

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

**Efecto del α -tocoferol durante el proceso de
criopreservación en espermatozoides de alpaca
(*Vicugna pacos*)**

TESIS

para optar al título profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTOR

Isela Betsy Mancisidor Solorzano

ASESOR

Mg. Martha Valdivia Cuya

LIMA – PERU

2013

Dedicatoria

A mi hermana Karina, quien con su ejemplo de vida me motiva siempre a conseguir mis objetivos y no desistir.

Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo y haberme permitido obtener muchas cosas, no solo académicas sino también experiencias de vida muy enriquecedoras.

A mis padres y hermanos, quienes siempre me dieron todo su apoyo y su inestimable cariño, por alentarme a seguir adelante y estar conmigo a lo largo de este camino. Gracias porque sin ustedes no hubiera sido posible.

A mi asesora de tesis Ms. Martha Valdivia Cuya, por haberme abierto las puertas del laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal y confiar en mi capacidad para realizar este trabajo, por su constante apoyo e interés en cada una de las etapas de este proceso y por estar siempre dispuesta a ayudarme cuando la necesité.

Al Dr. Jaime Ruiz Bejar, Jefe del Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica por la prestación de sus instalaciones, laboratorios y equipos para el desarrollo de la etapa inicial de este trabajo y brindarme todas las facilidades desde el primer día que llegue a su institución.

A José, Leandra, Sugar y Duriel de la U.N.H por su ayuda y disposición en todo momento, y en especial a Paulo e Indira por su compañerismo y amistad, por su tiempo y ayuda en la colecta de muestras, por haber hecho más fáciles cada una de las tareas dentro y fuera del laboratorio.

A todos mis compañeros del laboratorio del L.F.R.A.: Nadia, Rosmary, Pepe, Jojo, Luis R., Andree y Sheyla, por compartir y enseñarme parte de lo que saben, por ayudarme a esclarecer muchas dudas, por sus consejos y palabras de aliento en momentos difíciles, y todos los buenos ratos en su compañía.

A Marilyn por haber compartido conmigo metas, sueños, viajes locos, risas, momentos de estrés, amanecidas improvisadas en el laboratorio, incontables almuerzos, situaciones de peligro, días interminables evaluando muestras, por todos los buenos y malos momentos que a lo largo de este proceso vivimos juntas.

A Naty por sus ánimos, por las largas conversaciones aún en la distancia, y su amistad incondicional.

A todos mis compañeros del laboratorio del L.F.R.A.: Nadia, Rosmary, Pepe, Jojo, Luis R., Andree y Sheyla, por compartir y enseñarme parte de lo que saben, por ayudarme a esclarecer muchas dudas, por sus consejos y palabras de aliento en momentos difíciles, y todos los buenos ratos en su compañía.

A Marilyn por haber compartido conmigo metas, sueños, viajes locos, risas, momentos de estrés, amanecidas improvisadas en el laboratorio, incontables almuerzos, situaciones de peligro, días interminables evaluando muestras, por todos los buenos y malos momentos que a lo largo de este proceso vivimos juntas.

A Naty por sus ánimos, por las largas conversaciones aún en la distancia, y su amistad incondicional.

A Fanny, Claudia y Luis G. por su tiempo, paciencia y ayuda constante en la orientación del análisis estadístico de los datos.

A todas las personas que con sus palabras, buena onda, disposición, su confianza y cariño, contribuyeron de alguna forma para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

INDICE	i
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCION	1
II. MARCO TEORICO	3
2.1. <u>La alpaca</u>	3
2.2. <u>Anatomía reproductiva y Fisiología de la alpaca macho</u>	7
2.2.1. Órganos reproductivos	7
2.2.2. Características del semen y espermatogénesis	8
2.3. <u>Criopreservación de espermatozoides</u>	10
2.4. <u>Composición de los diluyentes</u>	13
2.5. <u>Estrés oxidativo en espermatozoides</u>	16
2.5.1. Estrés Oxidativo	16
2.5.2. ROS	16
2.5.3. Antioxidantes	17
2.6. <u>ROS, antioxidantes y función espermática</u>	20
2.6.1. Origen de ROS en el sistema reproductivo Masculino	20
2.6.2. Rol fisiológico de ROS en el sistema reproductivo Masculino	22
2.6.3. Efecto perjudicial de ROS en las funciones espermáticas	23
2.6.4. Efecto de la adición de antioxidantes sobre el estrés oxidativo en espermatozoides	26

2.7. <u>Efecto de la criopreservación espermática sobre el estrés oxidativo</u>	28
III. HIPOTESIS	30
IV.OBJETIVOS	30
V. MATERIAL Y MÉTODOS	31
5.1. <u>Diseño experimental</u>	31
5.2. <u>Materiales</u>	31
5.2.1. Material biológico	31
5.2.2. Reactivos, medios y soluciones	32
5.3. <u>Metodología</u>	34
5.3.1. Recolección de espermatozoides del epidídimo	34
5.3.2. Evaluación de la muestra	34
5.3.3. Procesado y Criopreservación de la muestra	39
5.3.4. Análisis estadístico	40
VI. RESULTADOS	43
VII. DISCUSIÓN	48
VIII. CONCLUSIONES	53
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54
X. ANEXOS	66

RESUMEN

Espermatozoides criopreservados de *Vicugna pacos* "alpaca" fueron sometidos a condiciones estresantes que estarían asociadas con una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una disminución de su capacidad antioxidante lo que conlleva a la peroxidación lipídica de sus membranas reduciendo su viabilidad celular. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del suplemento α -Tocoferol en la movilidad, vitalidad, integridad funcional de membrana (HOST) e integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca congelados/descongelados. Espermatozoides epididimarios obtenidos de 16 alpacas fueron criopreservados en medio TES-Tris-yema suplementado con distintas concentraciones de α -Tocoferol (0, 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) usando el procedimiento de congelamiento lento en pajillas y almacenados a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo mínimo de 30 días.

Los resultados mostraron que los valores de motilidad espermática en los grupos suplementados fueron significativamente ($p < 0.05$) mayores que el grupo no suplementado. El diluyente suplementado con 200 $\mu\text{g/mL}$ de α -Tocoferol tuvo un valor de vitalidad significativamente más alto que con las otras concentraciones ($p < 0.05$). Los porcentajes de HOST y acrosoma intacto fueron significativamente mejorados ($p < 0.05$) por la suplementación con 200 $\mu\text{g/mL}$ de α -Tocoferol comparado con el grupo control. En conclusión, α -Tocoferol, como suplemento, a una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ en el diluyente TES-Tris-yema durante la criopreservación tuvo un efecto positivo en la calidad espermática post-descongelamiento.

ABSTRACT

Cryopreserved sperm of *Vicugna pacos* "alpaca" were subjected to stressful conditions that would be associated with an overproduction of reactive oxygen species (ROS) and a decrease in antioxidant capacity which leads to lipid peroxidation of the membrane reducing cell viability. The aim of this study was to investigate the effect of α -Tocopherol supplementation on motility, viability, functional integrity of the membrane and acrosomal integrity of frozen/thawed alpaca sperm. Epididymal sperm collected from 16 alpacas were cryopreserved in TES-Tris-yolk medium supplemented with different concentrations of α -Tocopherol (0, 200, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, using the slow freezing procedure in straws and stored at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ for a minimum period of 30 days.

The results showed that the sperm motility values in the supplemented groups were significantly ($p < 0.05$) higher than that unsupplemented group. The extender supplemented with $200\mu\text{g}/\text{mL}$ of α -Tocopherol had a vitality value significantly higher than that of other concentrations ($p < 0.05$). The percentages of HOST and acrosome intact were significantly improved by supplementing with $200\mu\text{g}/\text{mL}$ of α -Tocopherol compared with control group. In conclusion, α -Tocopherol, supplemented at $200\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration in TES-Tris-yema extender during cryopreservation had a positive effect on post-thawed sperm quality.

I. INTRODUCCIÓN

La criopreservación de espermatozoides es una de las principales biotecnologías reproductivas que ha permitido incrementar el potencial genético de muchas especies de interés económico en la producción animal a partir de padres élite. Sin embargo, los métodos actuales de criopreservación aún resultan en una disminución de la viabilidad (Saleh y Agarwall, 2002), movilidad y el declinamiento de la fertilidad del espermatozoide, esto debido en parte, al incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que son asociadas con los procesos de congelamiento/descongelamiento (Bucak *et al.*, 2008).

La producción de ROS es una consecuencia normal del metabolismo oxidativo, en condiciones fisiológicas normales, existe un balance entre la generación de ROS y los antioxidantes. Sin embargo, una sobreproducción de ROS y una disminución de la actividad de defensa antioxidante puede generar fácilmente peroxidación lipídica (LPO) (Aitken, 1994), debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados presente en los fosfolípidos de la membrana espermática; causando alteraciones estructurales, pérdida de: la movilidad y capacidad fecundante del espermatozoide (Bilodeau *et al.*, 2001).

Hasta el momento, los protocolos de criopreservación desarrollados para espermatozoides de alpacas no han mostrado resultados favorables en relación a su calidad espermática post-descongelamiento, lo que ha sido evidenciado principalmente en una drástica disminución de la movilidad inicial a un 20-30% en muestras seminales (Valdivia *et al.*, 1999) y a solo un 18% en muestras epididimarias según lo descrito por Morton *et al.* (2007), lo cual sugiere que los métodos actuales para criopreservar espermatozoides de alpaca no son óptimas y aún es necesaria mayor investigación.

La adición de un antioxidante natural como el α -Tocoferol al diluyente de congelación podría ayudar a preservar la actividad metabólica y viabilidad celular de los espermatozoides de alpaca, tal como ha sido demostrado en la criopreservación de espermatozoides bovinos (Beconi *et al.*, 1993), donde α -Tocoferol ejerce un rol protector para ambas características. Es conocido que α -Tocoferol actúa como un depurador de radicales peroxilo [LOO^*] y alcoxilo [LO^*] de los lípidos, interrumpiendo los procesos de reacción en cadena que propagan la peroxidación lipídica; previniendo, de este modo, el daño oxidativo en espermatozoides criopreservados (Ernster *et al.*, 1992). En base a la información previa en espermatozoides bovinos, se puede hipotetizar que la adición del antioxidante α -Tocoferol al diluyente, puede ser un paso cercano a mejorar la calidad de espermatozoides de alpaca congelados, mejorando y optimizando los protocolos de criopreservación, contribuyendo de esta manera al desarrollo de programas de mejoramiento genético en esta especie.

II. MARCO TEORICO

2.1. La alpaca

La alpaca es uno de los cuatro camélidos sudamericanos (mamíferos de la familia camelidae) actualmente reconocidos, dos de los cuales son especies salvajes, el guanaco (*Lama guanicoe*, Muller 1976) y la vicuña (*Vicugna vicugna*, Molina 1782), y dos son especies domesticadas, la alpaca (*Lama pacos*) y la llama (*Lama glama*) de acuerdo con Linnaeus (1758).

En un tiempo se creía que tanto la alpaca y la llama se derivaron de guanacos. Sin embargo, a la luz de nuevas evidencias arqueozoológicas de hace 6.000 a 7.000 años en los Andes peruanos se vincularon los orígenes de la alpaca con la vicuña. Kadwell *et al.* (2001) investigaron los orígenes de estas formas domesticadas utilizando marcadores de ADN mitocondrial y nuclear, sus resultados apoyan la hipótesis de que la alpaca se deriva de la vicuña (y confirmaron la hipótesis de que la llama se deriva del guanaco). Dada la divergencia bien establecida entre el guanaco y la vicuña, en el 2001 la alpaca cambio la clasificación de su género de *Lama pacos* a *Vicugna pacos* ante la Royal Society (Kadwell *et al.*, 2001).

La población de alpacas de las dos razas (Suri y Huacaya) habita en el Altiplano Andino del centro y sur del Perú, el norte de Bolivia, Ecuador y Chile distribuidos a una altitud desde los 3500 a 4800 msnm. Hay un estimado de 3.5 a 4 millones de alpacas en Sudamérica; el 95% de éstas se encuentra principalmente en las regiones del sur del Perú. Según estimado de CONACS, en el año 2001 habría una población de 3 041 598 alpacas (citado por Fernández-Baca, 2005). Más del 80 por ciento de las alpacas son de propiedad de comunidades campesinas y pequeños productores que conducen entre 50 y 100 cabezas por rebaño en forma extensiva.

La rentabilidad económica de los criadores alto andinos proviene principalmente de la comercialización de la fibra y carne de estos animales. Los índices productivos de fibra van desde 3 a 6 libras/cabeza/año y la producción de carne de 20 a 30 kg/cabeza según el nivel de tecnología de los sistemas de producción alpaqueras. Sin embargo estos índices productivos son bajos, como consecuencia de las inadecuadas técnicas de manejo de pastos y manejo sanitario (problemas de enterotoxemia en crías, parasitismo en adultos), que afectan el aumento de los rebaños, y por tanto la capacidad de capitalización del productor (Fernández-Baca, 2005).

El adecuado manejo reproductivo de cualquier especie animal requiere del conocimiento de su fisiología reproductiva. Las alpacas tienen una vida reproductiva de aproximadamente 14 años, las hembras alcanzan la madurez sexual entre los 12 a 15 meses, mientras que los machos alrededor de los 30 a 36 meses.

La alpaca hembra presenta actividad sexual entre los meses de diciembre a marzo (Sumar, 1996) que corresponde a la época de lluvias y de mayor disponibilidad de pastos. Durante este período, la hembra no presenta ciclos ovulatorios periódicos, como ocurre en otros ungulados, sino que permanece en celo continuo hasta que es tomada por el macho. La ovulación es inducida por el estímulo coital 24 horas después del apareamiento. El periodo de gestación es de 345 ± 15 días y usualmente resulta en el nacimiento de una sola cría. Se ha descrito que cerca del 50 por ciento de las gestaciones terminan dentro de los primeros 30 días por muerte del embrión. (Fernández-Baca, 1993).

Es indispensable que los machos destinados a la reproducción, además de las características fenotípicas deseables, reúnan las condiciones necesarias para asegurar altas tasas de fertilidad. Los estudios del gameto masculino de alpaca son escasos, esto debido en parte a las deficientes técnicas usadas para obtener el semen. De los diversos métodos de colección de semen, la electroeyaculación es el que mejores resultados a dado (citado por Sumar, 1996), sin embargo una de las principales

limitaciones de esta técnica es la contaminación del semen con la orina y la excesiva dilución de la muestra (máx. 243 mil spz/mL). Ante ello, se ha propuesto trabajar con muestra espermática obtenida directamente del epidídimo (citado por Sumar, 1996), la cual presenta una alta concentración de espermatozoides.

Las biotecnologías aplicadas a la reproducción, tal como la inseminación artificial (IA), son herramientas que podrían tener un impacto considerable en el proceso de mejoramiento genético en las alpacas, al permitir la diseminación masiva de características deseables del macho. Pese a los esfuerzos realizados desde hace varios años, no se ha logrado aún desarrollar una metodología que asegure resultados que justifiquen económicamente la aplicación masiva de esta técnica. Los escollos para este progreso son principalmente técnicos e incluyen problemas con el método de colección del semen, su manipulación y la falta de un eficiente procedimiento de criopreservación de los gametos, que asegure la sobrevivencia y funcionalidad de la mayor parte de la población espermática.



Figura 1. La alpaca (*Vicugna pacos*). Huancavelica-Perú.

Foto: Isela B. Mancisidor

2.2. Anatomía reproductiva y Fisiología de la alpaca macho

2.2.1. Órganos reproductivos

Los camélidos presentan un pene fibroelástico con una flexura sigmoidea pre-escrotal que permite la retracción del pene en el prepucio en un estado de no erección (Smith, 1999). En las alpacas el pene erecto tiene una longitud de 35 - 40 cm (Sumar 1983; citado por Brown 2000), la estructura interna consta de tres cuerpos cavernosos que están rodeados por fibras gruesas de la túnica albugínea (5-7 mm de espesor en camellos; Elwishy 1988). En su extremo terminal, presenta una proyección cartilaginosa con forma de gancho curvado y tiene un pequeño proceso uretral de aproximadamente 1 cm de longitud en alpacas (Sumar, 1983). La punta cartilaginosa puede ser una adaptación para facilitar la penetración a través de la cérvix durante la copulación (Smith, 1999).

Los dos testículos se mantienen en un escroto no pendular situado por debajo del ano. El escroto, que es de naturaleza similar a la protuberancia sub-anal encontrado en cerdos, roedores y carnívoros (Smith, 1985; citado por Brown, 2000), mantiene los testículos (y los espermatozoides contenidos) a una temperatura ligeramente más baja que la temperatura del cuerpo. El peso promedio de los testículos completamente desarrollados es de aproximadamente 15 g. Sin embargo, el tamaño y peso testicular de los animales varía considerablemente en relación a su edad y peso corporal (Ver tabla 2.1). Los ductos eferentes se extienden desde el testículo dentro de la cabeza del epidídimo (Bravo, 1995; citado por Morton, 2008).

El epidídimo es pequeño y estrechamente adherido al testículo (Smith, 1999), el cual consta de una cabeza, cuerpo y cola. La cabeza y el cuerpo son sitios de maduración espermática, mientras que la cola está asociada con el almacenamiento de los espermatozoides (Elwishy, 1988). Los conductos deferentes, son tubos musculares por los que se excretan los espermatozoides al exterior, el cual se origina en la cola del

epidídimo. La longitud total del conducto deferente es de unos 40 cm. En la parte final de su trayecto, cerca de la vejiga, el conducto deferente se dilata pero no forma la ampolla característica del conducto deferente como en otras especies (Sumar, 1996).

La próstata es en forma de H y se encuentra en el cuello de la vejiga y las glándulas bulbo uretrales, que son de forma ovalada, se encuentran a ambos lados de la uretra a la salida pélvica. No existen vesículas seminales en los camélidos sudamericanos (Smith, 1999).

Tabla 2.1. Tamaño y peso testicular en relación a la edad y peso corporal en alpacas (Bravo 1995), adaptado de Morton et al. 2008.

Edad (Años)	Dimensiones Testiculares (cm)	Peso testicular (g)	Peso corporal (Kg)
1	2.5 x 1.5	2.9	36.6
3	3.4 x 2.3	13.9	43.9
5	3.7 x 2.4	13.8	52.0

2.2.2. Características del semen y espermatogénesis

El semen de las alpacas es muy viscoso (Garnica *et al.*, 1993; Bravo *et al.* 1997) lo cual hace difícil su manipulación para determinar los parámetros espermáticos tales como concentración y movilidad espermática. La licuefacción del semen se da luego de 23 horas (varía entre 8 a 30 horas) después de la colección (Bravo, 1997). La concentración de espermatozoides varía desde aproximadamente 30,000 hasta 150 millones por mL en alpacas (Garnica *et al.* 1993). El pH del semen de camélidos se encuentra en el rango de 7.2 - 8.6 (Bravo *et al.* 1997).

El movimiento de los espermatozoides en el semen no diluido es descrito como oscilatorio, ya que la mayoría de espermatozoides se mueven hacia atrás y adelante, y sólo del 5 al 10% de los espermatozoides tienen un movimiento progresivo hacia adelante (Bravo *et al.*1997). La viabilidad de los espermatozoides presentes en el semen de alpaca varía desde un 58% a 83%, mientras que los porcentajes de espermatozoides con morfología normal están en un rango de 71% a 84% (Bravo *et al.*, 1997). Las anomalías morfológicas en el semen de alpaca incluyen anomalías en los espermatozoides tales como: presencia de doble cola (9-15%), cabezas sin colas y cabezas dobles (3-13%) y la presencia de gotas citoplasmáticas en 1 – 7% de los espermatozoides (Brown, 2000).

El espermatozoide de alpaca presenta una longitud total de 47.29 micras, mientras que el largo y el ancho promedio de la cabeza mide 6.12 y 3.68 micras respectivamente (Palomino 1962; citado por Rodríguez, 2009). En otro estudio, empleando un sistema de análisis de imagen computarizado, Buendía (2002) evaluó la morfometría de las cabezas de los espermatozoides presentes en el semen, en el cual definió tres categorías de acuerdo al tamaño de las cabezas: normal 50%, pequeño 26% y grande 24% y cinco categorías de acuerdo a la forma de la cabeza del espermatozoide: normal 47%, piriforme 3%, pequeño 20%, redondo 1% y grande 29%.

La espermatogénesis en los camélidos ha sido dividida en ocho estadios con el desarrollo inicial de la espermatogonia en las regiones externas del túbulo seminífero progresando a espermatocito primario y secundario, espermátidas y espermatozoides. Las células de Leydig se encuentran entre los túbulos seminíferos y secretan la testosterona en las venas testiculares y vasos linfáticos (Delhon y Lawzewitsch, 1987; citado por Morton, 2008).

Estudios histológicos testiculares han mostrado que los túbulos seminíferos en las alpacas tienen un diámetro de 174 – 237 μ m (Bravo *et al.*, 2000) y que el lumen aparece a los 12 meses de edad y que los primeros espermatozoides y células de Leydig observables se producen poco después, a los 15 a 18 meses de edad (Montalvo *et al.*, 1979; citado por Brown, 2000). Sin embargo, aun no se conoce en detalle el proceso de espermatogénesis de esta especie.

2.3. Criopreservación de espermatozoides

La criopreservación del semen es una valiosa herramienta para la preservación de los recursos genéticos. Esto ha facilitado el uso generalizado de la inseminación artificial (IA) en el ganado vacuno, equino y ovino, permitiendo así una amplia diseminación de material genético de “individuos elite” a su progenie.

Hay un considerable interés en la aplicación de la tecnología de IA en camélidos, la cual es limitada debido a que la criopreservación de semen de estas especies no está suficientemente desarrollada (Bravo *et al.*, 2000). El semen de los camélidos es generalmente de pobre calidad y altamente viscoso lo cual dificulta su manipulación, dilución y evaluación. Además, hay muy poco conocimiento sobre la fisiología espermática de los camélidos (Bravo *et al.*, 2000).

En las alpacas, el semen es de poco volumen y baja concentración de espermatozoides los cuales presentan un movimiento oscilatorio (Bravo *et al.*, 1997; citado por Morton 2007). En este sentido, los espermatozoides del epidídimo, al no estar en contacto con el plasma seminal proveen un buen modelo de estudio ya que elimina los efectos de la viscosidad (que atrapa al espermatozoide) y facilita el establecimiento y refinado de los métodos de criopreservación para los espermatozoides alpaca.

Diversos parámetros afectan la eficiencia de la criopreservación de los espermatozoides. Estos incluyen al diluyente (buffer, azúcar/fuente de energía y otros suplementos como los antioxidantes), el agente crioprotector (tipo y concentración), el

tiempo de exposición del espermatozoide al crioprotector, la temperatura del crioprotector durante la exposición, el sistema de envasado de los espermatozoides para el congelamiento *freezing packages* (pajuelas, pellets en crioviales, ampollas de vidrio), y la tasa de congelamiento/descongelamiento.

Morton *et al.*, (2007) emplearon dos sistemas de empaquetamiento para criopreservar espermatozoides epididimarios de alpaca: i) pellets y ii) pajuelas, los que fueron congelados a su vez mediante dos técnicas: utilizando hielo seco y los vapores del nitrógeno líquido; para evaluar el efecto del *packaging* sobre la movilidad e integridad acrosomal post-descongelación. Los resultados mostraron una alta movilidad espermática (27%) en las muestras congeladas como pellets tanto en hielo seco como en nitrógeno líquido, mientras que la integridad acrosomal fue similar para todos los grupos. En tanto que, Gonzáles (2008) describió una tasa de sobrevivencia de solo 5% post-descongelamiento en espermatozoides epididimarios de alpaca que fueron congelados como pellets sobre hielo seco.

Los daños causados a la membrana espermática ocurren en un intervalo de temperatura entre los -15 y -60°C , que las células experimentan en dos ocasiones, durante la congelación y la descongelación, y no durante el almacenamiento en nitrógeno líquido. A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130°C no existe agua en el estado líquido (Mazur *et al.*, 1984). El proceso de deshidratación celular que acompaña la congelación lenta es potencialmente benéfico para la sobrevivencia de la célula, en cuanto tasas de congelación rápidas son consideradas como causa de muerte celular, debido a la formación intracelular de cristales de hielo (Watson *et al.*, 1995). Sin embargo, si el ritmo de congelación es extremadamente rápido el hielo intra-celular constituye micro-cristales y los daños derivados son muy reducidos (Amann y Pickett, 1987). El proceso de criopreservación incluye la refrigeración (*cooling*), la congelación y la descongelación. Cada etapa del protocolo ejerce una interacción especial con la estructura, la función de la membrana y

con el metabolismo celular (Hammerstedt *et al.*, 1990); pudiendo el espermatozoide perder su capacidad de funcionar normalmente en cualquiera de estas etapas (Watson *et al.*, 1995). Por otra parte, dichas etapas del protocolo de congelación se influyen mutuamente, así que los ritmos de cambio de temperatura elegidos en una determinada etapa del proceso afectan directamente a los que se utilizarán en la etapa siguiente (Hammerstedt *et al.*, 1990). Es por tanto que el logro de una longevidad celular máxima, requiera que el ritmo de descongelación esté en concordancia con el ritmo apropiado de congelación (Mazur *et al.*, 1984).

Banda *et al.*, (2010) criopreservaron espermatozoides de alpaca en 2 etapas i) enfriamiento (desde los 37 a los 4°C) y ii) congelación lenta (desde los 5 hasta los -80 °C) con un sistema termocontrolado en pajuelas de 0.25mL, empleando tres diluyentes basados en TRIS, TES y leche descremada. El descongelamiento de las pajuelas se realizó en baño maría a 42°C por 45 segundos. Se observó que la movilidad post-descongelamiento obtenida por el grupo Leche descremada fue significativamente más alta (17.0%) que el grupo TES (8.6%).

La viabilidad de los espermatozoides ha sido evaluada por la integridad de su membrana externa, ya que le sirve como protección al gameto masculino. El proceso de criopreservación causa daños a las membranas espermáticas. Generalmente, las membranas afectadas son la plasmática, la acrosomal externa y la mitocondrial. La desestabilización de la membrana plasmática después de la congelación se asemeja a una capacitación fisiológica del espermatozoide. El espermatozoide capacitado y/o con acrosoma reaccionado tiene una vida limitada, reduciendo así su fertilidad (Watson *et al.*, 1995).

Los cambios bruscos de temperatura durante el proceso de criopreservación alteran la organización de los componentes estructurales de la membrana plasmática, afectando sus propiedades. Esas alteraciones están asociadas a cambios en la permeabilidad y capacidad de fusión. Por otra parte, los espermatozoides pueden presentar hinchazón y

rupturas en la membrana plasmática externa y acrosomal, cambios en la fluidez de la membrana, desregulación del influjo de calcio y alteraciones en la actividad enzimática acrosomal (Januskauskas *et al.*, 1999).

La criopreservación puede producir una población con menor tiempo de vida *in vivo*, reduciendo la eficiencia de la población como un todo. Después de la criopreservación los espermatozoides sobrevivientes contienen más calcio intracelular que antes, reflejando daño a la membrana en el mecanismo de permeabilidad selectiva (Bailey *et al.*, 2000).

2.4. Composición de los diluyentes

Los diluyentes ejercen un papel fundamental en la preservación del semen, prolongando la viabilidad de las células espermáticas y preservando sus características funcionales por un periodo de tiempo limitado (refrigeración) o indefinidamente (congelación). Para llevar a cabo su misión el diluyente debe cumplir con una serie de condiciones (Fiser *et al.*, 1981): aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática, una fuente de factores proteicos de crioprotección (yema de huevo o leche), la protección por los agentes crioprotectores (ACPs) frente al shock térmico por frío (dimetilacetamida, glicerol), controlar el pH del medio en torno a la neutralidad (bicarbonato, TRIS, HEPES, citrato), la presión osmótica (sales NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano (penicilina G - sódica, estreptomina). Además, presentan diversos aditivos, como antioxidantes (Vit E, Vit C) y aminoácidos (cisteína, glicina).

El uso del medio diluyente tiene por objetivo proteger a los espermatozoides de los choques térmico y/o osmótico que ocurren durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación, ya que estos pueden causar daños irreversibles a los espermatozoides, debido a la formación de cristales de hielo intracelular que afectan la

estructura físico-química de la célula, causando daños principalmente, a la membrana plasmática, al acrosoma y al metabolismo energético (Pickett *et al.*, 1987).

El proceso de criopreservación ideal debe preservar, en la mayor proporción posible, la integridad de las diferentes estructuras del espermatozoide (Watson *et al.*, 1995). La utilización de uno o más agentes crioprotectores es indispensable para minimizar los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Gao *et al.*, 1995). Los crioprotectores se han clasificado según su capacidad para atravesar la membrana: en *penetrantes o intracelulares* como el glicerol, DMSO (dimetilsulfoxido), DMA (dimetilacetamida), etilenglicol, y en *no-penetrantes o extracelulares* incluyendo determinados azúcares, lipoproteínas de la yema de huevo y proteínas de alto peso molecular (Hammerstedt *et al.*, 1990).

La elección del agente crioprotector (ACP) es uno de los principales factores a determinar cuando se establecen los protocolos de congelación, puesto que son altamente especie-específicos y su efectividad varía en función de la concentración utilizada. El glicerol es un crioprotector comúnmente usado y frecuentemente empleado cuando se establecen protocolos de criopreservación para nuevas especies, varios estudios en criopreservación de semen de camélidos: alpacas (Gonzales *et al.*, 2008), camellos bactrianos (Niasari-Naslaji *et al.*, 2007) y llamas (Aller *et al.*, 2003) han empleado una concentración final de 6-7% de glicerol en el medio de congelación. Sin embargo, Morton *et al.*, (2007) criopreservó espermatozoides epididimarios de alpaca utilizando una concentración final de glicerol de 3% obteniendo algunas mejoras en sus resultados, sugiriendo que los experimentos previos donde se utilizó 6-7% de glicerol en la criopreservación semen de alpaca, pueden haber excedido el nivel óptimo de glicerol requerido por el espermatozoide de alpaca.

Por otro lado, Canorio (2008) realizó un estudio en el cual criopreservó espermatozoides epididimarios de alpaca utilizando dos ACPs distintos: DMA (dimetilacetamida) a 0.75, 0.375 y 0.18M y DMSO (dimetilsulfoxido) a 0.5, 0.25 y

0.125M. Se encontró que el uso de DMA 0.375M ejercía un mayor efecto crioprotector sobre la viabilidad (52%) e integridad de la membrana (57%) luego del descongelamiento.

Los criodiluyentes comúnmente usados en la criopreservación de semen de alpacas son a base de TRIS (tris -hidroximetilaminometano), citrato y lactosa. Otros diluyentes incluyen glucosa o fructuosa, con yema de huevo o leche de vaca descremada.

Las proteínas de la leche descremada y yema de huevo actúan como crioprotectores no penetrantes (Maxwell y Evans, 1990), al recubrir la membrana plasmática del espermatozoide protegiendo así su estructura de la acción del frío, y por ello, es un componente común en la composición de varios diluyentes de semen.

Se cree que la protección al choque térmico ofrecida por la yema de huevo sea debido a la presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se adhieren a la membrana celular durante el proceso de criopreservación, preservando, así, la membrana del espermatozoide (Moussa *et al.*, 2002). De esa forma, la yema de huevo actúa en la superficie de la membrana plasmática, restaurando la pérdida de los fosfolípidos y, aparentemente, induciendo una alteración transitoria de su composición, previniendo la ruptura de la membrana plasmática (Farstard *et al.*, 1996). Los fosfolípidos que componen la fracción LDL de la yema de huevo protegen el semen, específicamente durante el proceso de refrigeración a 5°C.

Diversos estudios han concluido que la adición de yema de huevo al diluyente mejora la movilidad, integridad acrosomal y supervivencia de los espermatozoides después de la descongelación, Santiani *et al.*, (2005) demostraron que mejores índices de viabilidad espermática fueron obtenidos cuando el semen de alpaca fue congelado con un medio a base de leche descremada y con una cantidad reducida de yema de huevo 5% v/v, comparado con otro medio Tris que tenía en su composición un 20% v/v de yema de huevo. Las tasas de espermatozoides viables con acrosoma intacto fueron de 18.7% y 4% respectivamente.

2.5. Estrés oxidativo en espermatozoides

2.5.1. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es definido como un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de radicales libres, los cuales exceden la capacidad antioxidante de un organismo, que involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas como las vitaminas E y C, o por una disminución en la respuesta homeostática de las células o tejidos, provocando daño oxidativo a las biomoléculas. (Sánchez *et al.*, 2004). Los espermatozoides almacenados bajo condiciones aeróbicas, durante la refrigeración, congelación, descongelación e incubación, requieren oxígeno (O_2) para apoyar su metabolismo normal. Un exceso de metabolitos de oxígeno, puede sin embargo, causar daño celular o apoptosis (De Lamirande y Gagnon, 1995). Asimismo, estos daños podrían ser mayores en espermatozoides provenientes del epidídimo que en los de eyaculado, ya que estos contienen mecanismos antioxidantes que provienen del plasma seminal (Chen *et al.*, 2003), los cuales contrarrestan los efectos dañinos de ROS.

2.5.2. ROS

Especies reactivas de oxígeno (ROS, del término en inglés: *reactive oxygen species*) son los intermediarios químicos reactivos del metabolismo del oxígeno, formados como subproductos durante las reacciones enzimáticas normales de señalización inter e intracelular (Nordberg *et al.*, 2001).

Los términos radical libre y oxidante son también usados para referirse a ROS, pero no son los más apropiados, pues no todas las especies reactivas de oxígeno son radicales libres. Lo mismo se aplica al término oxidante, ya que algunas ROS (O_2^- y H_2O_2) pueden actuar tanto como agentes oxidantes o reductores, en sistemas diferentes.

Entonces, especies reactivas de oxígeno (ROS) incluye todos los radicales y no radicales derivados del oxígeno (Nordberg *et al.*, 2001).

Los espermatozoides de mamíferos representan una lista creciente de tipo celular que exhibe una capacidad para generar ROS cuando son incubadas bajo condiciones aeróbicas, tales como, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($\bullet O_2^-$), el radical hidroxilo ($OH\bullet$), y el radical hipoclorito ($OHCl\bullet$). Debido a su naturaleza altamente reactiva, ROS puede combinarse fácilmente con otras moléculas, causando directamente oxidación que puede conducir a cambios estructurales y funcionales causando daño celular (Guerin *et al.*, 2001).

ROS representa una amplia categoría de moléculas que incluye a los radicales (ión hidroxilo, superóxido, óxido nítrico, piróxilo, etc.) y no radicales (ozono, oxígeno solo, peróxidos de lípidos, peróxido de hidrogeno) y derivados del oxígeno (De Lamirande y Gannon, 1995).

2.5.3. Antioxidantes

Halliwell y Gutteridge, (1999) definieron a los antioxidantes como cualquier sustancia que, cuando están presentes en bajas concentraciones en comparación con la del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente, la oxidación de dicho sustrato.

Para protegerse del efecto letal de la formación excesiva de ROS, la célula posee un sistema de defensa antioxidante enzimático y uno no enzimático. Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran: superóxidodismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxiredoxinas (Prx), glutatión (GSH), glutatión reductasa (GR) y glutatión peroxidase (GPx). Forman parte del sistema no-enzimático, un gran número de compuestos de bajo peso molecular, incluyendo las vitaminas C y E, diferentes compuestos de selenio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico y ácido lipoico (Nordberg y Arnér, 2001). Este sistema puede actuar en dos líneas: como removedor/barredor del agente antes que le

cause lesión (GSH, SOD, CAT, GPx y la Vitamina E) o como reparador de la lesión ocurrida (ácido ascórbico, GR y GPx).

Con excepción de la vitamina E (α -Tocoferol), que es un antioxidante estructural de la membrana, la mayor parte de los agentes antioxidantes se encuentran en el medio intracelular (Ferreira y Matsubara, 1997).

a) α -Tocoferol (Vitamina E)

La vitamina E es un término nutricional que se refiere a un grupo de Tocoferoles y tocotrienoles con actividad antioxidante. Solo ocho moléculas naturales presentan actividad antioxidante: cuatro tocoferoles (α , β , γ , δ) y cuatro tocotrienoles (α , β , γ , δ) (Brigelius-Flohé y Traber, 1999). La molécula de la vitamina E está dividida en dos partes: un anillo aromático de cromanol, también llamado cabeza de cromano (hidrofílica) y una cadena de hidrocarburos (hidrofóbica), que sirve para anclarlo en la membrana lipídica. Los Tocoferoles tienen la cadena lateral isoprenoide saturada, y los tocotrienoles insaturada. El grupo -OH presentes en el anillo cromanol es el responsable de su propiedad antioxidante (Halliwell y Gutteridge, 1999).

La vitamina E es conocida como el principal antioxidante lipofílico que protege los ácidos grasos poliinsaturados de los tejidos contra la peroxidación, ya que cuenta con un potente removedor de radicales peroxilo y probablemente, el más importante inhibidor de la reacción en cadena de la liperoxidación en animales (Halliwell y Gutteridge, 1999).

El α -Tocoferol actúa como un agente reductor capaz de donar electrones a especies oxidadas como los radicales libres y los lipoperóxidos, neutralizando de esta manera el potencial oxidativo de estos (Chao *et al.*, 2002).

El grupo hidroxilo presente en el grupo fenólico del anillo cromanol rápidamente reacciona con el radical peroxilo ($\text{LOO}\bullet$), transfiriendo a este su átomo de hidrogeno convirtiéndolo en un hidroperóxido de lípido ($-\text{LOOH}$), quedándose, en la forma de radical tocoferoxil; un segundo radical peroxilo se une al radical antioxidante para formar otro hidroperóxido (LOOH) que es un producto no radical. Por cada molécula de vitamina E oxidada, dos radicales peroxilo son consumidos (Liebler, 1993).

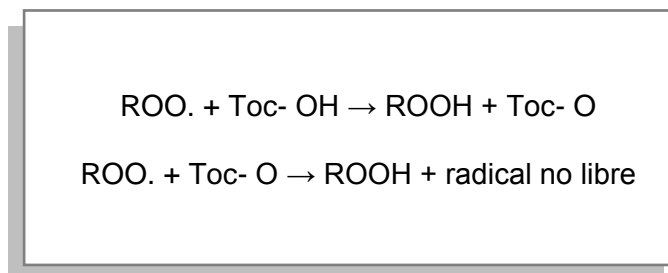


Figura 2. Reacciones *scavenging* de α -Tocoferol (Tomado de Benítez, 2006).

b) Trolox (Trolox C)

El 6-hidroxi-2, 5, 7, 8- tetrametil croman 2-acido carboxílico, es un análogo hidrosoluble del Tocoferol, el cual no tiene la cadena lateral hidrofóbica ya que esta fue sustituida por un grupo carboxilo. La estructura de anillo es idéntica a la estructura de anillo de α -Tocoferol. El mecanismo de acción de efecto antioxidante de Trolox es semejante al de la vitamina E, esto es, implica la acción del OH fenólico y la remoción de los radicales peroxilo (Albertini y Abuja, 1999).

El interés por los antioxidantes hidrosolubles se origina a partir de la observación de que la mayoría de los ROS es generada dentro de la fase acuosa. Sin embargo, los radicales peroxilo que no son eliminados por los antioxidantes hidrosolubles y que pasan a la fase lipídica de las células pueden desencadenar la peroxidación de los lípidos (Sagach *et al.*, 2002). Sin embargo, el Trolox tendría ventaja sobre los otros

antioxidantes que son apenas liposolubles, como la vitamina E. Esto debido a su estructura cromanol, que le da actividad antioxidante y el grupo carboxilo, que tiene un moderado efecto hidrosoluble; lo cual permite que sea adicionado directamente sin el uso de solventes o procedimientos previos y lo torna conveniente para los estudios en sistemas biológicos naturales.

2.6. ROS, antioxidantes y función espermática

2.6.1. Origen de ROS en el sistema reproductivo Masculino

En los espermatozoides, dos sistemas de generación de ROS están posiblemente involucrados: (i) el sistema fosfato nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) oxidasa a nivel de la membrana plasmática del espermatozoide y (ii) la oxidorreductasa (diferasa) dependiente de NADPH a nivel de las mitocondrias (Gavella *et al.*, 1992).

Kirchhoff (1998) indicó que los espermatozoides producen y exportan ROS al medio extracelular, de las cuales la mayoría son producidos por las mitocondrias y son el producto de la reducción monovalente del oxígeno molecular durante la fosforilación oxidativa. Los espermatozoides son ricos en mitocondrias porque ellos necesitan un constante suministro de energía para su movilidad. Desafortunadamente, cuando los espermatozoides contienen mitocondrias disfuncionales, ocurre una mayor producción de ROS, afectando la función mitocondrial (Evenson *et al.*, 1982). Tal relación puede ser debido a dos fenómenos mutuamente interconectados: ROS causa daño a la membrana mitocondrial y la membrana mitocondrial dañada provoca un incremento en la producción de ROS.

Los leucocitos y los espermatozoides inmaduros son las dos principales fuentes de ROS en el semen. Los leucocitos, en particular los neutrófilos y macrófagos han sido asociados con una excesiva producción de ROS y en última instancia causar disfunción espermática (Aitken *et al.*, 1995a; Saleh *et al.*, 2002).

En equinos, se ha podido comprobar que la incubación del semen con 5×10^6 neutrófilos/mL aumenta la generación de H_2O_2 y reduce la movilidad espermática *in vitro* (Baumber *et al.*, 2002). Los neutrófilos secretan ROS hacia el plasma seminal, lo que se suma a la cantidad de ROS producida intracelularmente por los espermatozoides como resultado de la actividad flagelar.

Durante la espermatogénesis, un defecto en el mecanismo de extrusión citoplasmática resulta en la liberación de espermatozoides del epitelio germinal llevando consigo el citoplasma residual excedente. Los espermatozoides resultantes se cree que son inmaduros y funcionalmente defectuosos. Estudios han sugerido que la retención del citoplasma residual por los espermatozoides está, de hecho, correlacionada positivamente con la generación de ROS por medio de mecanismos que pueden ser mediados por la enzima citosólica de glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (Aitken *et al.*, 1999).

Dos de los principales factores que contribuyen a la acumulación de ROS *in vitro* son la ausencia de un mecanismo de defensa endógeno y la exposición de gametos y embriones a varias técnicas de manipulación así como el ambiente que puede llevar a la generación de estrés oxidativo (Du Plessis *et al.*, 2008).

Los niveles de ROS pueden raramente fluctuar en un individuo fértil, pero, no afecta la concentración ni la movilidad del espermatozoide. Esto puede ser debido a la presencia de un adecuado sistema de defensa antioxidante en los individuos sanos. Las fluctuaciones en los niveles de ROS pueden ser debido a una infección transitoria y/o anomalías en la espermatogénesis tales como, la retención del citoplasma o la presencia periódica de espermatozoides morfológicamente anormales en el semen (Desai *et al.*, 2010).

2.6.2. Rol fisiológico de ROS en el sistema reproductivo Masculino

La producción de ROS es un proceso fisiológico normal pero un desequilibrio entre la generación de ROS y la actividad *scavenging* es perjudicial para el espermatozoide y está asociado con infertilidad masculina (Sharma *et al.*, 1996).

Hasta hace poco, ROS era considerado exclusivamente tóxico para los espermatozoides. Sin embargo, evidencias sustanciales sugieren que pequeñas cantidades de ROS generados por espermatozoides juegan un rol importante en los procesos fisiológicos normales tales como, capacitación espermática, reacción acrosómica, mantenimiento de la capacidad fecundante y estabilización de la capsula mitocondrial en la pieza media en bovinos (Goncalves *et al.*, 2010). Una controlada generación de ROS puede funcionar como moléculas de señalización (segundos mensajeros) en muchos tipos celulares diferentes; ellos son importantes mediadores de funciones espermáticas. Estudios han reportado que particularmente el anión superóxido (O_2^-) es requerido para la etapa tardía del desarrollo embrionario (Kodama *et al.*, 1996).

Aunque una significativa correlación negativa entre ROS y la tasa de fertilización *in vitro* ha sido encontrada (Agarwal *et al.*, 2005), aún, la generación controlada de ROS ha demostrado ser esencial para el desarrollo de la capacitación e hiperactivación; los dos procesos del espermatozoide que son necesarios para asegurar la fecundación. La capacitación es un proceso lento que ocurre en el tracto genital femenino, el cual implica un remodelado en la estructura y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide para poder fecundar el ovocito (Harrison *et al.*, 2005). Durante este proceso, los niveles de calcio intracelular, ROS, y tirosina quinasa se incrementan, lo cual conduce a un aumento en los niveles de adenosin monofosfato cíclico (AMPc).

Este incremento en el AMPc facilita la hiperactivación de los espermatozoides, una condición en la que son altamente móviles (Aitken, 1995b). Sin embargo, sólo espermatozoides capacitados presentan movilidad hiperactivada y son sometidos a una reacción acrosómica fisiológica, adquiriendo así la capacidad fecundante (De Lamirande *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la co-incubación de los espermatozoides con bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimula la capacitación espermática, la hiperactivación, la reacción del acrosoma, y la fusión al ovocito (Kodama *et al.*, 1996).

La peroxidación lipídica causada por bajos niveles de ROS lleva a la modificación de la membrana plasmática, lo que facilita la adhesión espermatozoide-ovocito (Kodama *et al.*, 1996). Las concentraciones fisiológicas de ROS *in vivo* están involucradas en proporcionar fluidez a la membrana, manteniendo la habilidad fecundante y reacción acrosómica del espermatozoide (Bucak *et al.*, 2010). El mantenimiento de un adecuado nivel de ROS es, por lo tanto, esencial para la adecuada funcionalidad espermática.

2.6.3. Efecto perjudicial de ROS en las funciones espermáticas

Un estado de estrés oxidativo induce en la célula efectos dañinos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos, lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, y apoptosis (Hicks *et al.*, 2006). El daño inducido por el EO depende no solo de la naturaleza y la cantidad de ROS implicados, sino también de la duración de la exposición a ROS y a factores extracelulares tales como temperatura, tensión de oxígeno, y la composición del medio circundante (Ej., iones, proteínas, y ROS *scavengers*) de acuerdo con Sikka *et al.*, 2001.

Las membranas espermáticas de los mamíferos son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y son sensibles al daño inducido por el oxígeno mediado por la

peroxidación lipídica, y, por lo tanto son sensibles al ataque de ROS lo cual resulta en una disminución de la movilidad de los espermatozoides, presumiblemente por la rápida pérdida de ATP intracelular que conduce a daños en el axonema, disminución de la viabilidad espermática, y un incremento de los defectos morfológicos de la pieza media del espermatozoide con efectos deletéreos sobre la capacitación espermática y reacción del acrosoma (Bansal *et al.*, 2007).

a) Peroxidación Lipídica (LPO)

Los lípidos son considerados las macromoléculas más susceptibles y están presentes en las membranas plasmáticas de los espermatozoides en forma de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), ácidos grasos que contienen más de dos enlaces dobles carbono-carbono ($H_2C=C_2H$), debido a ello son excelentes blancos para el ataque de ROS (Nordberg y Arner.,2001).

La peroxidación de lípidos es definida como “el deterioro oxidativo de los lípidos poliinsaturados”. La mayoría de los PUFA de las membranas contienen enlaces doble no conjugados que están separados por grupos metileno. La presencia de un doble enlace adyacente a un grupo metileno hace que la unión carbono-hidrógeno del metileno sea más débil, y como resultado, el hidrógeno es más susceptible a la substracción por algún tipo de ROS. Una vez que se ha producido esta substracción, el radical ácido graso generado se estabiliza mediante la reordenación de sus dobles enlaces. Los PUFA se reorganizan para formar un radical dieno conjugado que posteriormente puede ser oxidado (Aitken *et al.*1995b; Kodama *et al.*, 1996).

Las reacciones tienen lugar a través de tres principales pasos de iniciación, propagación y terminación. Durante la iniciación, los radicales libres reaccionan con las cadenas de ácidos grasos y como resultado liberan radicales lipídicos. Este radical ácido graso al reaccionar con el oxígeno molecular originará el radical peroxilolípido

(-ROO•). Los radicales peroxilo generados pueden reaccionar con otros ácidos grasos para producir nuevos radicales lipídicos, manteniendo así la propagación de la reacción (Griveau *et al.*, 1995).

El ataque de ROS a los PUFA de la membrana celular, conduce a una cascada de reacciones químicas llamada LPO. ROS tiende a provocar reacciones en cadena, es decir, un compuesto que tiene un electrón desapareado va a reaccionar con otro compuesto para generar en este un electrón no apareado, de tal manera que "un radical produce otro radical".

Los espermatozoides de mamíferos son conocidos por ser susceptibles a la pérdida de la movilidad, como consecuencia de LPO (Rao *et al.*, 1989). La susceptibilidad de los espermatozoides de rumiantes al estrés oxidativo es una consecuencia de la abundancia de PUFAs en la membrana plasmática de sus espermatozoides, cuya presencia da a las membranas la fluidez y flexibilidad necesarias para permitir la fusión de la membrana espermática durante la fecundación. Desafortunadamente, la presencia de dobles enlaces en estas moléculas los hace vulnerables al ataque de los radicales libres y el inicio de la LPO en cascada. La peroxidación de los PUFAs en las membranas de las células espermáticas es una reacción autocatalítica y autopropagante, que puede provocar la disfunción celular, asociada con la pérdida de las funciones e integridad de la membrana, la pérdida de la movilidad espermática y la inducción de apoptosis en los espermatozoides (Bucak *et al.*, 2010).

2.6.4. Efecto de la adición de antioxidantes sobre el estrés oxidativo en espermatozoides

Los antioxidantes han sido usados como suplementos para los criodiluyentes debido a que ejercen un efecto protector contra la acción de ROS. La acción conjunta de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos puede neutralizar las ROS dando como resultado un equilibrio celular. La adición de varios antioxidantes al medio diluyente ha sido investigado en la criopreservación de semen de toros (Beconi *et al.*, 1993), humanos (Askari *et al.*, 1994) y cerdos (Peña *et al.*, 2003).

La vitamina E es un efectivo antioxidante no-enzimático que puede detener la cadena de reacción de peroxidación mediante la eliminación de radicales peroxilo y otros radicales derivados de lípidos (Niki, 1987) y mantener la integridad del DNA en espermatozoides humanos (Hughes *et al.*, 1998). Varias formas de vitamina E han sido usadas en estudios de preservación de espermatozoides. Específicamente, la suplementación con vitamina E (α -Tocoferol) ha demostrado ser beneficioso para la crioconservación de espermatozoides bovino (Beorlegui *et al.*, 1997) y porcino (Breininger *et al.*, 2005) al reducir la generación de ROS y mejorar la calidad del semen post-descongelación.

Jeong *et al.* (2009) evaluó el efecto de la adición de α -Tocoferol a varias concentraciones en el medio Lactosa-yema en la criopreservación de semen de porcino. Las tasas de viabilidad, movilidad total espermática (MOT) e integridad acrosomal post-descongelamiento fueron significativamente más bajas en el grupo no suplementado comparado con los grupos que fueron congelados con α -Tocoferol; siendo los grupos suplementados con 100 y 200 μ M de α -Tocoferol los que dieron mejores resultados en sobrevida (52.3% y 54.9%) y MOT (44.1% y 45.4%) después de la descongelación del semen.

En la criopreservación de semen de toros, Hu *et al.* (2010) observó que la adición de 1.0 y 1.5 mg/mL de vitamina E al medio TRIS-yema, tuvo un aumento significativo en la movilidad espermática (53.21 y 53.86%). Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides descongelados con membrana y acrosoma intacto fue mayor cuando 1.5mg/ml de Vit E fue empleado. Además, una alta concentración de Vit E (2 mg/mL) disminuyó la actividad antioxidante del espermatozoide, reflejado en los bajos niveles de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y glutatión reducido (GSH) comparado con los otros grupos (<2mg/mL Vit E).

Del mismo modo, el Trolox (análogo de la vitamina E) ha sido usado en gran variedad de sistemas celulares para bloquear los efectos de las ROS (Michiels *et al.*, 1994). La adición de Trolox a los medios de preservación del semen mejora la supervivencia y la calidad de los espermatozoides refrigerados, congelados y descongelados (Askari *et al.*, 1994; Bilodeau *et al.*, 2002).

Peña *et al.* (2003) utilizaron Trolox como aditivo del diluyente Lactosa-yema (20% v/v). Se obtuvo que la adición de 100 y 200µM de Trolox mejoró la viabilidad del semen descongelado, en términos de movilidad progresiva e integridad de la membrana mitocondrial en espermatozoides de cerdo criopreservados.

En otro estudio, Maia *et al.*, 2010 evaluó el efecto de la adición del antioxidante Trolox (50µM) y catalasa (50mg/mL) al diluyente de criopreservación en la generación de peroxidación de lípidos de semen ovino post-descongelamiento. En los experimentos de LPO catalizada, la mínima producción de sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS) fueron observadas en los tratamientos Trolox (2.52 ± 0.02 nMol/10⁸ spz) y Trolox catalasa (2.54 ± 0.02 nMol/10⁸ spz), comparado con el control (3.81 ± 0.02 nMol/10⁸ spz) y catalasa (3.83 ± 0.02 nMol/10⁸ spz).

El uso de antioxidantes como suplemento del criodiluyente para espermatozoides de alpaca aún no ha sido desarrollado, no obstante es un área de estudio de gran interés que está siendo explorada.

2.7. Efecto de la criopreservación espermática sobre el estrés oxidativo

La criopreservación de los espermatozoides es una importante herramienta para preservar el material genético y para mantener la diversidad genética en especies silvestres y domésticas (Lermen *et al.*, 2009). Sin embargo, los protocolos de congelación espermática empleados en la mayoría de las especies de mamífero, a pesar de haber sido mejorados notablemente en los últimos años, ocasionan la muerte de un gran número de células después de la criopreservación.

El mejoramiento de las técnicas de criopreservación del semen requiere de un conocimiento profundo de la fisiología del gameto y los procesos bioquímicos que ocurren durante la colección, procesamiento, y congelamiento/descongelamiento de los espermatozoides. Cada uno de estos procedimientos implica producción de ROS en las muestras espermáticas. Durante la criopreservación, el semen es expuesto a un choque de frío y oxígeno atmosférico, los cuales incrementan la susceptibilidad a peroxidación de lípidos debido a una alta producción de ROS (Bucak *et al.*, 2008), siendo la membrana plasmática del espermatozoide una de las principales estructuras afectadas por la criopreservación (Agarwal *et al.*, 2004).

Por otra parte, se ha observado que la sensibilidad al choque frío es diferente en los espermatozoides de las distintas especies animales, ya que el rango de temperatura en el que se produce los cambios de fase de los lípidos varía entre ellas (Drobnis *et al.*, 1993). Además, incluso para una misma especie la membrana puede estar constituida por diferentes lípidos con múltiples cambios de fase a diferentes temperaturas (Holt y North, 1986).

La criopreservación ejerce efectos perjudiciales en los espermatozoides lo cual conduce a una significativa disminución en la viabilidad y movilidad espermática, y, en la disminución de la tasa de criopreservación espermática. El potencial de fertilidad de los espermatozoides criopreservados de mamíferos es más bajo que el de los espermatozoides frescos. La capacidad antioxidante del semen, puede ser insuficiente

para prevenir LPO durante los procesos de congelamiento y descongelamiento. Los sistemas de protección antioxidante en los espermatozoides son principalmente de origen citoplasmático y el espermatozoide descarta la mayor parte de su citoplasma en las etapas terminales de la diferenciación (Bucak *et al.*, 2010). Por lo tanto, espermatozoides de mamíferos carecen de un componente citoplasmático significativo, que contiene suficientes antioxidantes para contrarrestar los efectos perjudiciales de ROS y LPO. Por esta razón, los espermatozoides son susceptibles a la LPO durante la criopreservación y el proceso de descongelación (Bucak *et al.*, 2010). El daño debido al estrés oxidativo puede ser sobrellevado por la inclusión de antioxidantes en los diluyentes antes de realizar los procesos de congelación (Bucak *et al.*, 2008).

La criopreservación induce grandes cambios biofísicos y bioquímicos en la membrana del espermatozoide que finalmente disminuye el potencial de fertilidad de las células (Chatterjee *et al.*, 2001), reduciendo su tiempo de vida y su habilidad para interactuar con el gameto femenino. La excesiva producción de ROS durante la criopreservación han sido asociados con la reducción de la movilidad, viabilidad, integridad de la membrana, estado antioxidante, fertilidad y funciones espermáticas. Este hecho ha sido demostrado en espermatozoides humanos (Aitken, 1999), de caballo (Baumber *et al.*, 2003a), de toro (Bilodeau *et al.*, 2002) y de ovinos (Maia *et al.*, 2010).

III. HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis de trabajo

H₁: El suplemento del diluyente TES-Tris-yema con α -Tocoferol mejora la calidad post-descongelamiento de espermatozoides de alpaca.

3.2. Hipótesis alternativa

H₀: El suplemento del diluyente TES-Tris-yema con α -Tocoferol no mejora la calidad post-descongelamiento de espermatozoides de alpaca.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general:

- Evaluar el efecto del antioxidante α -Tocoferol (Vitamina E) en el proceso de congelamiento/descongelamiento en espermatozoides de alpaca.

4.2. Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la concentración del suplemento α -Tocoferol en el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca.
- Evaluar el efecto post-descongelamiento de la adición de α -Tocoferol en los parámetros espermáticos: vitalidad, movilidad e integridad de las membranas plasmática y acrosomal.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño experimental

Para alcanzar los objetivos propuestos en el estudio la suspensión inicial de espermatozoides de cada individuo fue dividida en 4 fracciones para la formulación de los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1: Suspensión espermática + diluyente TES-Tris-yema suplementado con 200 µg/mL α-Tocoferol (**E1**).

Tratamiento 2: Suspensión espermática + diluyente TES-Tris-yema suplementado con 500 µg/mL α-Tocoferol (**E2**).

Tratamiento 3: Suspensión espermática + diluyente TES-Tris-yema suplementado con 1000 µg/mL α-Tocoferol (**E3**).

Control: Suspensión espermática + diluyente TES-Tris-yema, sin suplemento.

5.2. Materiales

5.2.1. Material Biológico

Las muestras epididimarias fueron obtenidas a partir de la recolección de testículos de 16 alpacas adultas *postmortem*, cuyas edades estimadas fueron de 4 a 6 años. El muestreo se realizó en el Camal Municipal de Huancavelica, en la provincia de Huancavelica – Perú. Las muestras colectadas fueron almacenadas en solución salina y transportada a 4°C hasta el laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica, para su procesamiento inicial. La evaluación post-descongelamiento se realizó en el laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal de la UNMSM.

5.2.2. Reactivos, medios y soluciones

5.2.2.1. Diluyente de congelación

Al diluyente base constituido por TES-Tris-yema se le adicionó el antioxidante α -Tocoferol acetato (SIGMA Cód.T3001), a distintas concentraciones.

Tabla 5.1. Composición de los Diluyentes de Congelación

Diluyentes				
	E1	E2	E3	Control
TES (g)	3.03	3.03	3.03	3.03
Tris base (g)	0.72	0.72	0.72	0.72
Citrato de sodio (g)	0.44	0.44	0.44	0.44
DMA (M)	0.375	0.375	0.375	0.375
α -Tocoferol acetato ($\mu\text{g/mL}$)	200	500	1000	—
Penicilina (g)	0.6	0.6	0.6	0.6
Estreptomicina (g)	1	1	1	1
Yema de huevo (mL)	17.5	17.5	17.5	17.5

Las cantidades de los distintos constituyentes fueron calculadas para un volumen final de diluyente de 100mL.

5.2.2.2. DPBS

El buffer fosfato salino Dulbecco's fue empleado como medio de lavado de la muestra. DPBS libre de cloruro de calcio, (GIBCO Cat.No. 21300-017).

5.2.2.3. Medio de descongelación

HAM-F10 (SIGMA Cód.6635), básicamente es un medio nutritivo que fue utilizado como medio de incubación de las muestras tras la descongelación.

Contiene 9.8g HAM-F10, 0.245g lactato de calcio, 2.1g bicarbonato de sodio, 0.075g penicilina y 0.075g estreptomycin en 1 litro de agua estéril. Luego fue esterilizado por filtración con una membrana de porosidad de 0.22µm.

5.2.2.4. Solución hipo-osmótica para evaluación de endósmosis

Esta solución se conserva en refrigeración a 4°C hasta su uso, dentro de 24h.

Contiene 0.1470g citrato de sodio y 0.2702g fructosa disueltos en 20ml de agua estéril.

5.2.2.5. Solución de Eosina-Y 0.5%

La tinción con Eosina-Y permite determinar el número de espermatozoides vivos y muertos en la muestra. 50mg de Eosina-Y en 10mL de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9%.

5.2.2.6. PBS

La solución salina fosfatada (PBS) es utilizada para la preparación de la solución Azul de Tripan. 124 mmol/L NaCl, 10 mmol/LNa₂HPO₄ y 3 mmol/L KH₂PO₄ (pH 7.4).

5.2.2.7. Soluciones para la Doble Tinción

Solución Giemsa 10%

La doble tinción con Azul de Tripan y Giemsa fue utilizada para la evaluación de la vitalidad y el estado acrosomal. Giemsa 10% (peso/volumen) diluido en agua bidestilada.

Solución Azul Tripan 2%

Empleada como indicador de vitalidad en la doble tinción con Giemsa.

Azul de Tripan 2% (peso/volumen) (SIGMA Cód.302643) en PBS.

5.3. Metodología

5.3.1. Recolección de espermatozoides del epidídimo

La muestra espermática utilizada en este trabajo fue obtenida a partir de la región caudal del epidídimo, en base a lo descrito por Morton *et al.* (2007).

Ambos epidídimos fueron aislados de los testículos por disección, retirando todo el tejido adiposo y sanguíneo que sea posible. Una vez limpios fueron colocados en una placa de cultivo con 1mL de PBS 1X a 37°C, se hicieron 2 o 3 cortes en la cola del epidídimo haciendo una suave presión con una pinza, para provocar la salida de los espermatozoides desde los conductos epididimarios, la placa fue incubada a 37°C por 10 minutos para facilitar dicho proceso. Luego, se eliminaron los restos de tejido y se recuperó toda la suspensión espermática en un eppendorf, a partir de la cual se tomó una alícuota de 100 μ L para evaluar los parámetros espermáticos iniciales.

5.3.2. Evaluación de la muestra

5.3.2.1. Concentración

La concentración de cada muestra fue determinada, para todos los experimentos, utilizando el citómetro Cell-VU®, el cual implica el uso de una lámina con dos cámaras (para 2 evaluaciones) cada una con una profundidad de 20 μ m y 2 laminillas que tienen grabadas grillas de conteo en el lado reverso.

La suspensión espermática inicial fue homogenizada previo al recuento, de la cual se tomaron aproximadamente 4 μ L de volumen que fueron cargados en ambas cámaras de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para asegurar un conteo consistente, se contaron todos los espermatozoides dentro de la grilla (100 cuadros), para luego multiplicar este número por 50,000 obteniéndose la concentración total de espermatozoides/mL.

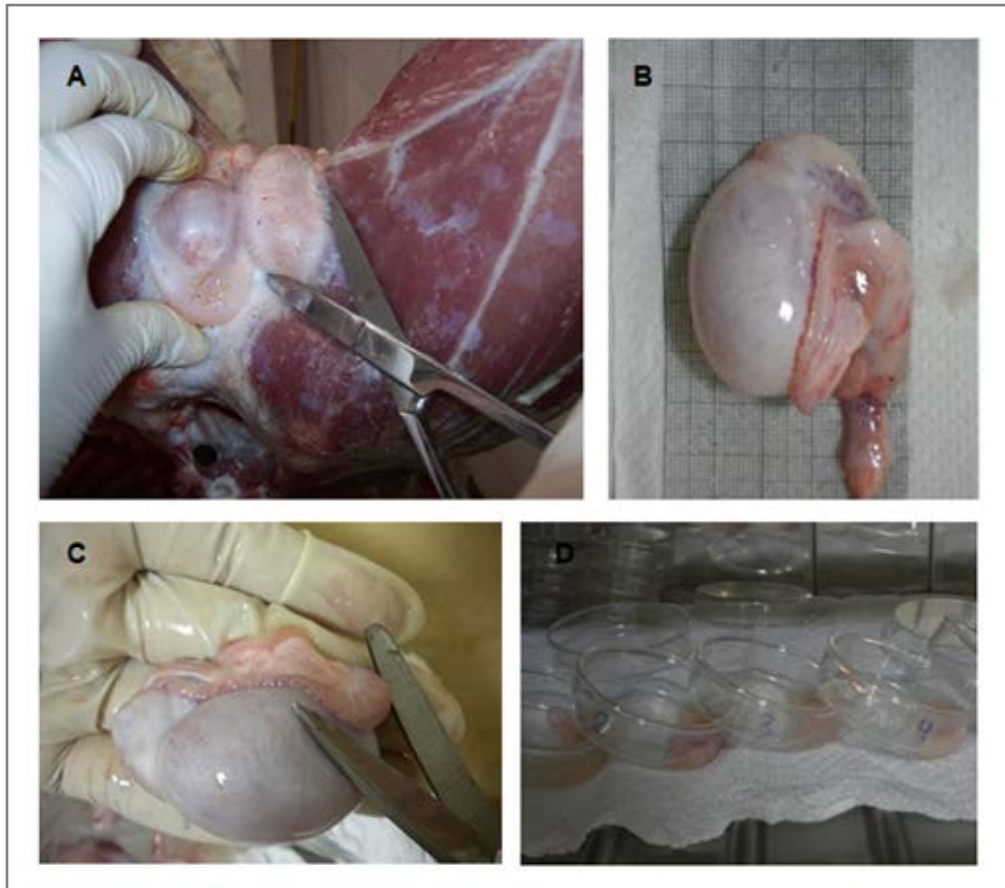


Figura 3. Obtención del material biológico. (A) Colecta de testículos de alpaca *postmortem*. (B) Medición del testículo. (C) Disección de la cola del epidídimo. (D) Incubación de la muestra espermática epididimaria.

5.3.2.2. Movilidad

Se evaluaron en dos diferentes etapas: inicial y post-descongelamiento, luego de 10 minutos de incubación. Para esto se tomaron 10 μ L de muestra y se colocó en una lámina pre-calentada a 37°C, que luego fue cubierta con una laminilla temperada. Se evaluaron 200 espermatozoides en total de por lo menos cinco campos (400x) en cada replica, a fin de lograr un error de muestreo aceptablemente bajo.

El sistema empleado para la clasificación de la movilidad es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud (WHO 2010), la cual distingue a los espermatozoides con movilidad progresiva o no progresiva de los que son inmóviles de la siguiente manera:

- Movilidad progresiva (MP): espermatozoides moviéndose activamente, sea de manera lineal o en círculos grandes, independientemente de la velocidad.
- Movilidad no progresiva (NP): todos los otros patrones de movilidad con ausencia de progresión, por ejemplo: nadando en pequeños círculos, la fuerza flagelar con apenas desplazamiento de la cabeza o cuando solo un latido flagelar puede ser observado.
- Inmovilidad (IM): sin movimiento.

Los resultados fueron expresados en porcentajes, considerando la movilidad total (MOT) de la muestra. La MOT abarca MP y NP.

5.3.2.3. Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática, valoración del porcentaje de células vivas y muertas e integridad del acrosoma.

Integridad funcional de la membrana plasmática

Esta prueba se realizó incubando 10 μL de muestra espermática en 500 μL de solución hiposmótica (ver ítem 5.2.2.4), previamente temperada a 37°C, en baño de agua a la misma temperatura durante 40 minutos. Luego de la incubación, se analizó una alícuota de 10 μL en microscopio de campo claro (400x), contando un total de 200 espermatozoides. Fueron considerados positivos al test de endósmosis los espermatozoides que presentaron las colas hinchadas o enrolladas (Jeyendran *et al.*, 1984) lo cual indicó que la membrana plasmática se encontraba funcionalmente activa.

Vitalidad

Se tomó una alícuota de 5 μL de muestra espermática y se mezcló con 5 μL de la solución de eosina en una lámina, luego se cubrió con una laminilla y se dejó reposar por 30 segundos. Se evaluaron 200 espermatozoides a 400x de magnificación, donde se contó el número de células teñidas (muertas) y las no teñidas (vivas) con ayuda de un contómetro manual. Los espermatozoides vivos presentaban la cabeza blanca o de color rosa claro y los que estaban muertos tenían la cabeza roja o rosa oscuro. Los resultados fueron reportados como el promedio de los porcentajes de espermatozoides vivos de cada replica.

Integridad acrosomal

La integridad del acrosoma fue probada con una doble tinción de Azul de Tripán y Giemsa de acuerdo con Didion *et al.* (1989) y modificada por Santiani *et al.* (2005) para espermatozoides de alpaca. Una muestra de 40 μ L fue incubada con la solución azul de tripan al 2% a 37°C por 30 minutos y luego fue centrifugada dos veces a 700g (1800rpm) por 5 minutos. El pellet obtenido se resuspendió con PBS y se hizo un frotis en una lámina, luego fue fijada con metanol por 5 minutos, una vez seca fue teñida por 20 – 24 horas con Giemsa (20%) preparada inmediatamente antes de usar. Finalmente las láminas se enjuagaron con agua de grifo. En las láminas se evaluaron 200 células en un microscopio de campo claro (400x) y los espermatozoides fueron clasificados así:

- Vivo con acrosoma intacto (VAI): transparente en la parte posterior a la línea ecuatorial de la cabeza y al mismo tiempo el acrosoma esté teñido de color azul.
- Vivo sin acrosoma (VSA): región pos ecuatorial transparente y región acrosomal transparente.
- Muerto con acrosoma intacto (MAI): región pos ecuatorial y región acrosomal azul oscuro.
- Muerto sin acrosoma (MSA): región pos ecuatorial azul oscuro y región acrosomal transparente.

Los resultados fueron expresados en porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro (VAI).

5.3.3. Procesado y Criopreservación de la muestra

5.3.3.1. Preparación de los diluyentes

El diluyente de congelación base TES-Tris-yema fue usado como control, mientras que este diluyente, suplementado con las distintas concentraciones del antioxidante, fue usado como tratamiento (E1, E2 y E3). Ver tabla 5.1.

Los tratamientos fueron preparados como sigue: se adicionó α -Tocoferol a la solución de TES, TRIS y Citrato de sodio, la emulsión formada fue homogenizada por vortex durante 5 minutos para obtener una solución stock 0.2 M, que fue almacenada a 4°C protegida de la luz. Se añadieron cantidades necesarias del stock al diluyente de congelación, de modo que las concentraciones finales fueron 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de α -Tocoferol, la yema de huevo fue adicionada al final.

5.3.3.2. Congelación

Tras la obtención y valoración espermática inicial se procedió a dividir cada muestra en 4 alícuotas (aproximadamente 200 μL cada una) que fueron diluidas 1:1 (v/v) con los diluyentes de congelación (suplementados y base) a temperatura ambiente, presentando una concentración espermática de aproximadamente 80×10^6 células/mL. Las suspensiones espermáticas fueron enfriadas gradualmente en la heladera durante 1 hora hasta alcanzar una temperatura de 4°C, seguidamente fueron equilibradas por un periodo de 20 minutos. Las muestras resuspendidas y enfriadas fueron cargadas en pajuelas de 0.25 mL (MINITUB, Alemania) e inmediatamente selladas con cera (MARIENFELD, Alemania). Las pajuelas fueron codificadas de acuerdo a las diferentes concentraciones de Tocoferol usadas, luego fueron transferidas dentro de la cámara del congelador programable (CRYOBATH) y se siguió el protocolo de congelamiento lento descrito por Canorio *et al.* (2008).

Las pajuelas congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fueron sumergidas inmediatamente dentro del tanque de nitrógeno líquido (N_2L) y almacenadas a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo mínimo de 30 días antes de su evaluación post-descongelamiento.

5.3.3.3. Descongelación

Las pajuelas fueron descongeladas por inmersión parcial en un baño térmico a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos. Luego, se recuperó todo el contenido en medio de descongelamiento recién preparado (ver ítem 5.2.2.3) haciendo una dilución 1:1 (v/v) obteniendo un volumen final de $500\mu\text{L}$ que permita lavar la muestra eliminando el crioprotector. El pellet obtenido se resuspendió en medio HAM a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la evaluación de los parámetros espermáticos.

5.3.4. Análisis estadístico

Las diferencias entre los tratamientos fueron analizadas mediante ANOVA de un factor luego de realizar la transformación de los datos con el arc-seno. Los resultados fueron expresados como media \pm desviación estándar (SD). La comparación de las medias entre los tratamientos se realizó con el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$. Los análisis fueron realizados usando el paquete estadístico SPSS (versión 20.00 para Windows).

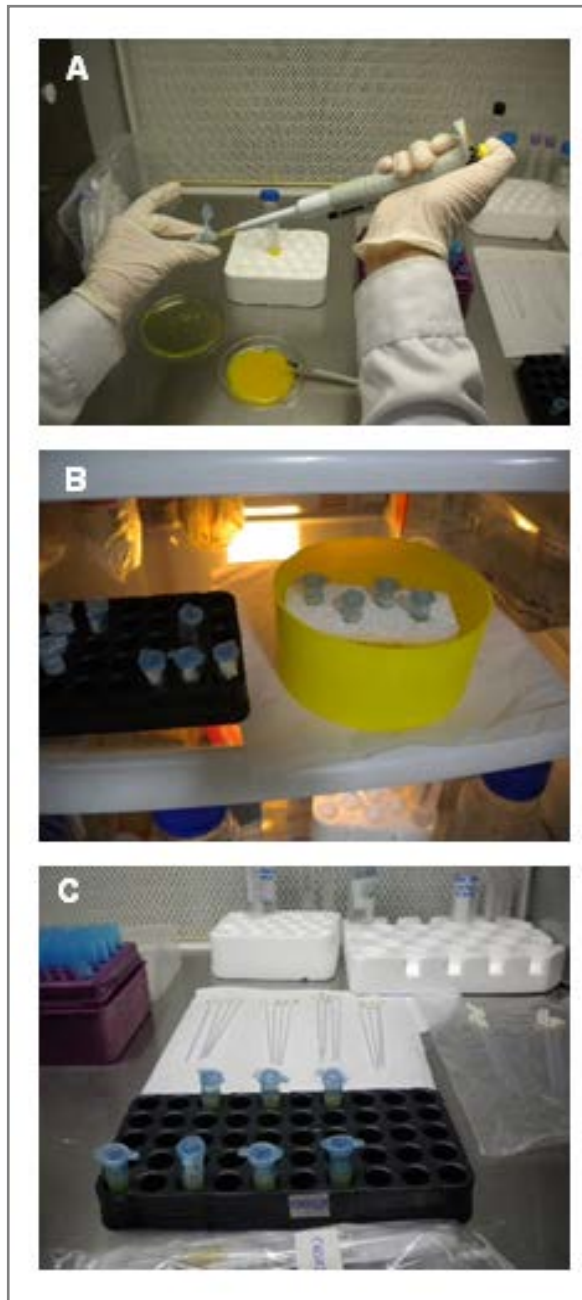


Figura 4. Procesado de la muestra espermática. (A) Suplementación del diluyente TES-Tris-yema con 200, 500 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ α -Tocoferol (B) *Cooling* de las muestras suplementadas E1, E2, E3 y grupo control. (C) Empaquetamiento de las muestras en pajuelas de congelación.

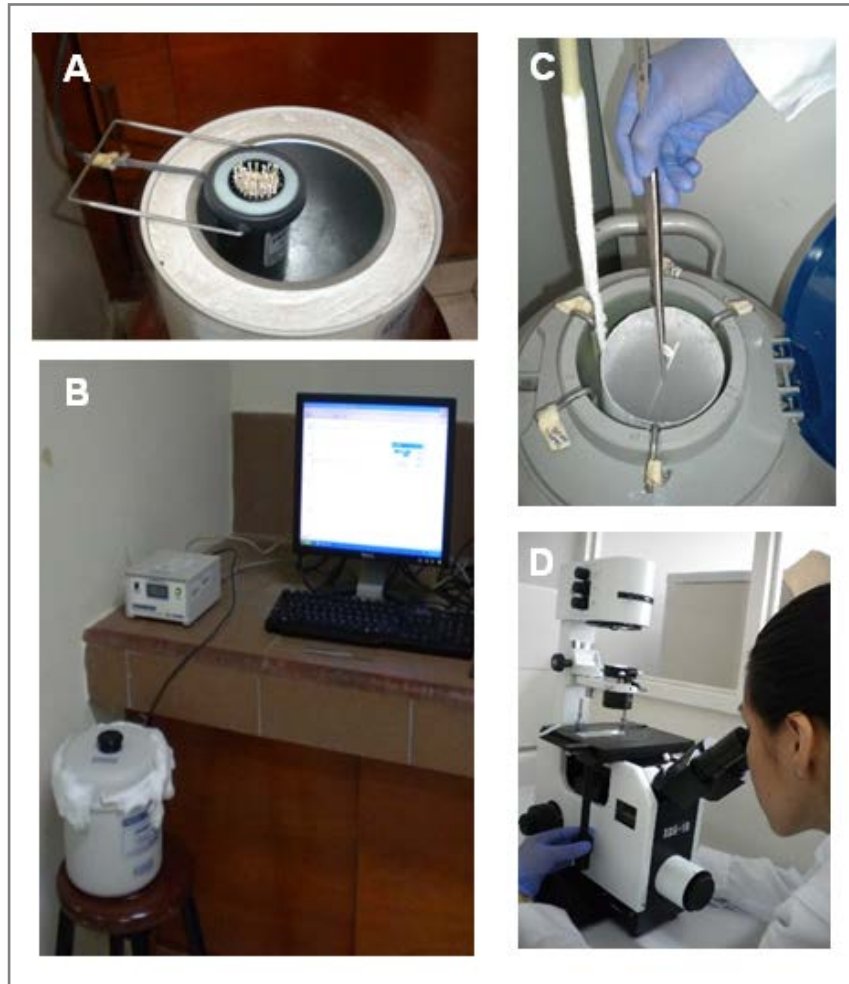


Figura 5. Criopreservación de las muestras. (A) Colocación de las pajuelas dentro de la cámara de congelamiento. (B) Congelamiento programable con el CRYOBATH. (C) Descongelación de las pajuelas almacenadas a -196°C . (D) Evaluación de las muestras post-descongelamiento.

VI. RESULTADOS

6.1. Efecto del suplemento α -Tocoferol en la movilidad espermática

El efecto de la adición de tres concentraciones de α -Tocoferol en el diluyente de congelación TES-Tris-yema durante la criopreservación en la movilidad espermática post-descongelamiento se muestra en la Fig.6. La movilidad inicial ($66.70 \pm 6.03\%$) de la muestra fresca fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que la de los grupos congelados/descongelados. La suplementación con el antioxidante incrementó ($P < 0.05$) los valores de movilidad post-descongelamiento en todos los grupos tratamiento comparados con el grupo control ($22.91 \pm 2.25\%$). Entre los grupos suplementados con α -Tocoferol, la MOT fue significativamente ($P < 0.05$) mayor en el grupo E1 ($32.47 \pm 3.38\%$) comparado con los grupos E2 y E3 ($27.15 \pm 3.17\%$ y $25.97 \pm 2.59\%$ respectivamente). No se observaron diferencias entre los grupos E2 y E3.

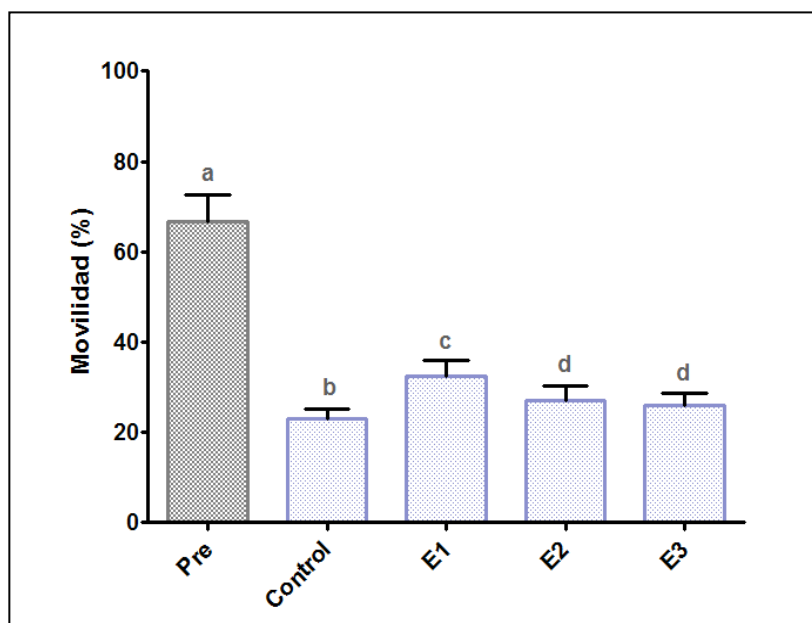


Figura 6. Efecto del suplemento α -Tocoferol en la movilidad espermática. Diferentes superíndices (a - d) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. *Pre* muestra fresca, *Control* sin adición de α -Tocoferol, *E1*, *E2* y *E3* suplementado con 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de α -Tocoferol respectivamente.

6.2. Efecto del suplemento α -Tocoferol en la integridad funcional de la membrana

La respuesta positiva al test de HOS fue significativamente ($P < 0.05$) mayor en la muestra espermática fresca ($74.81 \pm 5.44\%$) comparada con los grupos criopreservados. El porcentaje de células con membrana plasmática intacta fue significativamente ($P < 0.05$) mayor en el grupo E1 ($44.50 \pm 5.90\%$) comparado con el grupo control ($36.88 \pm 5.10\%$).

Como muestra la Fig.7, la respuesta HOS+ no fue afectada por la presencia de α -Tocoferol, ya que el porcentaje promedio de espermatozoides con membranas intactas después del test de HOS no varió significativamente ($P > 0.05$) entre los grupos suplementados E1, E2 y E3 ($44.50 \pm 5.90\%$, $38.94 \pm 7.32\%$, $39.61 \pm 5.40\%$ respectivamente).

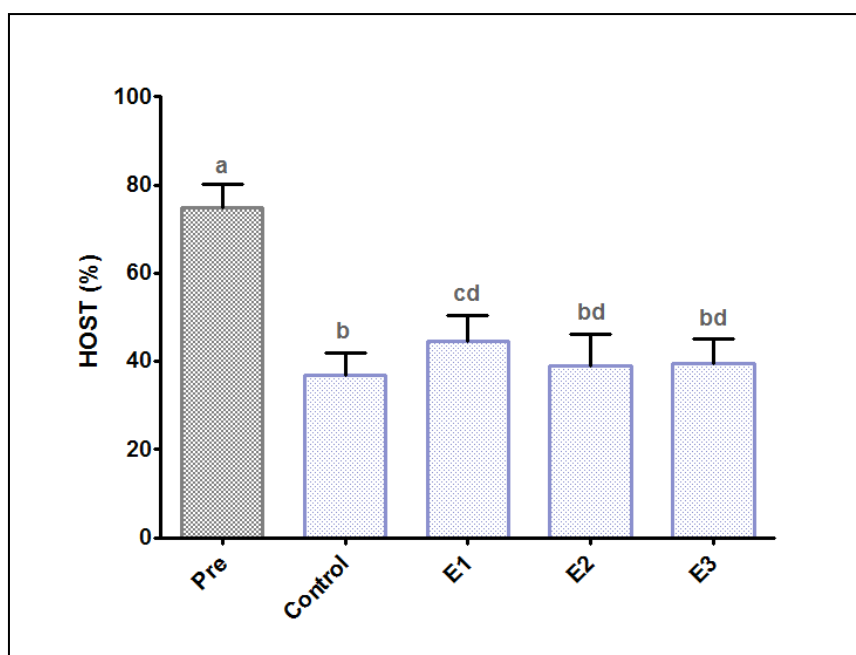


Figura 7. Efecto del suplemento α -Tocoferol en la integridad funcional de la membrana. Diferentes superíndices (a - d) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. *Pre* muestra fresca, *Control* sin adición de α -Tocoferol, *E1*, *E2* y *E3* suplementado con 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de α -Tocoferol respectivamente.

6.3. Efecto del suplemento α -Tocoferol en la vitalidad

El porcentaje de sobrevivencia de la muestra espermática fresca ($69.33 \pm 4.75\%$) fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que el de los grupos congelados/descongelados. Después de la criopreservación, el grupo control tuvo un marcado declive ($27.32 \pm 3.27\%$) en el porcentaje de espermatozoides vivos siendo significativamente ($P < 0.05$) menor que en el grupo E1. Entre los grupos suplementados, el porcentaje de vitalidad fue significativamente ($P < 0.05$) mayor en el grupo E1 ($36.41 \pm 4.51\%$) comparado con los grupos E2 y E3 ($30.35 \pm 4.94\%$, $30.37 \pm 4.36\%$). No se observaron diferencias de vitalidad entre los grupos E2 y E3.

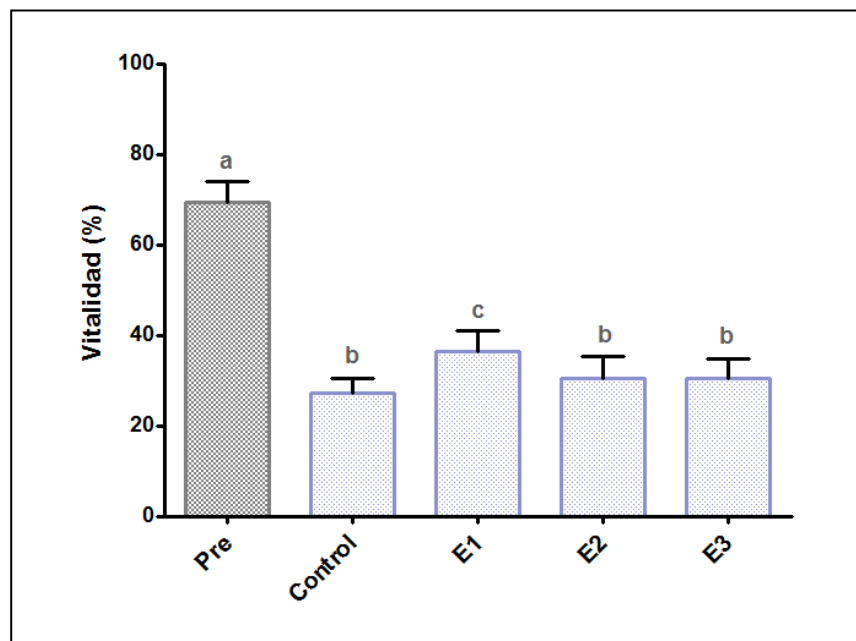


Figura 8. Efecto del suplemento α -Tocoferol en la vitalidad espermática. Diferentes superíndices (a - b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. *Pre* muestra fresca, *Control* sin adición de α -Tocoferol, *E1*, *E2* y *E3* suplementado con 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de α -Tocoferol respectivamente.

6.4. Efecto del suplemento α -Tocoferol en la integridad acrosomal

El estado acrosomal de los espermatozoides detectado por la doble tinción de Tripan/Giemsa se presenta en la Fig. 9. La mayoría de los espermatozoides de la muestra fresca ($70.40 \pm 4.04\%$) resultaron viables con el acrosoma intacto (VAI), siendo significativamente ($P < 0.05$) mayor que en los grupos congelados/descongelados.

Como muestra la Fig.9, el porcentaje de espermatozoides VAI fue significativamente ($P < 0.05$) mayor en el grupo E1 ($28.73 \pm 5.99\%$) comparado con el grupo control ($21.67 \pm 5.88\%$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos E2 ($22.08 \pm 7.38\%$) y E3 ($23.39 \pm 7.74\%$) comparado con el grupo control respectivamente.

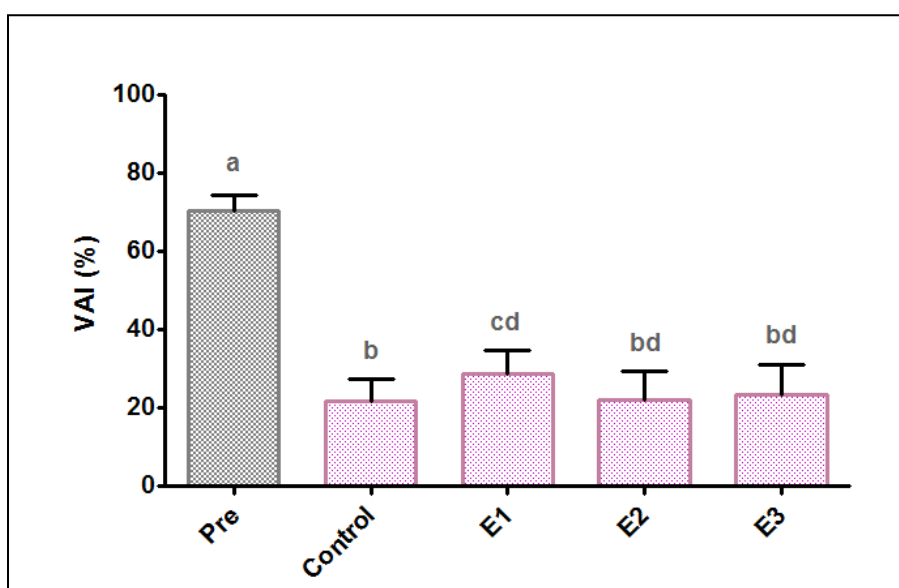


Figura 9. Efecto del suplemento α -Tocoferol en la integridad acrosomal. **VAI** (espermatozoides vivos con acrosoma intacto). Diferentes superíndices (a - d) indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. *Pre* muestra fresca, *Control* sin adición de Tocoferol, *E1*, *E2* y *E3* suplementado con 200, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de α -Tocoferol respectivamente.

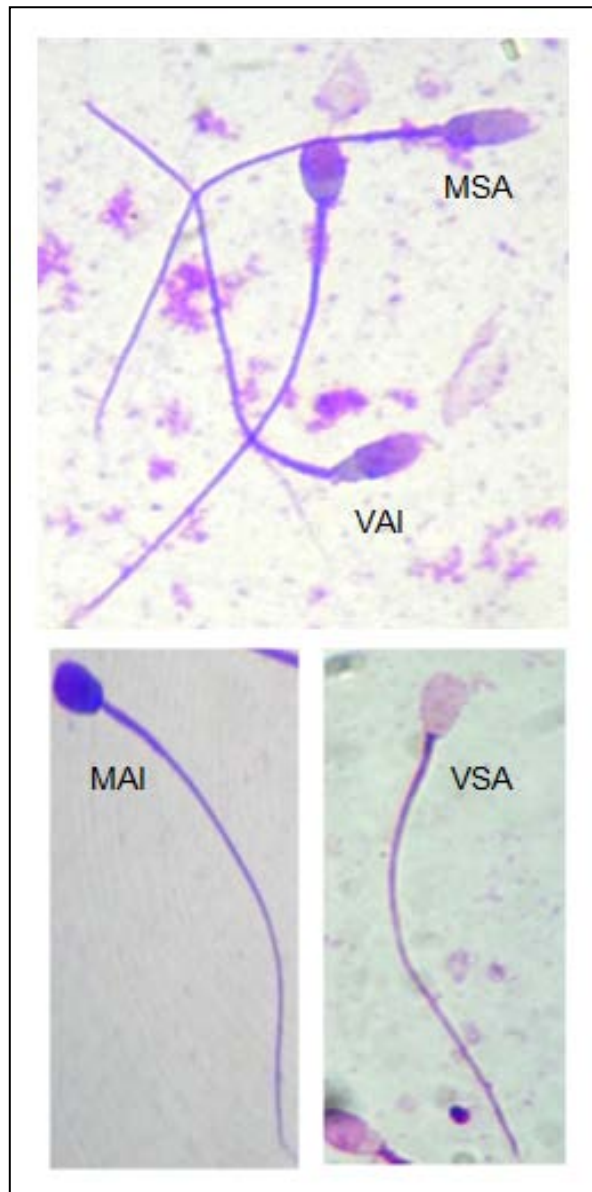


Figura 10. Estado acrosomal de espermatozoides de alpaca visualizado con el método de la Doble Tinción de Azul de Tripán / Giemsa. Cuatro categorías fueron distinguidas: **VAI** (espermatozoide vivo con acrosoma intacto), **VSA** (espermatozoide vivo sin acrosoma), **MAI** (espermatozoide muerto con acrosoma intacto), **MSA** (espermatozoide muerto sin acrosoma). *Fotografías tomadas por microscopía óptica, 400X.*

VII. DISCUSION

Diversos estudios han comprobado el hecho de que el proceso de criopreservación induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales pueden iniciar la reacción de peroxidación lipídica, considerada la principal causa de pérdida de la fluidez y/o alteraciones estructurales de la membrana espermática, afectando la movilidad y la viabilidad celular (Watson, 2000; Chatterjee *et al.*, 2001). La acumulación de los productos de ROS, la pérdida de importante contenido antioxidante presente en el citoplasma y la disminuida actividad enzimática antioxidante que ocurre durante el proceso de congelación/descongelación del espermatozoide comprometen la calidad de este (Álvarez *et al.*, 1992).

En el presente estudio se investigó el efecto de la adición del antioxidante α -Tocoferol al diluyente TES-Tris-yema durante la criopreservación en la calidad espermática post-descongelamiento. Los parámetros evaluados fueron movilidad, vitalidad, integridad de la membrana plasmática y acrosomal.

La movilidad es un parámetro fuertemente predictivo de la capacidad fecundante de una muestra espermática dada; y a su vez, es seriamente afectada por la criopreservación que está asociada con el daño mitocondrial (Watson, 1995; Zamboni, 1982). En estudios previos, se ha descrito una considerable disminución de la movilidad post-descongelamiento en espermatozoides de alpaca que fueron criopreservados (Morton *et al.*, 2007; Gonzales, 1998; Valdivia *et al.*, 1999).

El proceso de peroxidación induce una rápida e irreversible pérdida de la movilidad, causado por las alteraciones estructurales, un profundo cambio en el metabolismo y un aumento en la tasa de liberación de componentes intracelulares (Jones y Mann, 1977).

Diversas investigaciones han demostrado que la adición de la Vitamina E (Tocoferol o Trolox) al diluyente de congelación incrementó la movilidad post-descongelamiento en espermatozoides de cerdo (Peña *et al.*, 2003), humanos (Askari *et al.*, 1994) y bovinos

(Beorlegui *et al.*, 1997). Sin embargo, otros estudios manifiestan que el uso de la Vitamina E en el diluyente de criopreservación, no causo ningún efecto significativo sobre la movilidad total después de la descongelación de semen equino (Baumber, 2005). Estos efectos contradictorios pueden estar relacionados con diferencias en susceptibilidad a peroxidación lipídica entre especies, contenido de antioxidantes y/o la composición del plasma seminal.

En este estudio, se observó que la adición α -Tocoferol al diluyente de congelación provocó aumentos significativos en la MOT en todos los grupos suplementados comparados con el control, lo cual nos indica que el antioxidante α -Tocoferol ejerció un efecto protector durante la criopreservación. Los resultados del presente estudio fueron consistentes con las observaciones previas donde la suplementación con 200 μ g/mL del diluyente de congelación neutralizó el daño oxidativo y mejoró la movilidad de espermatozoides de cerdo post-descongelados (Breininger *et al.*, 2005).

El alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas espermáticas de los mamíferos, los hace susceptibles al daño peroxidativo, especialmente luego de haber sido criopreservados. La vitamina E es un eficiente antioxidante y el más potente *scavenger* de radicales peroxil-lipídico (subproductos tóxicos de los procesos metabólicos), la cual inhibe la propagación de la reacción de peroxidación lipídica en la membrana celular (Agarwal *et al.*, 2004).

El efecto protector de la vitamina E ha sido previamente reportado en animales domésticos y humanos. Así, Beconi *et al.* (1991) confirmó que la adición de Tocoferol al diluyente usado para congelar semen bovino disminuyó el nivel de peroxidación. En otro estudio Verma y Kanwar (1999) reportaron que la suplementación del diluyente con α -Tocoferol mejoró la integridad de la membrana en espermatozoides humanos.

En este trabajo se probó el efecto del antioxidante α -Tocoferol en la integridad de la membrana del espermatozoide mediante dos test: vitalidad y HOS. Con el test de

vitalidad (tinción vivos-muertos) nosotros determinamos si la membrana se encontraba físicamente rota o dañada, lo cual es un signo de muerte celular, y mediante el test de HOS evaluamos si las membranas espermáticas se encontraban bioquímicamente activas, en concordancia con lo descrito por Zaneveld et al. (1990), lo cual es fundamental para que se desarrollen diversos eventos, tales como: la capacitación, reacción acrosomal y fusión del espermatozoide al ovocito durante la fecundación.

La criopreservación resultó en una notable disminución de espermatozoides viables comparada con las muestras frescas (pre-congelamiento). Sin embargo, se observó una tendencia a un efecto protector dependiente de la dosis de α -Tocoferol, siendo el grupo E1 (suplementado con la dosis más baja) el que mostró una tasa de supervivencia significativamente mayor que la de los otros grupos congelados/descongelados. Además, el grupo E1 mostró un incremento significativo en la respuesta HOS+ comparado con el grupo no suplementado, esto nos indica que la presencia de α -Tocoferol preservó la integridad funcional de las membranas.

Se ha demostrado que el uso de antioxidantes naturales como el α -Tocoferol ejercen un efecto protector en la membrana plasmática de los espermatozoides de bovino congelados, esto debido a que α -Tocoferol actúa contrarrestando las reacciones de LPO durante la criopreservación, preservando la actividad metabólica y viabilidad celular (Beconi *et al.*, 1993).

El Tocoferol puede romper las uniones covalentes que ROS ha formado entre las cadenas laterales del ácido graso en las membranas lipídicas, reduciendo el daño en las membranas causado por la excesiva producción de ROS durante la criopreservación.

Durante el congelamiento/descongelamiento de los espermatozoides, los productos ROS pueden inducir la capacitación prematura, la reacción del acrosoma o daño del

mismo (De Lamirande *et al.*, 1997). El acrosoma contiene enzimas hidrolíticas e hidrolasas y esterases las cuales son esenciales para la penetración de la zona pelúcida del ovocito las cuales son liberadas durante la reacción acrosómica (RA) cuando la membrana acrosomal externa se fusiona con la membrana plasmática (Rovan, 2001). Por lo tanto, el mantenimiento de la integridad acrosomal en un estado no-reaccionado es fundamental para la fecundación.

Se ha demostrado que la suplementación de vitamina E en el diluyente de congelación disminuyó los cambios *capacitation-like* en el acrosoma de espermatozoides de cerdo congelados/descongelados (Satorre *et al.*, 2007). En otro estudio, Hu *et al.* (2010) reportó que los porcentajes de acrosoma-intacto y membrana intacta en espermatozoides de bovino congelados/descongelados fueron significativamente mejorados por la suplementación del medio de congelación con 1.5 mg/mL de Vitamina E. Sin embargo, en la mayoría de trabajos los autores solo mencionan la presencia de acrosoma intacto en el espermatozoide sin especificar si estos están vivos o muertos.

Solo los espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI) son capaces de llevar a cabo la reacción acrosómica, penetrar en la zona pelúcida y fusionarse con el ovocito (Yanagimachi, 1988) por ello el porcentaje de espermatozoides VAI es considerando un importante indicador espermático de su habilidad para la fecundación.

En nuestro estudio se pudo observar estados acrosomales en los espermatozoides coloreados con Tripan/Giemsa antes y después de la criopreservación. En los espermatozoides frescos, la mayoría de las células presentaban el acrosoma intacto y eran viables (VAI). Luego de la descongelación la viabilidad e integridad acrosomal disminuyó dramáticamente en todas las muestras, sin embargo se observó que la adición de 200 µg/mL de α -Tocoferol al diluyente TES-Tris-yema tuvo un efecto benéfico al incrementar el porcentaje de espermatozoides VAI en comparación con el grupo no suplementado.

Las diferencias encontradas entre los parámetros de vitalidad, movilidad, respuesta a HOS y integridad acrosomal nos sugieren que el proceso de criopreservación puede afectar diferentes componentes intracelulares y/o de la membrana que son requeridos para la adecuada funcionalidad celular. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos podemos indicar que α -Tocoferol estaría actuando como un protector de la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides de alpaca contra la peroxidación.

No se encontraron reportes respecto al uso de antioxidantes no enzimáticos como α -Tocoferol durante la criopreservación de espermatozoides de alpaca, ni estudios que evalúen el efecto de la generación de ROS durante la congelación, por ello es que la mayoría de trabajos que han sido mencionados en nuestro estudio corresponden a investigaciones realizadas en otras especies, lo cual dificultó en cierta medida las comparaciones apropiadas de nuestros resultados, esto debido a un pobre conocimiento de esta área en alpacas. Sin embargo, nuestros resultados pueden contribuir al desarrollo de nuevos protocolos de criopreservación, donde la suplementación del medio de congelación con α - Tocoferol podría aplicarse a condiciones de rutina.

VIII. CONCLUSIONES

1. La suplementación del diluyente TES-Tris-yema con 200µg/mL de α-Tocoferol mejoró todos los parámetros de calidad espermática post-descongelamiento comparado con el control.
2. La incorporación de una baja concentración (200µg/mL) de α-Tocoferol evidenció mejores resultados que los grupos suplementados con concentraciones crecientes.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL A., GUPTA S., SHARMA R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005, vol. 3, article 28.

AGARWAL A., NALLELLA K. P., ALLAMANENI S. S. R., SAID T. M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004, vol. 8, n°. 6, p. 616–627.

AITKEN R.J. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon - a cell in crisis? *Journal of reproduction & fertility*. 1999, vol. 115, p.1-7.

AITKEN R. J., BAKER H. W. G. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans ? *Human Reproduction*. 1995a.vol. 10, n°. 7, p. 1736–1739.

AITKEN R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction fertility and development*. 1995b, vol.7, p.659-68.

AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. *Reproduction fertility and development*. 1994, vol. 6 9–23.

ALBERTINI R., ABUJA P.M. Prooxidant and antioxidant proprieties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. *Free Radical Research*. 1999, vol.30, n°.3, p. 181-188.

ALLER J.F., REBUFFI G.E., CANCINO A.K., ALBERIO R.H. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Archivos de Zootecnia*. 2003, vol.52, p.15–23.

ALVAREZ J.G., STOREY B.T., Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode for sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*, 1992, vol.13, p. 232–241.

AMANN R.P., PICKETT B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*. 1987, vol.7, p.145-176.

ASKARI H.A., CHECK J.H., PEYMER N., BOLLENDORF A. Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Archives of Andrology*. 1994, vol.33, p.11-15.

BAILEY J.L., BILODEAU J.F., CORMIER N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology*. 2000, vol. 21, p. 1-7.

BANDA J., EVANGELISTA S., RUIZ L., SANDOVAL R., RODRÍGUEZ C., VALDIVIA M., SANTIANI A. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias*. 2010, vol. 21 (2), p.145-153.

BANSAL A. K., BILASPURI G. S. Effect of ferrous ascorbate on *in vitro* capacitation and acrosome reaction in cattle bull spermatozoa. *Animal Science Report*. 2007, vol. 1, n°.2, p. 69–77.

BAUMBER J., BALL B.A., LINFOR J.J., MEYERS S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*. 2003, vol. 24, p. 621-628.

BAUMBER J., VO A., SABEUR K., BALL B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2002, vol. 57, p. 1025-1033.

BECONI M.T., FRANZIA C.R., MORA N.G., AFFRANCHINO M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*.1993, vol.40, p.841–51.

BECONI M.T., AFFRANCHINO M.A., SCHANG L.M., BEORLEGUI N.B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. *Biochemistry International*. 1991, vol.23, p.545–53.

BEORLEGUI N., CETICA P., TRINCHERO G., CORDOBA M., BECONI M. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. *Andrologia*. 1997, vol.29, p.37–42.

BENÍTEZ D.E. Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 2006, vol.25, p.0-0.

BILODEA J.F., BLANCHETTE S., GAGNON I.C., SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*. 2001, vol.56, p. 275–286.

BILODEAU J.F., BLANCHETTE S., CORMIER N., SIRARD M.A. 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*. 2002, vol. 57, p. 1105-1122.

BRAVO P.W., SKIDMORE J.A., ZHAO XX. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science*. 2000, vol. 62, p. 173-193.

BRAVO P.W., FLORESU., GARNICA J., ORDONEZ C. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*.1997, vol. 47, pp. 619-626.

BREININGER E., BEORLEGUI N.B., O'FLAHERTY C.M., BECONI M.T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*.2005, vol.63, p.2126-2135.

BRIGELIUS-FLOHÉ R., TRABER M.G. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*. 1999, vol.13, p. 1145-1155.

BROWN B.W. A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*. 2000, vol. 58, p.169-195.

BUCAK M. N., SARIÖZKAN S., TUNCER P. B. et al., The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircusancryrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Small Ruminant Research*. 2010, vol. 89, n°. 1, p. 24–30.

BUCAK M. N., ATESSAHIN A., YUCE A. Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Ruminant Research*. 2008, vol. 75, n°. 2-3, p. 128–134.

BUENDÍA P., SOLER C., PAOLICCHI F., GAGO G., URQUIETA B. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer-assisted system. *Theriogenology*. 2002, vol.57, p.1207 –1218.

CANORIO PARIONA, Nadia.“Criocapacitación de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*)”. Tesis Magister en Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas - UNMSM. 2008.

CHAO J.C., YUEN M.D., CHEN P.Y., CHIEN S.W. Vitamin C and E supplements improve the impaired antioxidant status and decrease plasma lipid peroxides in hemodialysis patients. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002, vol.13 (11), p.653-63.

CHATTERJEE S., DELAMIRANDEE., GAGNON C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Molecular Reproduction and Development*. 2001, vol. 60, n°. 4, p. 498–506.

CHEN H., CHOW P.H., CHENG S.K., CHEUNG A.L., CHENG L.Y. Male genital tract antioxidant enzymes: Their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. *Journal of Andrology*. 2003, vol.24, p.704-711.

DE LAMIRANDE E., LECLERC P., GAGNON C. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 1997a, vol. 3, p.175-94.

DE LAMIRANDE E., JIANG H., ZINI A., KODAMA H., GAGNON C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction*. 1997b, vol.2, p.48–54.

DE LAMIRANDE E., GAGNON C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction*. 1995, vol. 10, p.15–21.

DIDION, B.A.; DOBRINSKY, J.R.; GILES, J.R.; GRAVES, C.N. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*, New York. 1989, vol. 22, p. 51-57.

DESAI N. R., MAHFOUZ R., SHARMA R., GUPTA S., AGARWAL A. Reactive oxygen species levels are independent of sperm concentration, motility, and abstinence in a normal, healthy, proven fertile man: a longitudinal study. *Fertility and Sterility*. 2010, vol. 94, n°.4, p. 1541–1543.

DROBNIS E.Z., CLISHAM P.R., BRAZIL C.K., WISNER L.W., ZHONG C.Q., OVERSTREET J.W. Detection of altered acrosomal physiology of cryopreserved human spermatozoa after sperm residence in the female reproductive tract. *Journal of Reproduction & Fertility*. 1993, vol. 99, p.159-165.

DU PLESSIS S. S., MAKKER K., DESAI N. R., AGARWAL A. Impact of oxidative stress on IVF. *Expert Review of Obstetrics and Gynecology*. 2008, vol. 3, n°. 4, pp. 539–554.

ELWISHY, AB. Reproduction in the male Dromedary (*Camelus dromedarius*): a review, *Animal Reproduction Science*. 1988, vol. 17, pp. 217-241.

ERNSTER, L.; FORSMARK, P.; NORDENBRAND, K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes: relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *Biofactors*. 1992, vol.3, p.241–8.

EVENSON D.P., DARZYNKIEWICZ Z., MELAMED M.R. Simultaneous measurement by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1982, vol.30, p.279-80.

FARSTAD W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. *Animal Reproduction Science*. 1996, vol. 42, p. 251-260.

FERNÁNDEZ-BACA S. Situación actual de los Camélidos Sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina (TCP/RLA/2914).

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2005.

FERNÁNDEZ-BACA S. Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal Reproduction Science*. 1993, vol.33, 307-323.

FERREIRA A.L., MATSUBARA L.S. Radicales Libres: conceptos relacionados con las enfermedades, el sistema de defensa y el estrés oxidativo. *Revista de la Asociación Médica Brasileira*, 1997, vol.43, n°.1, p.1-16.

FISER P.S., AINSWORTH, L., LANGFORD G. A. Effect of osmolality of skim milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Cryobiology*. 1981. IE: 399-443.

GAO D.Y., LIU J., LIU C., Mc GANN L.E., WATSON P.F., KLEINHANS F.W., MAZUR P., CRITSER E.S., CRITSER J.K. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*. 1995, vol. 10, p.1109-1122.

GARNICA J., ACHATA R., BRAVO P.W. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*. 1993, vol. 32, pp. 85-90.

GAVELLA M., LIPOVAC V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Archives of Andrology*. 1992, vol. 28, n°. 2, p. 135–141.

GONCALVES F., BARRETTO L. S.S., ARRUDA R. P., PERRI S. H.V., MINGOTI G. Z. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo Development. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010, vol. 45, n°.1, p. 129–135.

GONZALES H. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia*.2008, vol10, p.223-234.

GRIVEAU J.F, DUMONT E., RENARD P., CALLEGARI J.P., LE LANNOU D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility*.1995, vol. 103, p.17-26.

GUERIN P., EL MOUATASSIM S., MENEZO Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*. 2001, vol. 7, n° 2, p. 175–189.

HAMMERSTEDT R.H., GRAHAM J.K., NOLAN J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 1990, vol.11, p.73-88.

HARRISON R.A., GADELLA B.M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*. 2005, vol.63, p. 342-351.

HICKS J.J., TORRES R.Y., SIERRA V. M. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2006, vol. 14, n° 4, p. 223-226.

HOLT W.V., NORTH R.D. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *Journal of Reproduction & Fertility*. 1986, vol.78, p. 447-457.

HU J.H., ZHAO X.L., TIAN W.Q., ZAN L.S., LI. Q.W. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation. *Animal*. 2011, vol.5, n° 1, p 107–112.

HUGHES C.M., LEWIS S.E., MCKELVEY-MARTIN V.J., THOMPSON W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Human Reproduction*. 1998, vol.13, p.1240-1247.

JANUSKAUSKAS A., GIL J., SÖDERQUIST L., HÅÅRD M.G., JOHANNISSON A., RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*. 1999, vol. 52, p. 641-658.

JEONG Y. J., KIMM. K.; SONG H. J., KANG E. J., et al. Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*. 2009, vol.58, p. 181–189.

JEYENDRAN, R.S., VAN DER VEN H.H., PEREZ-PELAEZ M., CRABO B.G., ZANEVELD L.J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationships to other semen characteristics. *Journal of Reproduction & Fertility*. 1984, vol. 70, p. 219-228.

JONES R., MANN T. Damage to spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *Journal of Reproduction & Fertility*. 1977, vol.50, p. 261–268.

KADWELLM., FERNANDEZM., STANLEYH. F., BALDIR., WHEELERJ. C. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2001, vol.268 (1485): 2575–2584.

KIRCHHOFF C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Reviews of Reproduction*. 1998, vol. 3, p.86 – 95.

KODAMA H., KURIBAYASHI Y., GAGNON C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *Journal of Andrology*. 1996, vol.17, n°. 2, p. 151–157.

LERMEN D., BLÖMEKE B., BROWNE R., CLARKE A., et al. Cryobanking of viable biomaterials: Implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular Ecology*. 2009, vol.18, p.1030-1033.

LIEBLER C.D. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Critical Reviews in Toxicology*. 1993, vol.23, n°.2, p.147-169.

MAIA M.D.S., et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Animal Reproduction Science*. 2010, doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.004.

MAXWELL W.M.C. Y EVANS O. Inseminación Artificial de ovejas y cabras. *El Acribia S.A.* 1990, vol.34, p.19-32. Madrid, España.

MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*. 1984, vol.247, n.3, pt.1, p. 125-142.

MICHIELS C., RAES M., TOUSSAINT O., REMACLE J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*. 1994, vol.17, p. 235-248.

MORTON K.M., VAUGHAN J.L., MAXWELL W.M. Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. *Rural Industries Research and Development Corporation*. 2008. Publication No. 08/057. Project No. US-138A.

MORTON K.M., BATHGATE R., EVANS G., MAXWELL W.M.C. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of Citrate, Tris and Lactose based diluents, and pellets and straws. *Reproduction Fertility & Development*. 2007, vol.19, p.792– 6.

MOUSSA M., MARTINET V., TRIMECHE A., TAINTURIER D., ATON M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2002, vol.57, p.1695-1706.

NIASARI-NASLAJI A., MOSAFERI S., BAHMANI N., GERAMI A., GHARAHDAAGHI A.A., ABARGHANI A., GHANBARI A. Semen cryopreservation in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) using SHOTOR diluent: Effects of cooling rates and glycerol concentrations. *Theriogenology*. 2007, vol.68, p.618 –25.

NIKI E. Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1991, vol.54, p.1119-1124.

NORDBERG J., ARNÉR E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001, vol.31, n°.11, p.1287-1312.

PEÑA F.J., JOHANNISSON A., WALLGREN M., RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*. 2003, vol.78, p.85–98.

RAO B., SOUFIR J. C., MARTIN M., DAVID G., Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Research*, vol. 24, n°.2, p. 127–134, 1989.

RODRÍGUEZ LLANO, Claudia. “Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*)”. Tesis Magister en Producción y Reproducción Animal. UNMSM. Facultad de Medicina Veterinaria. Lima, 2009.

ROVAN E. Biochemistry of spermatozoa, in: W. Busch, A. Holzmann (Eds.), *Veterinary Medicine Andrology, Physiology and Pathology of Reproduction in Male Animals*, Schattauer, Stuttgart, 2001.pp.23-54.

SAGACH, V.F.; SCROSATI, M.; FIELDING, J.; ROSSONI, G.; GALLI, C.; VISIOLI, F. The water-soluble vitamin E analogue Trolox protects against ischaemia/reperfusion damage *in vitro* and *ex vivo*: a comparison with vitamin E. *Pharmacological Research*. 2002, vol.45, n°.6, p.435-439.

SALEH R. A., AGARWAL A., KANDIRALI E.et al. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 2002, vol. 78, n°. 6, p. 1215–1224.

SÁNCHEZ M.A., SANTIAGO E.O., VARGAS L.A., MENDOZA N.V.M. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica*. 2004, vol. 29, n°3, p. 81-90.

SANOCKA D., KURPISZ M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004, vol. 2, p. 12–26.

SANTIANI A., HUANCA W., SAPANA R., HUANCA T., SEPULVEDA N., SANCHEZ R. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology*. 2005, vol.7, p.303–9.

SATORRE M.M., BREININGER E., BECONI M.T., BEORLEGUI N.B. a-Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*.2007, vol.68,p.958-65.

SHARMA R. K., AGARWAL A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 1996, vol. 48, n°.6, p. 835–850.

SIKKA S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry*. 2001, vol. 8, n°. 7, p. 851–862.

SMITH, BB. Overview of reproduction in the male llama and alpaca. *Proceedings of the Society for Theriogenology*. 1999. pp. 191-196.

SUMAR J.B. Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*.1996, vol.42, p.405-415.

VALDIVIA M., RUIZ M., BERMUDEZ L., QUINTEROS S., GONZÁLES A., et al. Criopreservación de semen de alpacas. Proc II Congreso sobre camélidos, Cusco – Perú.1999.abstract 81.

VERMA A., KANWAR K.C. Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian Journal of Andrology*. 1999, vol.1, p.151–154.

WATSON P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*.1995, vol.7, p. 871-891.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2000, vol.60, p.481-492.

WHO. Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010. 5th edition. Printed in Switzerland.

YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neil JD., editors. The physiology of reproduction. Raven Press; 1988.p.135-85.

ZAMBONI, L. The ultrastructure pathology of the spermatozoon as a cause of infertility-the role of the electron-microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertility and Sterility*. 1982, vol.48, p.711-734.

ZANEVELD L.J.D., JEYENDRAN R.S., KRAJESKI P. Hypoosmotic swelling test. In: Acosta AA, Swanson RJ, Ackerman SB, Kruger TF, Van Zyl JA, Menkveld R (eds), Human spermatozoa in Assisted Reproduction. Baltimore, Williams and Wilkins, 1990; 223-227.

X. ANEXOS

Anexo 1. Tabla de datos de tamaño testicular y concentración espermática de los individuos evaluados.

Individuo	Tamaño testicular Longitud (cm)		Concentración espermática (x 10 ⁶ /mL)
	Izquierdo	Derecho	
1	5.0	5.0	139.5
2	4.5	4.2	264
3	4.5	4.5	272.5
4	5.0	4.8	182
5	5.2	5.2	142
6	5.1	4.8	168
7	4.9	4.7	84
8	5.0	5.2	222
9	5.2	5.1	243
10	4.5	4.6	330
11	5.5	5.3	192
12	4.4	4.0	177
13	4.7	4.5	159
14	4.4	4.2	99.5
15	5.0	4.7	180.5
16	4.6	4.8	116

Anexo 2. Gráfica del congelamiento.

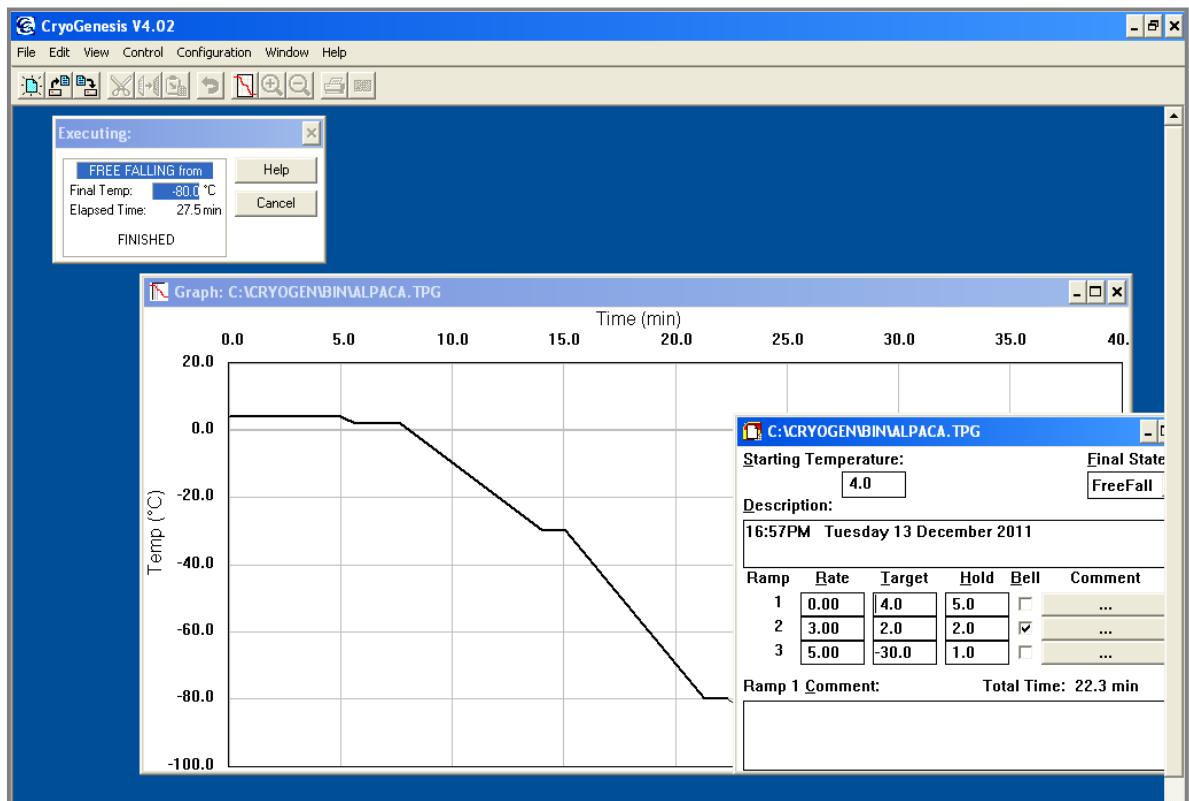


Imagen 1. Gráfica del congelamiento lento obtenida con el programa CryoGenesis V.4.02.

Anexo 3. Análisis estadístico de los parámetros espermáticos. Se utilizó el paquete estadístico SPSS (versión 20.00 para Windows).

Anexo 3.1. Análisis estadístico del parámetro de evaluación de la vitalidad espermática.

Pruebas de normalidad

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pre	,207	16	,066	,937	16	,309
tt1	,102	16	,200*	,967	16	,785
arcsenvit tt2	,189	16	,129	,924	16	,197
tt3	,190	16	,128	,958	16	,621
control	,102	16	,200*	,990	16	,999

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Prueba T

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 Pre - tt1	19,3580560	3,8251566	,9562892	17,3197740	21,3963381	20,243	15	,000
Par 2 Pre - tt2	23,0819236	4,3383165	1,0845791	20,7701979	25,3936492	21,282	15	,000
Par 3 Pre - tt3	23,0480308	3,7720650	,9430162	21,0380393	25,0580224	24,441	15	,000
Par 4 Pre - Cnt	24,9613732	2,9174661	,7293665	23,4067652	26,5159811	34,223	15	,000

ANOVA de un factor

ANOVA de un factor

Arcsenvit

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	264,298	3	88,099	12,131	,000
Intra-grupos	435,736	60	7,262		
Total	700,034	63			

Prueba post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: arcsenvit

Bonferroni

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
tt1	tt2	3,7238675 [*]	,9527762	,001	1,124168	6,323567
	tt3	3,6899748 [*]	,9527762	,002	1,090275	6,289674
	control	5,6033171 [*]	,9527762	,000	3,003618	8,203016
tt2	tt1	-3,7238675 [*]	,9527762	,001	-6,323567	-1,124168
	tt3	-,0338927	,9527762	1,000	-2,633592	2,565807
	control	1,8794496	,9527762	,319	-,720250	4,479149
tt3	tt1	-3,6899748 [*]	,9527762	,002	-6,289674	-1,090275
	tt2	,0338927	,9527762	1,000	-2,565807	2,633592
	control	1,9133423	,9527762	,295	-,686357	4,513042
control	tt1	-5,6033171 [*]	,9527762	,000	-8,203016	-3,003618
	tt2	-1,8794496	,9527762	,319	-4,479149	,720250
	tt3	-1,9133423	,9527762	,295	-4,513042	,686357

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Anexo 3.2. Análisis estadístico del parámetro de evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática (HOST).

Pruebas de normalidad

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pre	,140	16	,200 [*]	,934	16	,277
tt1	,134	16	,200 [*]	,943	16	,390
arcsen(host) tt2	,096	16	,200 [*]	,974	16	,892
tt3	,065	16	,200 [*]	,984	16	,987
Control	,157	16	,200 [*]	,971	16	,852

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Prueba T

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 Pre - tt1	18,1742150	5,1187463	1,2796866	15,4466276	20,9018024	14,202	15	,000
Par 2 Pre - tt2	21,4569455	5,5797053	1,3949263	18,4837305	24,4301606	15,382	15	,000
Par 3 Pre - tt3	21,0283997	5,5041041	1,3760260	18,0954697	23,9613298	15,282	15	,000
Par 4 Pre - Cntrl	22,6425744	4,5740594	1,1435149	20,2052302	25,0799186	19,801	15	,000

ANOVA de un factor

ANOVA de un factor

arcsenHOST

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	172,335	3	57,445	4,605	,006
Intra-grupos	748,549	60	12,476		
Total	920,884	63			

Prueba post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: arcsenHOST

Bonferroni

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
tt1	tt2	3,2827305	1,2487898	,065	-,124658	6,690119
	tt3	2,8541847	1,2487898	,155	-,553203	6,261573
	Control	4,4683594*	1,2487898	,004	1,060971	7,875747
tt2	tt1	-3,2827305	1,2487898	,065	-6,690119	,124658
	tt3	-,4285458	1,2487898	1,000	-3,835934	2,978842
	Control	1,1856289	1,2487898	1,000	-2,221759	4,593017
tt3	tt1	-2,8541847	1,2487898	,155	-6,261573	,553203
	tt2	,4285458	1,2487898	1,000	-2,978842	3,835934
	Control	1,6141747	1,2487898	1,000	-1,793213	5,021563
Control	tt1	-4,4683594*	1,2487898	,004	-7,875747	-1,060971
	tt2	-1,1856289	1,2487898	1,000	-4,593017	2,221759
	tt3	-1,6141747	1,2487898	1,000	-5,021563	1,793213

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Anexo 3.3. Análisis estadístico del parámetro de evaluación de la movilidad espermática.

Pruebas de normalidad

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pre	,188	16	,133	,928	16	,226
tt1	,182	16	,161	,939	16	,342
arcsen(mot) tt2	,185	16	,145	,906	16	,100
tt3	,170	16	,200*	,902	16	,087
Control	,204	16	,073	,904	16	,092

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Prueba T

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 Pre - tt1	20,1156403	2,0846204	,5211551	19,0048245	21,2264561	38,598	15	,000
Par 2 Pre - tt2	23,4595325	2,2494987	,5623747	22,2608593	24,6582057	41,715	15	,000
Par 3 Pre - tt3	24,2141193	2,1934762	,5483690	23,0452984	25,3829403	44,157	15	,000
Par 4 Pre - Cntrl	26,2549290	2,7046145	,6761536	24,8137417	27,6961163	38,830	15	,000

ANOVA de un factor

ANOVA de un factor

Arcsenmot

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	312,874	3	104,291	30,317	,000
Intra-grupos	206,401	60	3,440		
Total	519,276	63			

Prueba post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: arcsenmot

Bonferroni

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
tt1	tt2	3,3438922 [*]	,6557462	,000	1,554655	5,133130
	tt3	4,0984790 [*]	,6557462	,000	2,309241	5,887717
	Control	6,1392887 [*]	,6557462	,000	4,350051	7,928526
tt2	tt1	-3,3438922 [*]	,6557462	,000	-5,133130	-1,554655
	tt3	,7545868	,6557462	1,000	-1,034651	2,543824
	Control	2,7953965 [*]	,6557462	,000	1,006159	4,584634
tt3	tt1	-4,0984790 [*]	,6557462	,000	-5,887717	-2,309241
	tt2	-,7545868	,6557462	1,000	-2,543824	1,034651
	Control	2,0408097 [*]	,6557462	,017	,251572	3,830047
Control	tt1	-6,1392887 [*]	,6557462	,000	-7,928526	-4,350051
	tt2	-2,7953965 [*]	,6557462	,000	-4,584634	-1,006159
	tt3	-2,0408097 [*]	,6557462	,017	-3,830047	-,251572

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Anexo 3.4. Análisis estadístico del parámetro de evaluación de la integridad acrosomal/ viabilidad (VAI).

Pruebas de normalidad

tratamiento	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pre	,162	16	,200 [*]	,975	16	,907
tt1	,167	16	,200 [*]	,933	16	,275
arcsen(VAI) tt2	,149	16	,200 [*]	,940	16	,354
tt3	,134	16	,200 [*]	,927	16	,217
Control	,135	16	,200 [*]	,968	16	,803

*. Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de la significación de Lilliefors

Prueba T

Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 PreVAI - tt1	24,8070536	3,9461985	,9865496	22,7042728	26,9098343	25,145	15	,000
Par 2 PreVAI - tt2	29,3647696	5,1203793	1,2800948	26,6363121	32,0932271	22,940	15	,000
Par 3 PreVAI - tt3	28,5010095	5,1217346	1,2804336	25,7718298	31,2301892	22,259	15	,000
Par 4 PreVAI - Cntrl	29,5389010	4,8590774	1,2147694	26,9496814	32,1281206	24,316	15	,000

ANOVA de un factor

ANOVA de un factor

arcsenVAI

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	234,648	3	78,216	3,495	,021
Intra-grupos	1342,620	60	22,377		
Total	1577,268	63			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: arcsenVAI

Bonferroni

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
					tt1	tt2
	tt3	3,6939559	1,6724608	,186	-,869440	8,257352
	Control	4,7318474*	1,6724608	,038	,168451	9,295244
tt2	tt1	-4,5577160	1,6724608	,050	-9,121112	,005680
	tt3	-,8637601	1,6724608	1,000	-5,427156	3,699636
	Control	,1741314	1,6724608	1,000	-4,389265	4,737528
tt3	tt1	-3,6939559	1,6724608	,186	-8,257352	,869440
	tt2	,8637601	1,6724608	1,000	-3,699636	5,427156
	Control	1,0378915	1,6724608	1,000	-3,525505	5,601288
Control	tt1	-4,7318474*	1,6724608	,038	-9,295244	-,168451
	tt2	-,1741314	1,6724608	1,000	-4,737528	4,389265
	tt3	-1,0378915	1,6724608	1,000	-5,601288	3,525505

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.