ºC durante su transporte.

Los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo se encuentran en una mayor concentración que los que se obtienen por medio de eyaculado por vagina artificial, o post cópula (Delhon y Von Lawzewitsch, 1994; Contri et al., 2012; Bravo et al., 2023). Los espermatozoides presentes en la cola del epidídimo presentan colas completamente desarrolladas, pero un 29% de estos espermatozoides tiene presencia de una gota citoplasmática a nivel de la pieza media, la cual desaparece una vez el espermatozoide madura en esta región (Delhon y Von Lawzewitsch, 1994; Contri et al., 2012; Guimarães et al., 2012).

En la cola del epidídimo los espermatozoides si bien tiene la capacidad de poder moverse, no realizan esta función hasta ser expulsados y estar en contacto con algún medio diferente al del epidídimo, esto se debe a que en este lugar hay presencia del factor de inhibición de movimiento, lo que genera que el espermatozoide no presente actividad metabólica ni pierda energía (Delhon y Von Lwzewitsch, 1994; Guimarães et al., 2012; Bravo, 2023).

2.4. Criopreservación

2.4.1. Proceso de criopreservación

El congelamiento del semen se da de forma gradual, disminuyendo la temperatura, primero hasta llegar a los 0°C, luego comenzará el descenso de temperatura al congelamiento en sí, en un tiempo total de 3 horas a una tasa de congelamiento de 0.1°C por minuto (Salmon y Maxwell, 2000).

Según Salmon y Maxwell (2000), el tiempo promedio de descenso de temperatura desde los 30°C hasta los 5°C debe ser de alrededor de 2 horas, para así permitir un adecuado proceso de equilibrio entre los espermatozoides y el medio.

Se tienen estudios como el de Kumar et al. (2003), en el cual se indica que las temperaturas críticas, en las que mayores daños sufren los espermatozoides se encuentran en rangos entre los -5°C y los -50°C, siendo la última una temperatura en la que ya las células se encuentran congeladas, pero estas deben pasar un tiempo de disminución mayor de temperatura siendo sometidos a los vapores de nitrógeno (Salmon y Maxwell, 2000) y finalmente ser sumergidos en nitrógeno líquido a -196°C, para mantenerlos por periodos de tiempo indefinidos.

Existen técnicas de criopreservación, como la manual para la realización del congelamiento de los espermatozoides, en la cual se realiza con descensos de temperatura controlando el tiempo, en una caja de tecnoport, en la cual se coloca nitrógeno líquido y se exponen las pajillas de semen a los vapores de este (Mamani et al., 2018). Pero se está trabajando también con equipos automatizados de congelamiento, los cuales poseen programas de congelamiento que asemejan la curva de descenso de temperatura a lo que se busca en el trabajo con alpacas (Allauca et al., 2019; Contreras et al., 2020; Lévano et al., 2023).

Para poder realizar una evaluación de la muestra se debe realizar el descongelamiento, sumergiendo la pajilla congelada en agua temperada a 37°C, lo cual no genera daños en la membrana del espermatozoide y no afecta su motilidad (Correa et al., 1996).

2.4.2. Criopreservación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las ROS, son producidas durante las reacciones enzimáticas que ocurren en momentos de interacción intercelular e intracelular (Bansal y Bilaspuri, 2011). Los espermatozoides son células que generan ROS siendo de estos los más importantes el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2-) y el radical hidroxilo (OH•) (Bansal y Bilaspuri, 2011; Evangelista, 2014; De Lamirande y Gagnon, 1995; Santiani, 2012). Debido a su naturaleza tan reactiva, estos pueden combinarse con otras moléculas, en las que generarán oxidación, por lo tanto, cambios tanto estructurales, como funcionales, e inclusive pueden generar daño irreversible en las células (Aitken y Fisher, 1994; Evangelista, 2014; Guérin et al., 2001).

Existen evidencias científicas que demuestran que durante el proceso de criopreservación, mientras va disminuyendo la temperatura, se elevan las ROS. A medida que disminuye la temperatura el anión superóxido (O_2-) aumenta en los espermatozoides de bovino (Bilodeau et al., 2002; Chatterjee et al., 2001; Santiani, 2012). Al llegar a los 4°C antes del congelamiento, los ROS se incrementan en humanos (Wang et al., 1997). En trabajos como los de O´Flaherty et al. (1997); Alvarez y Storey, (1989) y Tosic, (1947), el peróxido de hidrógeno genera una pérdida de motilidad en espermatozoides de ratón, humano, toro y conejo.

Según Mazzilli et al. (1995), si los niveles de ROS en el semen se encuentran elevados, al momento de realizar la criopreservación, se elevarán mucho más. En cambio, si los niveles son bajos, se apreciará el aumento con niveles no muy altos (Tselkas et al., 2000).

Evangelista et al. (2014) concluye que las ROS evaluadas, O_2-, H_2O_2 sufren un aumento en su concentración durante la curva de enfriamiento en los espermatozoides de alpacas y esto se acentúa en el momento que alcanzan y se mantienen a 5 °C.

2.4.3. Estrés oxidativo

En un estado normal, los espermatozoides presentan un balance entre los ROS y antioxidantes propios de la célula (Sies, 1993).

Makker et al. (2009) menciona que los ROS en pequeñas cantidades o concentraciones generan la capacitación, hiperactivación y la reacción acrosomal de los espermatozoides. Esto como mecanismo normal para poder fecundar posteriormente a un ovocito. Se ha demostrado que los espermatozoides producen de manera controlada el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anión superóxido (O_2-), los que generan los procesos mencionados anteriormente (Bansal y Bilaspuri, 2011).

El problema radica cuando estos son producidos en grandes cantidades, resultando dañinos para los espermatozoides, incluso causando la muerte de estos (Evangelista, 2014). Los espermatozoides son altamente susceptibles a los ROS, ya que estos tienen sus membranas plasmáticas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, y es precisamente debido a esto, que los ROS generan la oxidación de lípidos o peroxidación lipídica (Evangelista, 2014).

El estrés oxidativo es definido por Sies (1985) y por Fuchs et al. (1997) como la alteración del balance que existe entre los oxidantes y antioxidantes, siendo los últimos superados por los oxidantes. Sin embargo, Da Silva et al. (2010) mejoró la definición agregándole el hecho que estos oxidantes al estar presentes en una mayor cantidad que los antioxidantes, generan o llevan a un daño potencial en las células y órganos.

El estrés oxidativo genera la disminución de la fertilidad de los machos, como mencionan Aitken (1994); De Iuliis et al. (2006), el 25% al 40% de hombres

con problemas de fertilidad presentan altos niveles de ROS en su semen. Los ROS afectan la integridad del ADN (Aitken et al., 1998), también la motilidad de los espermatozoides (Alvarez y Storey, 1989; Bilodeau et al., 2002) y la actividad mitocondrial (De Lamirande et al., 1997). Pero estos daños no sólo están dados por los factores propios de los ROS, también tiene mucho que ver la temperatura, antioxidantes, el tiempo de exposición a las ROS, etc. (Saleh y Agarwal, 2002).

Es de mucha importancia denotar que el estrés oxidativo cumple un rol negativo frente a los espermatozoides (Evangelista, 2014). La peroxidación lipídica que generan las ROS tiene como uno de sus productos finales al malonaldehído (MDA), siendo éste un componente mutagénico el cual va a generar daño en el ADN del núcleo y también en el ADN mitocondrial, de la misma manera es altamente tóxico para la célula espermática, por lo que este proceso puede generar una apoptosis celular disminuyendo la cantidad de espermatozoides y afectando así la capacidad fecundante (Evangelista, 2014).

2.4.4. Espermatozoides de alpaca y la criopreservación

Existen factores que dificultan la criopreservación de los espermatozoides de alpacas, siendo estos la viscosidad del eyaculado, la dificultad para la colecta de semen, el volumen del eyaculado y la alta presencia de espermatozoides anormales. Estos factores no permiten que al descongelamiento tengamos una alta motilidad de los espermatozoides (Bravo et al., 1997). Es por esta razón que diversos estudios utilizaron espermatozoides epididimarios. Santiani et al., (2005), hallaron motilidades post descongelamiento que varían entre 10% y 20%. Por otro lado, se sabe que la viabilidad de muestras criopreservadas se encuentra entre un 40% a 50% (Banda et al., 2010), y al parecer no existe daño acrosomal de importancia (Sanitiani et al., 2005).

Asimismo, existen diversos protocolos de criopreservación de espermatozoides para distintas especies. Muchas veces los tiempos de estabilización utilizados en estos protocolos son bastante largos como en el caso de rumiantes, pero en diversos estudios se describe un tiempo de estabilización

distinto para el caso de criopreservación de espermatozoides de alpaca como se puede apreciar en Tabla 1.

Tabla 1. Tiempos de estabilización de la curva de congelamiento utilizados en distintas especies.

Autor	Tiempo de estabilización	Especie trabajada
Taşdemir et al., 2013	4 hr.	Toro
Sariözkan et al., 2010	3 hr.	Macho cabrío
Santiani et al., 2005	30 min.	Alpaca
Morton et al., 2010	-	Alpaca
Banda et al., 2010	30 min.	Alpaca
Santiani et al., 2013	30 min.	Alpaca
Choez et al., 2013	30 min.	Alpaca

2.4.5. Fisiología del espermatozoide durante la criopreservación

La peroxidación lipídica es un proceso el cual genera la activación de los espermatozoides de una forma prematura. Esto va a acortar la vida de estas células tanto *in vivo*, como *in vitro* durante la criopreservación. Esta va a alterar las membranas especialmente de la región acrosomal, llevando a la pérdida de componentes intracelulares. El estrés oxidativo causa una disminución progresiva del metabolismo de los espermatozoides y una disminución y posterior pérdida irreversible de la motilidad (Aisen et al., 2005).

Los espermatozoides dañados, producen altas cantidades de ROS y bastante rápido durante la criopreservación. Esto genera que se deteriore el ADN, generando ruptura de sus hebras o modificación de las bases

nitrogenadas, llevando a una pérdida de las funciones del espermatozoide, como son la motilidad y la viabilidad de estos (Labbe et al., 2001).

2.5. Apoptosis

Said et al. (2010) y Anglada et al. (2015) , mencionan que la apoptosis es un componente esencial de la muerte celular programada (MCP), controla la proliferación de las células y evita que se ponga en peligro la supervivencia de éstas eliminando a las células innecesarias, regulando la muerte celular natural hacia el final de su ciclo vital, frente a los tipos de muerte celular por necrosis o autofagia, y cumpliendo un papel crucial en la formación de tejidos y órganos a lo largo de la embriogénesis como lo evidencian Darzynkiewicz et al. (1992), Martin et al. (2015) y D´Arcy (2019).

Como ha sido descrito por Kiechle y Zhang (2002) y Stiblar-Martincic (2009), la apoptosis se caracteriza por la formación de cuerpos apoptóticos, los cuales son reconocidos por macrófagos o células de epitelio cercanas. Otras características de este proceso de muerte celular son la condensación de la cromatina, el núcleo de la célula fragmentado, la reducción del tamaño de la célula, el redondeo celular y la escasa o nula modificación ultraestructural de las organelas citoplasmáticas. En el 2007, Elmore afirmó que el tiempo necesario para que se produzca la apoptosis en un tipo de célula dependería tanto del tipo de apoptosis que se produzca como del método de activación, con una estimación de 2 a 3 horas.

2.5.1. Mecanismos de la apoptosis

2.5.1.a Ruta extrínseca de apoptosis

Se han documentado interacciones mediadas por receptores de transmembrana en lo que se conoce como la vía del receptor de muerte (Elmore, 2007), se desencadena por la unión del ligando de la sintasa de ácidos grasos (Fas L) al receptor de la sintasa de ácidos grasos (Fas R), del ligando del factor de necrosis tumoral (TNF TRAIL) a los receptores de muerte (DR4 y DR5) y del

ligando inductor de la apoptosis (TRAIL) al receptor del ligando del factor de necrosis tumoral (TNF) (Huerta et al., 2007). También se sabe que estas agrupaciones contienen sustancias adaptadoras descritas por Huerta et al. (2007), como el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) o el receptor del dominio de muerte asociado a TNF (TRADD), que permiten que las caspasas 8 y 10 (iniciadoras) se activen, seguida de las caspasas 3 y 7 (ejecutoras), lo que da lugar a la formación de una célula con presencia de un proceso apoptótico con los aspectos fisiológicos antes indicados.

2.5.1.b Ruta intrínseca de apoptosis

Durante la cascada de eventos intrínsecos, Saelens et al. (2004) y Elmore (2007), han observado estímulos intracelulares que se localizan de forma principal a nivel mitocondrial, por esto se menciona como la vía de las mitocondrias. Generan que se dé una alteración en la arquitectura de la membrana de la mitocondria, en la cual se forman poros alterando el potencial de su membrana y así produciendo que sean liberadas sustancias proapotóticas hacia el citosol, encontrándose a nivel de la intermembrana. Las sustancias liberadas en este proceso son clasificadas en dos grupos diferentes:

Según Du et al. (2000), Garrido et al. (2006) y Elmore (2007), el citocromo c, Smac/Diablo (segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria / proteína de unión directa a IAP con bajo PI) y la serín-proteasa HtrA2/Omi (requisito de alta temperatura) forman el primer grupo, estos compuestos promueven la activación de las caspasas, por lo que se dará un proceso apoptótico. Los apoptosomas se crean cuando el citocromo c activa la procaspasa 9, el ATP y el factor 1 activado por la proteasa apoptótica (Apaf-1). A continuación, según lo descrito por Chinnaiyan (1999), Hill et al. (2003) y Huerta et al. (2007) se activa la caspasa 3, que inicia la vía ejecutora de la apoptosis. Los inhibidores de las proteínas apoptóticas (IAP), incluidos cIAP1, cIAP2 y XIAP, se retirarán como resultado del proceso apoptótico provocado por las proteínas Smac/Diablo y HtriA2/Omi (Elmore, 2007; Huerta et al., 2007).

La segunda categoría incluye las enzimas destructoras del ADN endonucleasa G, DNasa activada por caspasa (CAD) y factores inductores de apoptosis (AIF), que se liberan en el citoplasma antes de entrar en el núcleo (Elmore, 2007). Dado que se generan fragmentos de 180-200 pares de bases altamente definidos, el daño en el ADN causado por endonucleasas con cierta dependencia de Ca2+ y Mg2+ es significativo (Bortner et al., 1995; Zhivotovsky y Orrenius, 2001; Elmore, 2007). Esta es una característica que diferencia a este proceso de una necrosis; ya que esta última no presenta un diseño de deterioro a nivel del ADN, ni posee un carácter específico en el tamaño de los fragmentos de los pares de bases.

2.5.2. Marcadores de apoptosis

Como lo demuestran Martin et al. (2004) y Said et al. (2010), los marcadores de apoptosis que más interesan actualmente en los estudios científicos son la activación de caspasas, la exteriorización de fosfatidilserina, el potencial de la membrana de la mitocondria afectado y el ADN en un estado fragmentado. Estos estudios demuestran que se producen cambios tras el proceso de congelamiento y posterior descongelamiento, siendo la activación de caspasas y la fosfatidilserina traslocada los principales marcadores apoptóticos.

La apoptosis es iniciada y llevada a cabo por proteasas específicas de cisteinil aspartato, las cuales son denominadas caspasas, que da lugar a cambios de conformación y bioquímicos que conducen a que la célula apoptótica muera (Earnshaw et al., 1999); En la cascada de apoptosis se han identificado 14 caspasas, que están presentes en diversos tejidos y como consecuencia a diversos estímulos. Todas las caspasas se manifiestan como proenzimas no activas (caspasas ejecutoras), las que posteriormente por acción de las caspasas iniciadoras, se convierten en formas activas al entrar en apoptosis (Said et al., 2004).

Las anexinas son proteínas que se ligan al Ca2+, están involucradas en la exocitosis, la inhibición de la proteinquinasa C, la activación de canales de calcio, todas estas funciones hacen que las anexinas puedan unirse a los

fosfolípidos (Köhler et al., 1997), en el caso de la apoptosis, la Anexina V se va a unir a la fosfatidilserina que ha sido externalizada al momento de iniciarse el proceso apoptótico en las células, en este caso espermatozoides (Vermes et al., 1995).

2.5.3. Apoptosis en espermatozoides

En los túbulos seminíferos, como menciona Shaha et al. (2010), es donde puede producirse principalmente la apoptosis a nivel testicular, la cual según Print y Loveland (2000), permite eliminar células germinales que no pueden pasar por la meiosis, las células dañadas y las células con alteraciones a nivel cromosomal. Los errores de apareamiento en la meiosis desencadenan los mecanismos que controlan la meiosis o puntos de control, que provocan la remoción de la célula que se encuentra afectada en cuestión, mediante el proceso apoptótico. Estos mecanismos surgen durante el desarrollo de los testículos, como durante la espermatogénesis, y como resultado, existe un equilibrio entre el proceso apoptótico y el rango de células que logran sobrevivir, lo que permite el mantenimiento de la homeostasis (Stibar-Martincic, 2009).

En relación con lo que ha sido ya descrito previamente por Shaha et al. (2010) y Xu et al. (2016), existe un periodo conocido como la primera oleada de la espermatogénesis en el que las células que se encuentran en etapa germinal pasan a formar espermatogonias y muchas células mueren por apoptosis. En este proceso predomina la ruta intrínseca de la apoptosis, las caspasas iniciadoras, las moléculas proapoptóticas y el citocromo; A través de la producción de caspasa 3, según lo dicho por Shaha et al. (2010), también se ha descubierto que el proceso de apoptosis regulado por Fas (sintasa de ácidos grasos) es un mediador del proceso de control de células a nivel testicular.

Lo descrito por Aitken (2011) y Aitken et al. (2015), muestra que, en los espermatozoides eyaculados, se producen especies reactivas de oxigeno de forma muy elevada a nivel mitocondrial, esto provoca la lipoperoxidación de la membrana y favorece la liberación de ciertas sustancias químicas de las mitocondrias, es uno de los factores que conduce a la apoptosis y activa la ruta

intrínseca de la misma. Otro inductor que es mencionado por Aitken y Baker (2013), es el colesterol oxidado de la membrana, que aumenta la fluidez de esta y potencia la vía intrínseca del proceso apoptótico.

Aitken et al. (2015), menciona que la NADPH oxidasa es una enzima que se encuentra en la membrana del espermatozoide, produce especies reactivas de nitrógeno, lo que contribuye al proceso de inestabilidad de la membrana. Como resultado, los espermatozoides pierden movilidad y la capacidad funcional de la membrana cambia. A continuación, la fosfatidilserina se exterioriza y, al cabo de cuatro horas, las caspasas están presentes de forma activa.

2.5.4. Criopreservación y su efecto sobre la apoptosis de espermatozoides

Distintos estudios, como el de Said et al. (2014), muestran los efectos que la criopreservación genera en los espermatozoides, como la muerte celular y activación de las caspasas de las dos rutas apoptóticas; según Martin et al. (2015),en equinos se puede observar un incremento en las caspasas 3/7 en muestras frescas de 20% a un 60% en muestras descongeladas, en otra especie, como el bovino descrito por Martin et al. (2004), donde se muestra un aumento de 2% en muestras de semen fresco, y en muestras descongeladas un 12%; finalmente en humanos fue observado por Said et al. (2010).

Dado que no ha habido ninguna investigación previa en alpacas en la que se haya identificado la activación de caspasas y la traslocación de fosfatidilserina, podemos utilizar los datos de los estudios que se están realizando actualmente en equinos, bovinos y humanos y extrapolarlos para las alpacas en este estudio.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar del Estudio

Las muestras fueron obtenidas del Camal Municipal de Huancavelica, ubicado en la provincia de Huancavelica. Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por un tiempo no mayor a 20 horas post recuperación de los testículos, según lo descrito por Banda et al., 2010, donde fueron procesadas, durante los años 2021-2022.

3.2. Tamaño de la Muestra

Se recuperaron un total de 74 testículos, los cuales fueron evaluados y se seleccionaron 34 para los dos experimentos. Para obtener el tamaño muestral del 2do experimento se realizó el calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$n = \frac{2(Z_\alpha + Z_\beta)^2 * S^2}{d^2}$$

Donde:

n = Muestras a utilizar.

Zα = Valor Z del riesgo deseado (Tomando significancia de 0.05 y test unilateral, el Zα = 1.645).

Zβ = Valor Z del riesgo deseado (Tomando potencia de 0.90, el valor de Z = 1.282).

S^2 = Varianza de variable. (Donde según Martin et al. (2015) la D.S. del porcentaje de espermatozoides con apoptosis tardía es de 42%).

d = Valor mínimo de diferencia a detectar. Se proyecta el aumento de traslocación de fosfatidilserina y la activación de las caspasas 3 y 7 en un 38%.

Calculando:

$n = 2 \times (1.645 + 1.282)^2 \times (42)^2 / 38^2 = 20.93$ testículos

Por lo que se decidió utilizar 23 testículos.

3.3. Proceso de muestras

Se recuperaron un total de 74 testículos provenientes del Camal Municipal de Huancavelica, los cuales fueron lavados con suero fisiológico (NaCl 0.9%) y colocados de forma individual dentro de bolsas herméticas con solución fisiológica para su transporte. Estas fueron colocadas en cajas transportadoras con gel refrigerante para poder mantener la temperatura a 5°C por un promedio de 20 horas según lo descrito por Allauca et al. (2019) hasta su llegada al Laboratorio de Reproducción Animal de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en la ciudad de Lima, dónde se procedió a su selección y procesamiento.

Los testículos fueron seleccionados según criterios de longitud y peso mencionados por Abraham et al. (2015) y Allauca et al. (2019). Los testículos con una longitud ≥3 cm se consideran testículos de animales completamente maduros y que producen espermatozoides, asimismo se consideró el peso como un criterio de selección, siendo los testículos con un peso ≥10 g los requeridos para el estudio. Es por esto que todos los testículos con una longitud mayor o igual a 3 cm y un peso mayor o igual a 10 g fueron procesados para este estudio.

Paso siguiente se procedió a preparar un dilutor en base a leche descremada como lo descrito por Banda et al. (2010), utilizando 19 mL de esta, 1 mL de yema de huevo y 0.970 g de fructosa, agregando posteriormente 1840 µL del crioprotector Dimetilacetamida (DMA), con la finalidad de llegar a una

concentración final de 1M. Finalmente según Martin et al. (2015), se procedió a mezclar en un mixer y la mezcla final fue almacenada en un tubo falcón de 50 mL y mantenida en estufa a una temperatura de 37.5°C.

3.4. Recuperación de espermatozoides

A cada uno de los testículos seleccionados se les procedió a retirar la túnica vaginal y luego se procedió a separar la cola del epidídimo (Abraham et al., 2015). Paso siguiente fue retirar el tejido conectivo adyacente de las colas de los epidídimos con una pinza y una tijera, y luego con el bisel no cortante de una hoja de bisturí se procedió a retirar el contenido de los vasos sanguíneos para evitar la contaminación de las muestras (Allauca et al., 2019).

La *cauda epididimaria* fue lavada en Solución Buffer Fosfato (PBS) y se colocó en una placa Petri temperada a 37.5°C, 1 mL de dilutor previamente preparado fue añadido y se procedió a realizar cortes seriados para poder obtener espermatozoides (Figura 1). Los espermatozoides fueron recuperados por medio de una micropipeta y colocados en tubos eppendorf de 1.5 mL, manteniendo el contenido temperado a 37.5°C siguiendo lo descrito por Banda et al. (2010).

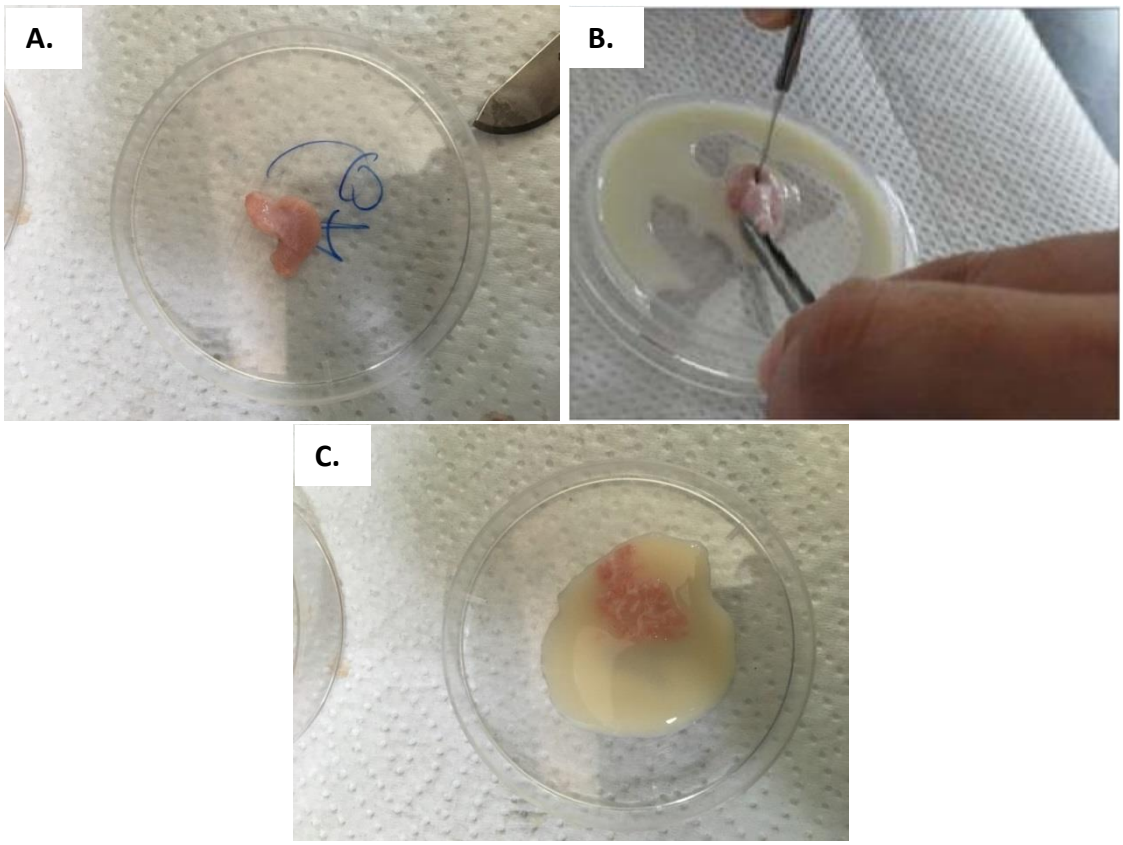


Figura 1. Recuperación de espermatozoides epididimarios de alpaca en dilutor. **A)** Cola de epidídimo separada y limpia, lista para ser trabajada. **B)** Cortes seriados de la cola de epidídimo. **C)** Dilutor conteniendo espermatozoides epididimarios.

3.5. Preparación de Reactivos

Para los experimentos se utilizaron los marcadores de apoptosis celular CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (C10723, Invitrogen) y Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI (V13242, Invitrogen), además se utilizó Yoduro de Propidio (PI) (L7011, Molecular Probes) y MitoTracker Deep Red FM (M22426, Molecular Probes).

3.5.1. CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (C10723, Invitrogen)

Se utilizó el reactivo para determinar la presencia de espermatozoides de alpaca con presencia de apoptosis tardía. Se agregó 6.25 mL de PBS a los 25 µL del reactivo inicial (2.0 mM) obteniendo finalmente 8 µM de concentración. El resultante del reactivo diluido se procedió a alicuotar en viales de 600 µL. Se determina la presencia de apoptosis tardía si los espermatozoides observados por medio de citometría de flujo fluorescen de color verde tanto en la cabeza, como su pieza media.

3.5.2 Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI (V13242, Invitrogen)

Este fluorocromo se utilizó para determinar la presencia de apoptosis temprana en espermatozoides. El kit consta de dos componentes; el primero es el reactivo de Anexina V FITC, al cual no se realizó ninguna dilución y se utilizó como solución de trabajo, El segundo componente, el buffer para Anexina V, se preparó de acuerdo a la cantidad de muestras a ser procesadas, siendo lo requerido para una sola muestra 100 µL de 5X Annexin Binding Buffer y 400 µL de agua ultrapura. Se consideraron espermatozoides positivos a apoptosis temprana, los que su cabeza fluoresce de color verde.

3.5.3 Yoduro de Propidio PI (L7011, Molecular Probes)

Este fluorocromo fue utilizado para poder determinar la presencia de espermatozoides muertos en las muestras. La solución de PI se procedió a alicuotar. Se obtuvieron 250 alícuotas de 20 µL (concentración final 12 µM) y se almacenaron a una temperatura de -20°C en oscuridad hasta el momento de su uso. La fluorescencia de color rojo en la cabeza del espermatozoide indica que este se encuentra muerto.

3.5.4 MitoTracker Deep Red FM (M22426, Molecular Probes)

Se utilizó este fluorocromo para determinar la presencia de actividad mitocorndrial en los espermatozoides. Cabe resaltar que no tuvo un uso directo para los resultados de nuestros datos, sólo se agregó para poder verificar que existen espermatozoides que aún se encuentran vivos. La solución de MitoTracker Deep Red FM se alicuotó. Se obtuvieron 42 alícuotas de 20 µL (concentración final 100 nM) y se almacenaron a una temeratura de -20°C en oscuridad hasta el momento de su uso. La fluorescencia de color naranja en la pieza media del espermatozoide resulta positiva para este fluorocromo.

3.6 Diseño Experimental

El trabajo estuvo dividido en dos experimentos, siendo el primero evaluar la apoptosis en el transcurso de cuatro horas de incubación de los espermatozoides de epidídimo, y el segundo, determinar cómo afecta el proceso de congelamiento a la apoptosis de espermatozoides de la alpaca obtenidos de colas de epidídimo.

En total se procesaron 74 muestras de testículo de alpaca, a los cuales se les tomó la longitud y el peso previamente, se les tomó el ancho y espesor para poder calcular el volumen de cada testículo. Se seleccionaron 34 muestras en total, siendo utilizadas 11 para el primer experimento y los 23 restantes para el segundo experimento. También fue evaluada la motilidad y concentración de las muestras, tomando 10 µL de muestra y colocándolos sobre láminas portaobjeto temperadas a 37.5°C, estas se cubrieron con láminas cubreobjeto y fueron observadas por medio de microscopio óptico con un objetivo de 40X para la correcta visualización, obteniendo el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. Para evaluar la concentración espermática de las muestras, se realizó una dilución 1:2, tomando 10 µL de los espermatozoides recuperados en dilutor y 190 µL de agua, y se colocó 10 µL en una cámara de Neubauer, observando en el microscopio con objetivo de 40X para realizar el conteo (Allauca et al., 2019).

Para el primer experimento se realizó una curva de supervivencia en la cual se evaluaron las 11 muestras durante cinco distintos momentos. Estos fueron 0 horas, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas post recuperación de espermatozoides. Para realizar este experimento a cada muestra se le alicuotó en 10 viales de 100 µL, 5 fueron evaluados utilizando el marcador CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent y los 5 restantes utilizando el marcador Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI.

Para el segundo experimento se utilizó un estudio de muestras pareadas, en el cual las muestras (n = 23) se dividieron en 2 alícuotas cada una y fueron evaluadas antes y después del congelamiento tanto con el marcador CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent y Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI.

3.7. Criopreservación

Una vez recuperados los espermatozoides del segundo experimento, se procedió a dividir cada muestra en cuatro alícuotas, dos de las cuales pasaron a ser colocadas en pajillas de 0.25 mL y sometidas a criopreservación. Esta se realizó utilizando un equipo de congelamiento automático Freeze Control® CL8800 (Cryologic) usando el programa número 7, con una temperatura inicial de 22°C y disminuye en 90 minutos a 5°C, temperatura a la que se mantiene por 30 minutos, para luego descender hasta congelarse completamente (Figura 2). Cuando el proceso termina, se retiraron las pajillas y se colocaron en un tanque de nitrógeno líquido, donde se mantienen hasta el día de su evaluación, en ell cual serán descongelados, tomando como referencia lo descrito por Martin et al. (2015).

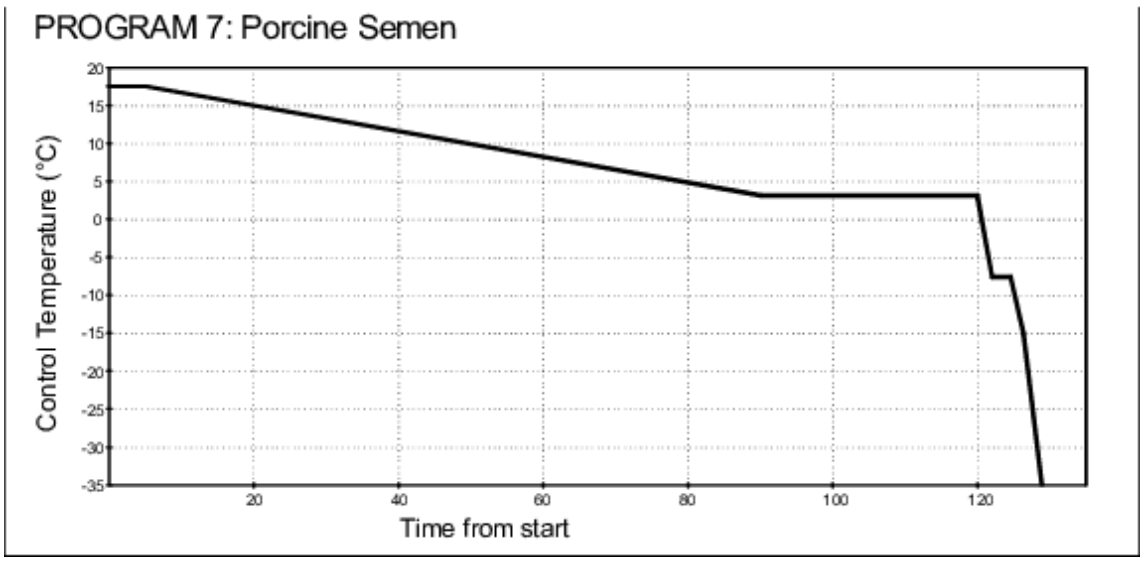


Figura 2. Curva de congelamiento del programa #7 Cryobath (Cryologic®) utilizado para el congelamiento de las muestras.

3.8. Evaluación del efecto del tiempo sobre la apoptosis

Para el primer experimento se utilizaron 11 muestras, las cuales fueron divididas en 10 alícuotas cada una y poder así evaluar la apoptosis temprana por medio del marcador Anexina V (5 alícuotas por muestra) y tardía con el marcador Caspasa-3/7 (5 alícuotas por muestra), durante el transcurso de cuatro horas.

Una vez recuperados los espermatozoides y habiendo pasado por su evaluación inicial, se tomó dos de las alícuotas, a una se le resuspendió en 100 µL de 1X Annexin V Buffer, y luego se le añadió 5 µL del marcador Annexin V conjugado con FITC, luego 0.5 µL de MitoTracker Deep Red FM y 0.5 µL de PI. Esto fue incubado en oscuridad a temperatura ambiente por 15 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se le añadió 400 µL de 1X Annexin V Buffer y se colocó en un baño frío a 5°C en un termobloque (Scilogex) por 5 minutos. Luego se procedió a analizar por citometría de flujo.

La alícuota restante se resuspendió en 100 µL de CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent y se incubó en oscuridad en una estufa a 37.5°C por 20 minutos, luego se le añadió 0.5 µL de MitoTracker Deep Red FM y 0.5 µL de PI, para volver a la estufa por 10 minutos más. Una vez terminada la

incubación se procedió a analizar por citometría de flujo. El mismo procedimiento se realizó al resto de alícuotas, pero evaluando cada hora, es decir los tratamientos fueron 0horas, 1 hora, 2 horas, 3 horas y 4 horas.

3.9. Evaluación del congelamiento sobre la apoptosis

Para el segundo experimento se utilizaron 23 muestras, las cuales cada una fue dividida en dos alícuotas. A una se procedió a realizarle dos lavados con PBS por 8 minutos a 600 G de acuerdo a lo descrito por Allauca et al. (2019) para retirar por completo el dilutor, se resuspendió en PBS y se separó en dos partes iguales para ser evaluada por medio de ambos fluorocromos. La otra alícuota se colocó en dos pajillas y pasaron a ser criopreservadas.

Las muestras frescas se evaluaron en el momento, una de las alícuotas fue evaluada por medio del marcador Annexin V conjugado con FITC y la otra con el marcador CellEvent TM Caspase-3/7 Green Detection Reagent, ambas alícuotas fueron trabajadas del mismo modo que en el experimento número 1. Paso seguido las muestras que pasaron por el proceso de criopreservación fueron descongeladas y se evaluaron de la forma ya mencionada, por medio de un equipo de citometría de flujo.

3.10. Citometría de flujo

Se utilizó un equipo de citometría de flujo FlowSight (Amnis, Seattle, EEUU) para evaluar las muestras, el cual posee un sistema integrado para el análisis de imágenes. Para las adquisiciones se utilizó el software INSPIRE® v.100.3.218.0 (Amnis, Seattle, EEUU) y para realizar la evaluación y el análisis de los datos el software IDEAS® v.6.2 (Amnis, Seattle, EEUU). Se utilizaron los lásers 488 nM para excita tanto a Annexin V conjugado con FITC, CellEvent Caspase-3/7 Green Detetction Reagent y PI, mientras para el MitoTracker Deep Red FM se utilizó el láser 642 nM. Las muestras consideradas positivas para Annexin V conjugada con FITC y CellEvent Caspase.3/7 Green Detection Reagent se observaron de color verde en el cuerpo de la célula, estas fueron consideradas positivas para apoptosis. Las muestras que se observaron de color

rojo a nivel del cuerpo de la célula fueron consideradas muestras con espermatozoides muertos por necrosis.

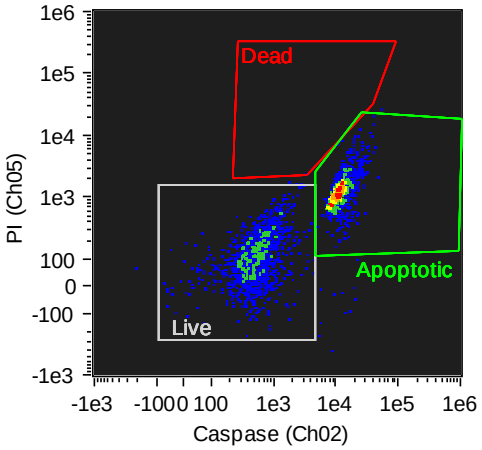
3.11. Análisis de datos

Para poder realizar la comparación de la proporción de espermatozoides con activación de caspasas 3 y 7 antes y después del congelamiento se utilizó una prueba t-Student pareada, lo mismo fue determinado para la traslocación de fosfatidilserina hacia fuera de la membrana celular con Anexina V. Para las muestras evaluadas por horas, se realizó una curva de supervivencia. Los datos obtenidos fueron evaluados por medio del software GraphPad Prism® versión 3.0 (San Diego, USA).

IV. RESULTADOS

Luego del procesamiento de las muestras se procedió a analizar los resultados, obteniendo diferentes figuras y tablas de resultados. Por medio del software Ideas® versión 6.0 se realizaron gráficos tipo Dot Plot tanto para las muestras trabajadas con el fluorocromo CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (C10723, Invitrogen) (Figura 3), como para las trabajadas con Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI (V13242, Invitrogen) (Figura 4). Estos gráficos permitieron corroborar que las poblaciones espermáticas presentaron distinta fluorescencia para los espermatozoides vivos, y los espermatozoides apoptóticos (Figura 5 y Figura 6).

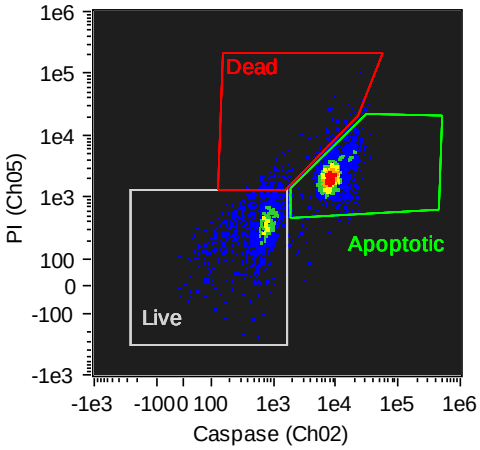
A. Sperm -5A Esp epid alpaca Caspasa PI MDR 01.12.21_11



Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	2821	100
Live & Sperm & R1	1491	52.9
Dead & Sperm & R1	2	0.07
Apoptotic & Sperm & R1	1313	46.5

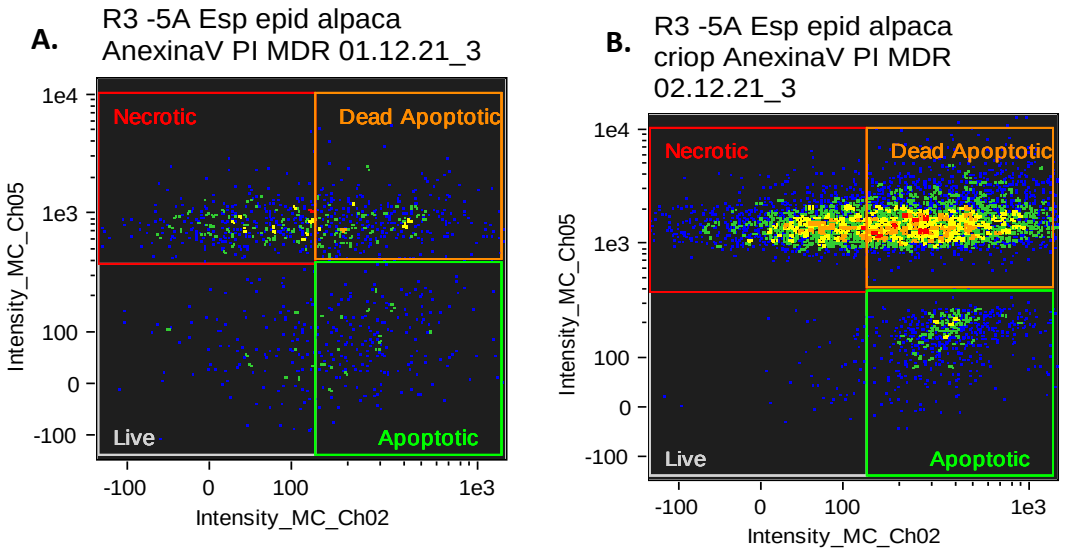
B. Sperm -5A Esp epid alpaca criop Caspasa PI MDR 02.12.21_11



Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	4424	100
Live & Sperm & R1	1438	32.5
Dead & Sperm & R1	105	2.37
Apoptotic & Sperm & R1	2818	63.7

Figura 3. Gráfico tipo Dot Plot para muestras trabajadas con el fluorocromo CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (C10723, Invitrogen), dónde se aprecian distintos cuadrantes dentro de una población espermática, mostrando espermatozoides vivos, necróticos y apoptóticos, tanto antes del congelamiento **(A)**, como luego del descongelamiento **(B)**.



Intensity_MC_Ch02

Population	Count	%Gated
R3 & Sperm & R1	1063	100
Live & R3 & Sperm & R1	123	11.6
Necrotic & R3 & Sperm & R1	369	34.7
Dead Apoptotic & R3 & Sperm...	335	31.5
Apoptotic & R3 & Sperm & R1	205	19.3

Intensity_MC_Ch02

Population	Count	%Gated
R3 & Sperm & R1	5996	100
Live & R3 & Sperm & R1	44	0.73
Necrotic & R3 & Sperm & R1	1820	30.4
Dead Apoptotic & R3 & Sperm...	3199	53.4
Apoptotic & R3 & Sperm & R1	619	10.3

Figura 4. Gráfico tipo Dot Plot para muestras trabajadas con el fluorocromo Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI (V13242, Invitrogen), dónde se aprecian distintos cuadrantes dentro de una población espermática, mostrando espermatozoides vivos (cuadrante inferior izquierdo), necróticos (cuadrante superior izquierdo), apoptóticos (cuadrante inferior derecho) y muertos apoptóticos (cuadrante superior derecho), tanto antes del congelamiento **(A)**, como luego del descongelamiento **(B)**.

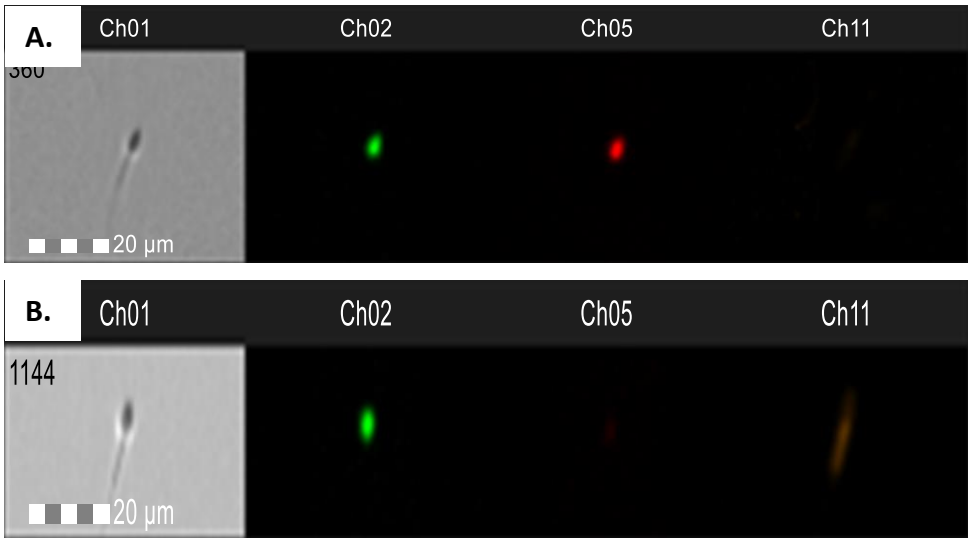


Figura 5. Imágenes tomadas por medio de citometría de flujo y análisis con imágenes por medio del Citómetro de Flujo FlowSight® Amnis, mostrando un espermatozoide apoptótico (A) y un espermatozoide vivo (B).

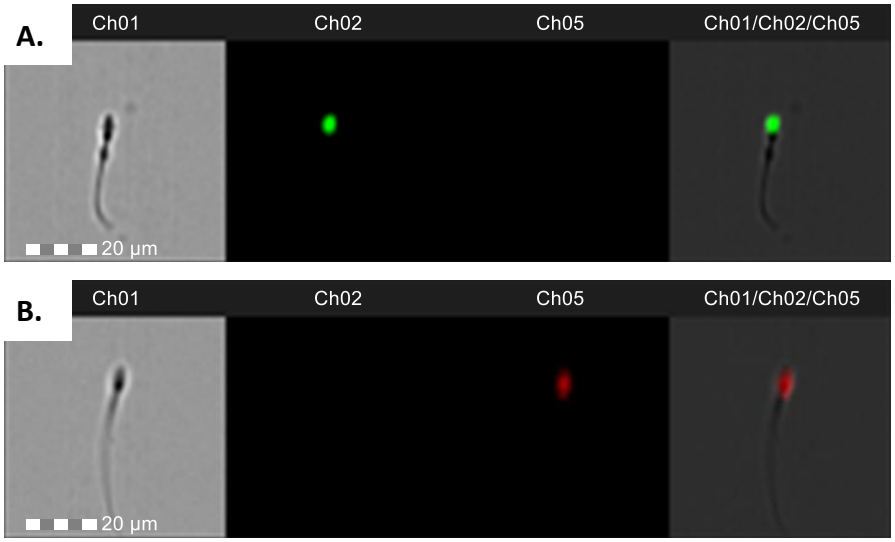


Figura 6. Imágenes tomadas por medio de citometría de flujo y análisis con imágenes por medio del Citómetro de Flujo FlowSight® Amnis, mostrando un espermatozoide apoptótico (A) y un espermatozoide muerto (B).

En la Tabla 2 se muestran parámetros basales de los testículos y de las muestras de espermatozoides obtenidos de epidídimo. Se procesaron un total de 74 testículos para obtener los 11 testículos del primero experimento y los 23 del segundo. Las muestras elegidas tuvieron un peso de 17.1 ± 3.4 g y una longitud de 3.9 ± 0.4 cm. En cuanto a la motilidad de los espermatozoides fue de 35.65 ± 22.38, mientras que para la concentración espermática fue de 128.8 ± 101.8 x 10^6 espermatozoides por mL.

Tabla 2. Parámetros de los testículos y de los espermatozoides epididimarios de las muestras utilizadas y totales.

	Muestras utilizadas (n=34)	Muestras totales (n=74)
Peso (g)	17.1 ± 3.4	13.7 ± 4.7
Longitud (cm)	3.9 ± 0.4	3.5 ± 0.6
Ancho (cm)	2.3 ± 0.2	2.1 ± 0.3
Alto (cm)	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.3
Volumen (cm^3)	22.6 ± 6.1	17.4 ± 7.5
Motilidad (%)	35.7 ± 22.4	No se evaluó
Concentración (x10^6 espermatozoides/mL)	123.8 ± 101.8	No se evaluó

Valores son promedios ± D.S

En la Tabla 3 se muestran los resultados del efecto del tiempo sobre la activación de Caspasa-3/7, se puede observar que es entre las 3 y 4 horas de incubación a 37°C dónde existen diferencias significativas en los resultados, elevándose los porcentajes de apoptosis a 42.7 ± 15.0 para las 3 horas y 46.4 ± 13.2 para las 4 horas.

Tabla 3. Efecto del tiempo (horas) sobre la activación de Caspasas-3/7 de espermatozoides vivos, muertos y apoptóticos incubados a 37°C.

	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Vivos (%)	69.0 ± 5.9 a	67.5 ± 6.1 a	59.9 ± 8.3 ab	52.0 ± 14.6 b	47.5 ± 13.4 b
Muertos (%)	2.0 ± 2.7	1.7 ± 1.7	1.0 ± 1.2	1.8 ± 3.3	1.7 ± 2.7
Apoptóticos (%)	27.7 ± 5.9 a	28.3 ± 5.5 a	36.3 ± 8.7 ab	42.7 ± 15.0 b	46.4 ± 13.2 b

Valores son promedios ± D.S

[a,b] diferencias significativas ($P < 0.05$) entre filas

En la Tabla 4 se puede apreciar los resultados para la traslocación de la fosfatidilserina luego de 4 horas de incubación de los espermatozoides a 37°C. Los porcentajes de apoptosis disminuyeron entra las 3 y 4 horas de incubación, donde se pueden ver las diferencias significativas. Para las 3 horas de evaluación el porcentaje de apoptosis fue de 17.1 ± 8.1 y para las 4 horas de 12.8 ± 9.0.

Tabla 4. Efecto del tiempo (horas) sobre la traslocación de fosfatidilserina de espermatozoides vivos, muertos por necrosis, muertos por apoptosis y apoptóticos incubados a 37°C.

	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
Vivos (%)	36.0 ± 11.2 a	33.6 ± 7.6 a	29.5 ± 8.0 a	24.9 ± 10.7 a	19.9 ± 9.9 ab
Muertos Ne (%)	14.8 ± 6.7 a	10.1 ± 3.5 a	16.6 ± 10.2 a	24.9 ± 17.1 ab	31.5 ± 15.6 ab
Muertos Ap (%)	16.1 ± 5.4 a	21.0 ± 4.8 a	25.3 ± 6.5 a	29.4 ± 11.9 ab	32.6 ± 12.2 ab
Apoptóticos (%)	25.6 ± 9.4 a	29.9 ± 6.8 a	23.7 ± 8.0 ab	17.1 ± 8.1 ab	12.8 ± 9.0 bc

Valores son promedios ± DS

[a,b] diferencias significativas ($P < 0.05$) entre filas

Muertos Ne: Muertos por necrosis

Muertos Ap: Muertos por apoptosis (colocar cómo diferenciar vivos, muertos y muertos apoptóticos).

El porcentaje de activación de Caspasa-3/7 se muestra en la Tabla 5, donde podemos ver los porcentajes de caspasas activadas antes y después del proceso de criopreservación.

Tabla 5. T-Student de porcentajes de espermatozoides vivos, muertos y apoptóticos de las muestras pre y post criopreservación evaluadas por CellEvent™ caspase 3-7.

	Pre-congelamiento	Post-congelamiento
Vivos (%)	59.96 ± 12.1[a]	27.26 ± 14.6[b]
Muertos (%)	3.83 ± 4.1[a]	36.16 ± 35.8[b]
Apoptóticos (%)	36.21 ± 11.3[a]	36.58 ± 33.7[a]

Valores son promedios ± D.S
Letras similares en filas indican diferencias ($p<0.05$)

El porcentaje de espermatozoides con presencia de apoptosis pre-congelamiento fue de 36.2 ± 11.3% y post-congelamiento de 36.6 ± 33.7%. La viabilidad se vio disminuida teniendo en un inicio 60.0 ± 12.1% y luego del congelamiento 27.3 ± 14.6%. Los espermatozoides necróticos aumentaron de 2.7 ± 4.1% a 36.7 ± 35.8%. Al observar la desviación estándar tan alta en los resultados de los porcentajes de espermatozoides con apoptosis y muertos, se decidió dividir las muestras en las que aumentó la apoptosis y otras en las que disminuyó la misma luego de la criopreservación.

Tabla 6. Promedio y D.S de los porcentajes de espermatozoides vivos, muertos y apoptóticos de muestras donde se eleva y reduce el porcentaje de apoptosis pre y post congelamiento evaluado por CellEvent™ Caspase 3-7.

	Pre-congelamiento	Post-congelamiento
Muestras donde aumenta el porcentaje de apoptosis		
Vivos (%)	60.8 ± 13.6	30.1 ± 15.3
Muertos (%)	1.5 ± 1.6	7.2 ± 5.3
Apoptóticos (%)	35.9 ± 13.0	63.5 ± 16.5
Muestras donde disminuye el porcentaje de apoptosis		
Vivos (%)	58.8 ± 10.3	23.6 ± 13.6
Muertos (%)	4.2 ± 5.8	74.9 ± 14.6
Apoptóticos (%)	36.6 ± 9.1	1.5 ± 2.2

Valores son promedios ± D.S

Observando los valores obtenidos en ambos grupos, podemos apreciar que los porcentajes de viabilidad (60.8 ± 13.6% y 58.8 ± 10.3%) y necrosis (1.5 ± 1.6% y 4.2 ± 5.8%) antes del congelamiento, pero luego de este proceso se encontró 74.9 ± 14.6% en el grupo con reducción de los valores de apoptosis frente a 7.2 ± 5.3% en el grupo con elevación de apoptosis, de espermatozoides necróticos. En ambos grupos la viabilidad post-descongelamiento fue similar (30.1 ± 15.3% y 23.6 ± 13.6%).

El porcentaje de traslocación de fosfatidilserina (apoptóticos positivos a Annexin V) se observa en la Tabla 7, donde se pueden ver los resultados de promedios ± D.S de las muestras antes y después del congelamiento.

Tabla 7. T-Student de porcentajes de espermatozoides vivos, muertos necróticos, muertos apoptóticos y apoptóticos de las muestras pre y post criopreservación evaluados por Annexin V FITC.

	Pre-congelamiento	Post-congelamiento
Vivos (%)	14.7 ± 6.2[a]	2.5 ± 2.3[b]
Muertos Ne (%)	23.0 ± 9.6[a]	24.3 ± 23.9[a]
Muertos Ap (%)	35.1 ± 10.4[a]	54.8 ± 19.7[b]
Apoptóticos (%)	21.9 ± 9.8[a]	7.5 ± 6.5[b]

Valores son promedios ± D.S
Letras similares en filas indican diferencias ($p<0.05$)

Según lo que se puede apreciar en el cuadro, el porcentaje de espermatozoides vivos disminuye de 14.7 ± 6.2% a 2.5 ± 2.3%, que es lo normal que se observa en espermatozoides luego del descongelamiento. En cuanto a espermatozoides muertos por necrosis (positivos a Annexin V y PI), los valores son estadísticamente iguales (23.0 ± 9.6% a 24.3 ± 23.9%). Los espermatozoides muertos por un proceso apoptótico (positivos a Annexin V) si fueron los que tuvieron un porcentaje que se elevó significativamente luego del congelamiento, siendo antes del proceso de criopreservación 35.1 ± 10.4% a 54.8 ± 19.7% luego del descongelamiento. En cuanto a los espermatozoides considerados solamente apoptóticos se obseravaba una disminución en el porcentaje, pre-congelamiento 21.9 ± 9.8% a post-congelamiento 7.5 ± 6.5%.

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación en alpacas, es el primero en mostrar como el tiempo de incubación y la criopreservación afectan al porcentaje de apoptosis de espermatozoides de alpaca obtenidos de epidídimo. Esto se pudo evaluar ya que se utilizaron dos marcadores de apoptosis, la Anexina V, como marcador de apoptosis temprana, y la Caspasa 3/7, como marcador de apoptosis tardía, los cuales fueron analizados en dos experimentos, el primero incubando los espermatozoides durante cuatro horas y el segundo analizando las muestras antes y después del congelamiento. El análisis fue realizado por medio de la citometría de flujo, con lo que se pudieron obtener los siguientes resultados; la traslocación de la fosfatidilserina, la cual se determinó por medio del fluorocromo Annexin V, se elevó a la hora de incubación (29.9 ± 6.8), mientras que a las tres (17.1 ± 8.1) y cuatro (12.8 ± 9.0) horas hubo una disminución del porcentaje de apoptosis. En cuanto a la activación de caspasas 3/7 se observa un aumento de porcentaje de espermatozoides apoptóticos a partir de las 3 horas de incubación (42.7 ± 15.0). Los resultados de traslocación de fosfatidilserina antes de la criopreservación fueron de (21.9 ± 9.8), mientras que al descongelamiento fue de (7.5 ± 6.5); para la activación de las caspasas 3/7 se obtuvo antes de la criopreservación un porcentaje de apoptosis de 36.2 ± 11.3 y post congelamiento el porcentaje fue de 36.6 ± 33.7, lo cual indicaría que la criopreservación aparentemente no genera cambios ni afecta los niveles de apoptosis.

En cuanto al experimento número 1, dónde las muestras fueron incubadas y analizadas en fresco durante 4 horas, podemos observar que en el caso del análisis por medio del marcador Annexin V hay una disminución del porcentaje de espermatozoides apoptóticos como ya se señaló anteriormente; la razón para que esto ocurra se evidencia con los resultados para espermatozoides que llegan a morir por un proceso apoptótico, siendo para las tres horas de incubación un porcentaje de 29.4 ± 11.9 y para las cuatro horas de 32.6 ± 12.2. Para el

marcador Caspasa 3/7, los porcentajes de apoptosis aumentaron a partir de las 3 horas de incubación, siendo el porcentaje de 42.7 ± 15.0. Esto podría confirmar que la Anexina V es un marcador de apoptosis temprana, ya que es detectado en altos porcentajes desde un inicio de la incubación y hasta cierto punto aumenta, pero conforme avanzan las horas ya no se observa aumento por la muerte de los espermatozoides; a diferencia de las caspasas 3/7, que es considerado un marcador de apoptosis tardía y claramente va en aumento conforme avanzan las horas, ya que más espermatozoides van entrando en un proceso de apoptosis.

En cuanto al segundo experimento, si se analiza el porcentaje de viabilidad espermática se puede apreciar una clara disminución del porcentaje, pasando de 14.7 ± 6.2% a 2.5 ± 2.3% para Anexina V, mientras 60.0 ± 12.1% a 27.3 ± 14.6% para caspasa 3/7, esta disminución es también observada en diferentes estudios, donde el proceso de criopreservación lleva a una disminución del porcentaje de viabilidad de espermatozoides; tenemos así los estudios en semen de humanos, donde se reporta una disminución de la viabilidad de 43 a 22% (Amor et al., 2018), otra especie en la cual se ha estudiado es en equinos, en el cual se observa una disminución de espermatozoides viables de 80 a 50% como menciona Martin et al. (2015), asimismo en semen de toros disminuye de 72 a 50% como lo ha descrito Martin et al. (2004) y en alpacas de 48 a 32% (Santiani et al., 2013), este último estudio utiliza al igual que en nuestro caso espermatozoides recuperados de epidídimo. Es importante evidenciar que en los estudios mencionados se utilizaron marcadores de viabilidad celular, mientras en nuestro trabajo los marcadores usados permitieron obtener el porcentaje de espermatozoides en apoptosis y necrosis.

Si consideramos estudios más recientes, los cuales han sido realizados en espermatozoides de alpacas recuperados de epidídimo, podemos también corroborar que el proceso de criopreservación genera una disminución en la viabilidad espermática, por ejemplo, Santiani et al. (2023) reportan un porcentaje de espermatozoides vivos de 49.8 ± 11.5% la cual disminuye luego del congelamiento a 32.3 ± 9.6%, Segura et al. (2023) mencionan que la viabilidad espermática disminuye de 59.96 ± 12.09% a 27.26 ± 14,62% luego de la

criopreservación, y Lévano et al. (2023) menciona que la disminución fue de 61.25 ± 8.29% a 43.8 ± 4.83%. Es importante también hacer mención al trabajo de Bertuzzi et al. (2024), quienes mencionan que bajo condiciones de refrigeración a 5 ºC durante 72 horas como máximo, la viabilidad espermática se mantendrá normal siempre y cuando se adicione plasma seminal al crioprotector.

El Yoduro de Propidio (PI) fue utilizado como marcador para espermatozoides muertos o necróticos. El PI es un fluorocromo que puede ingresar en la membrana espermática si esta se encuentra dañada, llegando a unirse al ADN, emitiendo una fluorescencia roja, el porcentaje aumentó de 23.0 ± 9.6 a 24.3 ± 23.9 para anexina V, mientras que para caspasa 3/7 fue de 2.7 ± 4.1% a 36.7 ± 35.8%; además al utilizar la anexina V como marcador se pudo observar una población espermática que aparecía como muerta, pero habiendo pasado por un proceso de apoptosis, en dónde el porcentaje obtenido aumentó luego de la criopreservación (35.1 ± 10.4 a 54.8 ± 19.7). Lo que se observa en estos resultados es la alta desviación estándar (D.S) post descongelamiento, esto nos lleva a deducir que dentro de la evaluación hay muestras en las cuales el porcentaje de espermatozoides necróticos se eleva, mientras en otras disminuye si hablamos de la caspasa 3/7.

Al realizar el test t-Student para realizar la comparación de las muestras antes y después de su congelamiento, como ya se mencionó, no presenta cambios, antes de la criopreservación (36.2 ± 11.3%) y después de la criopreservación (36.6 ± 33.7%); como se puede observar, similar a lo que ocurre con los espermatozoides necróticos, la D.S del porcentaje de espermatozoides apotóticos después del descongelamiento es elevada, y a diferencia de la alpaca donde no hay reportes previos de estudios similares, observando diferentes especies, se conoce que la criopreservación genera un incremento en la actividad de las caspasas en general; con lo cual podemos decir que aumenta la apoptosis.

Luego de producirse ROS a nivel mitocondrial, y llegar a niveles donde no existe motilidad espermática a causa del proceso de criopreservación, los espermatozoides entran en un proceso de apoptosis (Said et al., 2004).

Podemos observar una apoptosis temprana, la cual es evidenciada a través de la traslocación de la fosfatidilserina (PS) a nivel de la membrana celular, y también una apoptosis tardía debido a la activación de las caspasas (Paasch et al., 2004; Aitken y Baker, 2013). Según Fadok et al. (1992) y Vermes et al. (1995), la PS es un fosfolípido que se encuentra en la lámina interna de la bicapa lipídica de las células, la cual va a ser expuesta al exterior durante un proceso apoptótico debido a que hay una ruptura de la simetría de la membrana celular; la anexina V tiene la propiedad de unirse a fosfolípidos por una vía dependiente de calcio, lo que genera que sea muy afín con la fosfatidilserina (Raynal y Pollard, 1994). En cuanto a las caspasas, existen las iniciadoras y las ejecutoras, siendo las caspasas 3 y 7 ejecutoras como lo mencionan Earnshaw et al. (1999) y Walsh et al. (2008). La caspasa 3 es la que va a llevar a la célula a su destino en la cascada de apoptosis, una vez que esta caspasa se activa, la célula no puede revertir su situación y llegará a morir; es por esta razón que la caspasa 3 es la que se considera de mayor importancia ya que, al estar presente, indica que no habrá retroceso del proceso apoptótico, lo cual ha sido descrito por Said et al. (2010) y Ortega-Ferrusola et al. (2016).

En cuanto a la Anexina V, se ha trabajado en diversos tipos de estudios celulares y bajo otras metodologías, por ejemplo, en bacterias como la E. coli bajo microscopía de fluorescencia (Vermes et al., 1995), como también en espermatozoides de humanos bajo un sistema de electroforesis (Said et al., 2004), pero nunca se ha trabajado en espermatozoides de alpaca, por lo que los resultados obtenidos podrían ser luego utilizados para comparar con evaluaciones en semen fresco.

Durante el proceso apoptótico, el papel de las caspasas es sumamente importante, ya que durante esta cascada de eventos, son estas las que dan un comienzo y aumentan la velocidad con la que se da el proceso de apoptosis en la criopreservación (Wundrich et al., 2006; Amor et al., 2018); estas están implicadas en la espermatogénesis, ya que permiten mantener una homeostasis a nivel testicular eliminando células anormales y células sobrantes o excedentes, por lo que siempre se tendrán niveles iniciales de apoptosis en cualquier muestra espermática demostrado por Said et al. (2004) y Caselles et al. (2014). En estos

últimos años se están realizando estudios en espermatozoides de diferentes especies, como humanos, equinos y bovinos; estos estudios muestran un nivel basal de apoptosis antes del congelamiento de los espermatozoides, y el incremento de este proceso luego del proceso de criopreservación (Martin et al., 2004; Caselles et al., 2014; Amor et al., 2018).

Se conoce que en bovinos existe un incremento en la activación de caspasas luego de la criopreservacio, donde se observa que en un inicio es del 2% y luego del descongelamiento 12%, este estudio fue realizado por medio de citometría de flujo (Martin et al., 2016); en muestras de humanos el incremento observado es de 21% a 47% (Paasch et al., 2004), mientras otro estudio (Grunewald et al., 2005) señala que su incremento es de 39% a 55%. Otro caso que muestra un patrón similar es en equinos ya que el incremento es de 21% a 63% (Martin et al., 2015). Si se observan los resultados mencionados la mayoría de muestras inicia con un porcentaje de apoptosis alto, por lo que es lógico que las muestras descongeladas tengan porcentajes exponencialmente mayores; a diferencia del caso de los bovinos, donde se observa que el porcentaje inicial de activación de caspasas es bajo, y luego del descongelamiento el porcentaje no aumenta mucho. Por esta razón podemos deducir que siempre que se tengan muestras con un elevado porcentaje de espermatozoides con presencia de apoptosis al momento de la recuperación de espermatozoides, no serán muestras buenas para pasar por un proceso de criopreservación (Said et al., 2010; Martin et al., 2016).

En el caso de este estudio se ha encontrado algo muy interesante, si dividimos las muestras en dos grupos, según como los espermatozoides fueron afectados por la apoptosis debido al efecto del proceso de criopreservación; obtenemos muestras que se comportan diferente, aquellas donde la apoptosis disminuye en las muestras evaluadas (de 36,6 ± 9,1% a 1,5 ± 2.2%), y el otro donde la apoptosis aumentó en las mismas (de 37,7 ± 13,0% a 64,0 ± 16,7%); antes de la criopreservación se observan similares porcentajes de viabilidad en ambos grupos (60.8 ± 13.6% y 58.8 ± 10.3%) y necróticos (1.5 ± 1.6% y 4.2 ± 5.8%), pero después de la criopreservación, encontramos 74,9 ± 14,5% (grupo con reducción de apoptosis) frente a 7,2 ± 5,3% (grupo con elevación de la

apoptosis) de espermatozoides necróticos. En ambos grupos, la viabilidad seguida al descongelamiento fue similar (30.1 ± 15.3% y 23.6 ± 13.6).

Con los datos mencionados previamente, se muestra que en las alpacas pueden ocurrir dos eventos completamente distintos cuando realizamos un proceso de criopreservación que perjudiquen la calidad espermática; Si partimos con niveles altos de apoptosis, es probable que aumente el porcentaje de espermatozoides que mueran por necrosis y esto genere que la población apoptótica disminuya, el estrés post-congelamiento hizo que la célula pasara por un proceso de necrosis, siendo positivo a PI, pero también positivo a caspasa 3/7, la población que se menciona como apoptótica, solo es positiva a caspasa 3/7 y negativo a PI. En cuanto a las muestras donde hay un incremento de la activación de las caspasas 3 y 7 después de la criopreservación, se observa de igual forma en otras especies como ya se mencionó. Esto nos permite concluir que la apoptosis si incrementa sus porcentajes luego del proceso de criopreservación.

De acuerdo a lo descrito por Paasch et al. (2004) y Amor et al. (2018), es necesario realizar muchas más investigaciones que nos permitan conocer cuáles son los cambios que ocurren en los espermatozoides, que pueden ser bioquímicos y fisiológicos, durante el proceso del congelamiento y descongelamiento. Recientemente se han empezado a comprender los mecanismos moleculares que subyacen a la apoptosis acelerada en espermatozoides, a la cual actualmente se le conoce como espermptosis (Martin et al., 2016).

Sería muy interesante que se comiencen a considerar el uso de distintos marcadores de estrés oxidativo, con los cuales se van a poder observar de una mejor manera todos los efectos que estos producen a nivel de la célula espermática y que son negativos para ella, así en un futuro poder seleccionar muestras de alta calidad para ser congeladas (Martin et al., 2016).

VI. CONCLUSIONES

- Este estudio demuestra que se puede determinar la presencia de apoptosis en espermatozoides recuperados de epidídimo, tanto antes, como después de la criopreservación.

- Los porcentajes de apoptosis espermática aumentan luego de las 3 horas de haber sido recuperadas las muestras de las colas de los epidídimos.

- En alpacas es posible determinar dos efectos distintos luego de la criopreservación de espermatozoides, puede ocurrir que el porcentaje de apoptosis disminuya luego del congelamiento, como también puede ocurrir que este porcentaje se eleve posterior al proceso.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar un estudio en el cual se pueda analizar al menos un par de muestras desde el momento en que se realizó la colecta de los testículos, para así poder observar cómo se afectan los espermatozoides desde que son retirados del cuerpo del animal beneficiado, hasta que llegan al laboratorio.

- Se recomienda trabajar con espermatozoides recuperados de epidídimo que sean mezclados con plasma seminal, para poder comparar los resultados que hemos obtenido con unos más cercanos a la realidad en el campo.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Abraham, M., Puhakka, J., Ruete, A., Al-Essawe, E., De Verdier, K., Morrell, J., Báge, R. 2015.** Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. Acta Veterinaria Scandinavica, 58(1). doi:10.1186/s13028-016-0191-x.

2. **Abraham, M., De Verdier, K., Báge, R., Morrell, J. 2017.** Semen collection methods in alpacas. Veterinary Record, 180(25), 613-614.doi:10.1136/vr.104074.

3. **Agarwal, A., Said, T. 2004.** Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. BJU Int. 2005 Mar; 95(4): 503-7.doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05328.x.

4. **Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H., Venturino, A. 2005.** Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. Cryobiology. 50. 239-249.

5. **Aitken, R. 1994.** A free radical theory of male infertility. Reprod Fertil Dev. 6. 19-24.

6. **Aitken, R., Fisher, H. 1994.** Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. Bioessays. 16. 259-267.

7. **Aitken, R., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, D. 1998.** Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. Biol Reprod. 59. 1037-1046.

8. **Aitken, R. 2011.** The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function. Biol. Reprod. 85(1): p. 9-12.

9. **Aitken, R., Baker, M. 2013.** Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. Int. J. Dev. Biol. 57(2-4): p. 265-72.

10. **Aitken, R., Baker, M., Nixon, B. 2015.** Are sperm capacitation and apoptosis the opposite ends of a continuum driven by oxidative stress? Asian J Androl. 17(4): p. 633-9.

11. **Allauca, P., Ugarelli, A., Santiani, A. 2019.** Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. Rev. Inv. Vet. Pe. 30(1), 288–298. https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15677.

12. **Álvarez, J., Storey, B. 1989**. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. Gamete Res. 23. 77-90.

13. **Amor, H., Zeyad, A., Alkhaled, Y., Laqqan, M., Saad, A., Ben Ali, H., Hammadeh, M. 2018.** Relationship between nuclear DNA fragmentation, mitochondrial DNA damage and standard sperm parameters in spermatozoa of fertile and sub-fertile men before and after freeze-thawing procedure. Andrologia, 50(5), e12998.doi:10.1111/and.12998.

14. **Anglada, T., Terradas, M., Hernández, L., Genesca, A., Martin, M. 2015.** Analysis of residual DSBs in Ataxia-Telangiectasia Lymphoblast cells initiating apoptosis. Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International. Volume 2016, Article ID 8279560, 12 pages. http://dx.doi.org/10.1155/2016/8279560.

15. **Banda, J., Evangelista-Vargas, S., Ruiz, L., Sandoval, R., Rodríguez, C., Valdivia, M., Santiani, A. 2010.** Efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Rev. Inv. Vet. Pe, 21(2), 145-153.https://doi.org/10.15381/rivep.v21i2.129.

16. **Bansal, A., Bilaspuri, G. 2011.** Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen function. SAGE-Hindawi Access to Research Veterinary Medicine International. 2011. 1-8.

17. **Bertuzzi, M., Torres, E., Durand, M., Huanca, T., Giuliano, S., Carretero, M. 2024.** Cooling of alpaca spermatozoa using an extender with the addition of different percentages of seminal plasma. Anim. Rep. Sci. 260. 107383. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107383.

18. **Bilodeau, J., Blanchette, S., Cormier, N., Sirard, M. 2002.** Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. Theriogenology. 57. 1105-1122.

19. **Bortner, C., Oldenburg, N., Cidlowski, J. 1995.** The role of DNA fragmentation in apoptosis. Trends. Cel.l Biol. 5: 21-26.

20. **Bravo, P. 1994.** Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. Vet. Clin. N. Am. Food A. 10: 265-279.

21. **Bravo, P. 1995.** Physiology of reproduction and fertilityevaluation in themale alpaca. Proc. of Post Grad. Found. Vet. Sci. of Univ. of Sydney 257: 61-66.

22. **Bravo, P., Flores, U., Garnica, J., Ordoñez, C. 1997.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas. Theriogenology, 47(3), 619-626.doi:10.1016/s0093-691x (97)00020-4.

23. **Bravo, P. 2000.** Malelamoid semen evaluation. En: Camelid medicine, surgery and reproduction. Ohio: The Ohio St. Univ. Coll. of Vet. Med.

24. **Bravo, P., Skidmore, J., Zhao, X. 2000.** Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. Anim. Rep. Sci. 62(1-3), 173-193.doi:10.1016/s0378-4320(00)00158-5.

25. **Bravo, P. 2002.** The reproductive process of South American camelids. Utah: Seagull Priting. 100 p.

26. **Bravo, P. 2023.** Sperm physiology of south American camelids. Theriogenology – Recent Advances in the Field. https://doi.org/ DOI: 10.5772/intechopen.112876.

27. **Brown, B. 2000.** A review on reproduction in South American camelids. Anim. Reprod. Sci. 58: 169-195.

28. **Bustinza, V. 2001.** La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje. Univ. Nac. del Altiplano. Fac. Med. Vet. y Zoot. 343 p.

29. **Caselles, A., Miro-Moran, A., Morillo, A., Gallardo, J., Ortega-Ferrusola, C., Salido, G., Aparicio, I. 2014.** Identifation of apoptotic bodies in equine semen. Reproduction in Domestic Animals, 49(2), 254-262.doi:10.1111/rda.12264.

30. **Chatterjee, S., De Lamirande, E., Gagnon, C. 2001.** Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione. Molecular Reproduction and Development, 60(4), 498-506.doi:10.1002/mrd.1115.

31. **Chaveiro, A., Santos, P., Da Silva, F. 2007.** Assessment of Sperm Apoptosis in Cryopreserved Bull Semen After Swim-up treatment: A Flow Cytometric Study. Reproduction in Domestic Animals, 42(1), 17-21.doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00712.x.

32. **Chinnaiyan, A. 1999.** The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. Neoplasia. 1. 5-15.

33. **Choez, K., Evangelista, S., Castillo, R., Santiani, A. 2013.** Efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Spermova. 3. 83-84.

34. **Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., De Amicis, I., Carluccio, A. 2012.** Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. Theriogenology. 77. 166-173. https://doi.org/ 10.1016/j.theriogenology.2011.07.031

35. **Correa, J., Rodríguez, M., Patterson, D., Zavos, P. 1996.** Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. Theriogenology. 46. 413-420.

36. **Cucho, H., López, Y., Caldeira, C., Valverde, A., Ordóñez, C., Soler, C. 2019.** Comparisson of three different staining methods for the morphometric characterization of Alpaca (Vicugna pacos) sperm, using ISAS® CASA-Morph system. Nova Biologica Reperta 6(3). 284-291. https://doi.org/10.29252/nbr.6.3.284.

37. **D´Arcy, M. 2019.** Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. Cell Biology International 43(6): 582-592.doi: 10.1002/cbin.11137.

38. **Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M., Lassota, P., Traganos, F. 1992.** Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry, 13(8), 795-808.doi:10.1002/cyto.990130802.

39. **Da Silva, F., Marques, A., Chaveiro, A. 2010.** Reactive Oxygen Species: A Double-Edged Sword in Reproduction. The Open Veterinary Science Journal, 4: 127-133.

40. **De Iuliis, G., Wingate, J., Koppers, A., McLaughlin, E., Aitken, R. 2006.** Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 91: 1968-1975.

41. **De Lamirande, E., Gagnon, C. 1995.** Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. Human Reproduction, 10: 15-21.

42. **De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C. 1997.** Reactive oxygen species and sperm physiology. Reviews of Reproduction, 2: 48-54.

43. **Delhon, G., Von Lawzewitsch, I. 1994.** Ductus epididymis compartments and morphology of epididymal spermatozoa in llamas. Anat. Histol. Embryol. 23. 217-225. https://doi.org/ 10.1111/j.1439-0264.1994.tb00470.x

44. **Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. 2000.** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome cdependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 102: 33-42.

45. **Earnshaw, W., Martins, L., Kaufmann, S. 1999.** Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. Annual Review of Biochemistry, 68(1), 383-424.doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.383.

46. **Elmore, S. 2007.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Tox. Path. 35 (4): 495-516.

47. **England, B., Foote, W., Cardoza, A., Matthews, D., Riera, S. 1971.** Oestrus and matingbehaviour in the llama (Lama glama). J. Endocrinol. 45: 505-513.

48. **Evangelista, S., Trelles, X., Muchotrigo, D., Choez, K., Santiani, A. 2014.** Producción intracelular de anión superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxidación lipídica durante el proceso de criopreservación de semen de alpaca. Spermova, 4: 61-63.

49. **Evangelista, S. 2014.** Efectos patológicos de las especies reactivas de oxígeno en espermatozoides. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos, 1-16.

50. **Evangelista-Vargas, D., Evangelista-Vargas, S., Valdivia, M., Santiani, A. 2016.** Assessment of spermatozoa in fertile alpaca (*Vicugna pacos*) males: Study of sperm head morphometry using a nonautomated digital method and sperm morphology based on strict criteria. Reproduction in Domestic Animals, 52 (2), 312-318.doi: 10.1111/rda.12907.

51. **Evangelista-Vargas, S., Santiani, A. 2017.** Detection of intracelular reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide) and lipid peroxidation During cryopreservation of alpaca spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals, 52(5), 819-824.doi:10.1111/rda.12984.

52. **Fadok, V., Voelker, D., Campbell, P., Cohen, J., Bratton, D., Henson, P. 1992.** Exposure of phosphtidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. Journal of Immunolgy, 148(7), 2207-16.

53. **Flores, P., García-Huidobro, J., Muñoz, C., Bustos-Obregón, E., Urquieta, B. 2002.** Alpaca semen characteristics previous to a mating period. Anim. Reprod. Sci. 72(3-4), 259-266.doi:10.1016/s0378-4320(02)00095-7.

54. **Franco, E., Sumar, J., Varela, M. 1981.** Eyaculación en la alpaca (Lama pacos). IV Conv. Inter. sobre Cam. Sud. Punta Arenas: Corporación Nacional Forestal, Instituto de la Patagonia, Chile.

55. **Fuchs, J., Thiele, J., Ochsendorf, F. 1997.** Oxidants, antioxidants and oxidative injury. En: Ochsendorf F and Fuchs J (eds), Oxidative stress in male infertility, Michael Itschert, Gardez! Verlag, Germany, 21-40.

56. **Garnica, J., Achata, R., Bravo, P. 1993.** Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. Animal Reproduction science, 32: 85-90.

57. **Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P., Didelot, C., Kroemer, G. 2006.** Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell. Death Diff. 13: 1423-1433.

58. **Giuliano, S., Cisale, H., Ferrari, M. 2018.** Morphology, morphometry and chromatin distribution in llama sperm nuclei. Reproduction in Domestic Animals. 52(2). 502-511. https://doi.org/10.1111/rda.13137.

59. **Grunewald, S., Paasch, U., Said, T., Sharma, R., Glander, H., Agarwal, A. 2005.** Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. Fertil Steril. 83(Suppl 1):1106-1112.

60. **Guérin, P., El Mouatassim, S., Menezo, Y. 2001** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Human reproduction update, 7: 175-189.

61. **Guimarães, T., Lopes, G., Ferreira, P., Leal, I., Rocha, A. 2012.** Characteristics of stallion epididymal spermatozoa at collection and effect of two refrigeration protocols on the quality of the frozen/thawed sperm cells. Animal Reproduction Science. 136. 85-89. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.028.

62. **Hill, M., Adrain, C., Duriez, P., Creagh, E., Martin, S. 2003.** Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. EMBO J. 23: 2134-2145.

63. **Huerta, S., Goulet, E., Huerta-Yepez, S. y Livingston, E. 2007.** Screening and Detection of Apoptosis. J. of Surg. Res. 139: 143-156.

64. **Juárez, J., Santiani, A. 2019.** Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Rev. Inv. Vet. Pe. 30(3), 1175-1183. https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16608.

65. **Karimfar, M., Niazvand, F., Haghani, K., Ghafourian, S., Shirazi, R., Bakhtiyari, S. 2015.** The protective effects of melatonin against cryopreservation-induced oxidative stress in human sperm. Int J Immunopathol Pharmacol, 28(1): 69-76. https://doi.org/10.1177/0394632015572080.

66. **Kershaw, C., Maxwell, W. 2011.** The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. Theriogenology, 76:1197–1206.

67. **Kiechle, L., Zhang, X. 2002.** Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. Clin. Chim. Acta. 326: 27-45.

68. **Köhler, G., Hering, U., Zschörnig, O., Arnold, K. 1997.** Annexin V interaction with phosphatidylserine-containing vesicles at low and neutral pH. Biochemistry, 36(26):8189-94. https:// doi.org/10.1021/bi9703960.

69. **Kumar S, Millar J, Watson P. 2003.** The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-ratecooling machines. Cryobiology, 46: 246-253.

70. **Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A., Maisse, G. 2001.** Effect of sperm cryopreservation on sperm dna stability and progeny development in rainbow trout. Molecular Reproduction and Development, 60: 397-404.

71. **Lévano, G., Quispe, J., Vargas, D., García, M., López, A., Águila, L., Valdivia, M. 2023.** Effect of atomized black maca (*Leidium meyenii*) supplementation in the cryopreservation of alpaca (*Vicugna pacos*) epididymal spermatozoa. Animals. 13(13). 2054. https://doi.org/10.3390/ani13132054.

72. **Losno, W., Coyutupa, J. 1981.** Testosterona sérica en alpacas machos pre púberes. Resúmenes compendiados de los proyectos de investigación realizados por la Univ. Nac. May. De San Marcos. Periodo 1975 -1979. Tomo II. Lima Perú. p 116.

73. **Mahfouz, R., Du Plessis, S., Aziz, N., Sharma, R., Sabanegh, E., Agarwal, A. 2010.** Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. Fertil Steril, 93(3):814-21. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.10.068.

74. **Makker, K., Agarwal, A., Sharma, R. 2009.** Oxidative stress & male infertility. Indian J Med Res, 129: 357-367.

75. **Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R. 2004.** Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. Biology of Reproduction, 71(1), 28-37. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.024281

76. **Martin, P., Ortega, C., Vizuete, G., Plaza, M., Rodríguez, H., Peña, F. 2015.** Depletion of Intracelular Thiols and Increased Production of 4- Hydroxynonenal that Occur During Cryopreservation of Stallion Spermatozoa Lead to Caspase Activation, Loss of Motility, and Cell Death. Biology of reproduction, 93:143, 1–11. https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.132878.

77. **Martin, P., Ortega, C., Anel, L., Del Petre, C., Álvarez, M., De Paz, P., Anel, L., Peña, F. 2016.** Caspase 3 activity and lipoperoxidative status in raw semen predict the outcome of cryopreservation of stallion spermatozoa. Biology of reproduction, 95 (3), 53-53. https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.139444.

78. **Mazzilli, F., Rossi, T., Sabatini, L., Pulcinelli, F., Rapone, S., Dondero, F., Gazzaniga, P. 1995.** Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. Act Eu Fertil, 26: 145-148.

79. **Montalvo, C., Cevallos, E., Copaira, M. 1979.** Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. Res Proyectos de Investigación. Univ. Nac. May. de San Marcos, Lima: 37.

80. **Morton, M., Bathgate, R., Evans, G., Maxwell, M. 2007.** Cryopreservation of epididymal alpaca (Vicugna pacos) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. Reproduction, Fertility and Development, 19(7), 792. https://doi.org/10.1071/rd07049.

81. **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.

82. **Novoa, C., Sumar, J., Franco, E. 1970.** Empadre complementario de alpacas hembras vacías (Abstract). En: Proc. 1st. Int. Conv. On South American camelids. Puno: Univ. Nac. Téc. del Altiplano.

83. **O'Flaherty, C., Beconi, M., Beorlegui, N. 1997.** Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. Andrologia, 29: 269-275.

84. **Ortega Ferrusola, C., Anel-López, L., Martín-Muñoz, P., Ortiz Rodríguez J., Gil, M., Álvarez, M., Peña, F. 2016.** Computational flow cytometry reveals that cryopreservation induces spermptosis but subpopulations of spermatozoa may experience capacitation-like changes. Reproduction, 153(3), 293-304. https://doi.org/10.1530/rep-16-0539.

85. **Paasch, U., Sharma, R., Gupta, A., Grunewald, S., Mascha, E., Thomas, A., Glander, H., Agarwal, A. 2004.** Cryopreservation and thawing Is Associated with Varying Extent of Activation of Apoptotic Machinery in Subsets of Ejaculated Human Spermatozoa1. Biology of Reproduction, 71(6), 1828-1837. https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025627.

86. **Print, C., Loveland, K. 2000.** Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. Bioessays, 22(5):423-430.

87. **Raynal, P., Pollard, H. 1994.** Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins. Biochim Biophys Acta, 1197(1):63-93. https://doi.org/10.1016/0304-4157(94)90019-1.

88. **Saelens, X., Festjens, N., Vande, W., Van Gurp, M., Van Loo, G., Vandenabeele, P. 2004.** Toxic proteins released from mitochondria in cell death. Oncogene, 23: 2861-2874.

89. **Said, T., Paasch, U., Glander, H., Agarwal, A. 2004.** Role of caspases in male infertility. Hum. Reprod. Upd, 10(1):39-51.

90. **Said, T., Gaglani, A., Agarwal, A. 2010.** Implication of apoptosis in sperm cryoinjuri. Reproductive BioMedicine Online, 21(4), 456-462. https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.011.

91. **Saleh, R., Agarwal, A. 2002.** Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. Journal of Andrology, 23: 737-752.

92. **Salmon, S., Maxwell, W. 2000.** Storage of ram semen. Animal Reproduction Science, 62: 77-111.

93. **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 Journal of Andrology, 7: 303-309.

94. **Santiani, A. 2012.** Uso de dos análogos de superóxido dismutasa para prevenir la desestabilización espermática prematura durante la criopreservación y vitrificación en espermatozoides de alpaca. Tesis Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.

95. **Santiani, A., Evangelista, S., Valdivia, M., Risopatrón, J., Sánchez, R. 2013.** Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (tempo and tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. Theriogenology, 79: 842-846.

96. **Santiani, A., Evangelista, S., Sepúlveda, N., Risopatrón, J., Villegas, J., Sánchez, R. 2014.** Addition of superoxide dismutase mimics during cooling process prevents oxidative stress and improves semen quality parameters in frozen/thawed ram spermatozoa. Theriogenology, 82(6):884-9. https://doi.org/ 10.1016/j.theriogenology.2014.07.002.

97. **Santiani, A., Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S. 2016.** Characterization of functional variables in epididymal alpaca (Vicugna pacos) sperm using imaging flow cytometry. Animal Reproduction Science. 173. 49-55. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.08.010.

98. **Santiani, A., Juárez, J., Allauca, P., Román, B., Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S. 2023.** Cryopreservation effect on sperm viability, mitocondrial membrane potential, acrosome integrity and sperm capacitation of alpaca spermatozoa detected by imaging flow cytometry. Reproduction in Domestic Animals. 58(4). 560-563. https://doi.org/10.1111/rda.14318.

99. **Sariözkan, S., Bucak, M., Tuncer, P., Taşdemir, U., Kinet, H., Ultaş, P. 2010.** Effects of different extenders and centrifugation/washing on postthaw microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of angora buck sperm. Theriogenology, 73: 316-323.

100. **Segura, C., La Rosa, J., Báez, L., Gómez-Quispe, O., Evangelista-Vargas, S., Morrell, J., Santiani, A. 2023.** Activation of caspase-3/7, an apoptotic-related marker, during incubation and cryopreservation of alpaca (*Vicugna pacos*) spermatozoa. Reproduction in Domestic Animals. 58(7). 1005-1011. https://doi.org/10.1111/rda.14397

101. **Shaha, C., Tripathi, R., Mishra, D. 2010.** Male germ cell apoptosis: regulation and biology. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biol. Sci. 365(1546): p. 1501-1515.

102. **Sies, H. 1985.** Oxidative stress: introductory remarks. En: Sies H, ed. Oxidative Stress. Academic Press. Londres, p 1-8.

103. **Sies, H. 1993.** Strategies of antioxidant defense. European Journal of Biochemistry, 215: 213-219.

104. **Stiblar-Martincic, D. 2009.** Morphometrical evaluation of germ cell apoptosis in infertile men. Fol. Biol. (Praha), 55(6):233-237.

105. **Sumar, J. 1996.** Reproduction in llamas y alpacas. Anim. Reprod. Sci, 42: 405 – 415.

106. **Sumar, J. 2002.** Llamas y alpacas. En: Hafes ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7a ed. México: McGraw Hill Interamericana, P 224 -242.

107. **Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Tuncer, P., Coşkun, E., Özgürtaş, T., Aydin, F., Büyükleblebici, O., Gürcan, I. 2013.** Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, dna integrity and oxidative stress parameters. Cryobiology, 66: 38-42.

108. **Tosic, J. 1947.** Mechanism of hydrogen peroxide formation by spermatozoa and the role of amino-acids in sperm motility. Nature, 159: 544-544.

109. **Tselkas, K., Saratsis, P., Karagianidis, A., Samoulidis, S. 2000.** Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed semen and their effects on some semen parameters. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift, 107: 69-72.

110. **Urquieta, B., Flores, P., Muñoz, C., Bustos-Obregón, E., García-Huidobro, J. 2005.** Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a mating period. Anim. Reprod. Sci, 903(3-4), 329-339. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.01.019.

111. **Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. 1995.** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods, 184(1):39-51. https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i.

112. **Villegas, J., Schulz, M., Soto, L., Sanchez, R. 2005.** Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. Apoptosis, 10(1):105-10. https://doi.org/ 10.1007/s10495-005-6065-8.

113. **Walsh, J., Cullen, S., Sheridan, C., Luthi, A., Gerner, C., Martin, S. 2008.** Executioner caspasa-3 and caspasa 7 are functionally distinct proteases. Proceedings of the National Academy of Sciencies, 105(35), 12815-12819. https://doi.org/10.1073/pnas.0707715105.

114. **Wang, A., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D., Loughlin, K. 1997.** Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. Urology, 49: 921-925.

115. **Wundrich, K., Paasch, U., Leicht, M., Glander, H. 2006.** Activation of Caspases in Human Spermatozoa during Cryopreservation-An Inmunoblot Study. Cell and Tissue Banking, 7(2), 81-90. https://doi.org/10.1007/s10561-005-0276-7.

116. **Xu, Y., Dong, H., Yang, W. 2016.** Regulators in the apoptotic pathway during spermatogenesis: Killers or guards? Gene, 582(2): p. 97-111.

117. **Zhivotovsky, B., Orrenius, S. 2001.** Current Concepts in Cell Death. En: Wiley, J. & Sons (eds). Current Protocols in Cell Biology. USA: Wiley InterScience, 18.1.1- 18.1.18.