

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Efecto de la congelación en la viabilidad de espermatozoides
epididimarios de *Cavia porcellus* "cuy"**

**Tesis para optar el título profesional de Bióloga,
Especialidad: Biotecnología**

Presentado por:

Bach. Katherine Jaqueline Vallejos Sánchez

Asesor:

Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua

Ayacucho - Perú

2009

A mis abuelos.

A mis padres Oscar y Flora,
por brindarme su apoyo incondicional.

A mi hermano Oscar José con cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga por ser mi alma mater y albergarme entre sus aulas.

Por todo el apoyo brindado y por promover el desarrollo de la investigación a la Universidad Ricardo Palma.

Al Dr. Hugo Gonzáles Figueroa por permitirme realizar el trabajo de tesis, compartir sus conocimientos y brindar su apoyo; al Ms. Cs. Hugo Mauricio Gonzáles Molfino, mi asesor externo por su apoyo y los conocimientos brindados, docentes investigadores de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

Al Mg. Fidel Mujica Lengua, mi asesor interno por la revisión y discusión del presente trabajo.

A mis maestros, por el apoyo y la enseñanza brindada en estos años de formación académica y personal.

A mi grupo de estudio de la universidad, Nery Escriba, Marilú Arango, Jhanina Rodríguez, Jhon Ochoa y Keny Martínez, gracias por su amistad incondicional.

Al grupo del Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal – Universidad Ricardo Palma, por la ayuda prestada y su constante apoyo, especialmente a Fernando, Diego, Oscar, Rocío, Giuliana y Rodrigo.

A todos aquellos que me brindaron su apoyo para la realización de este trabajo.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Aspectos generales del cuy	4
2.3 Sistema de colección de espermatozoides de cuy	8
2.4 Contratación de la calidad espermática	9
2.5 Capacitación espermática y reacción del acrosoma	11
2.6 Criopreservación de gametos	12
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1. Recolección y transporte de testículos de cuy <i>post mortem</i>	24
3.2. Medios de cultivo y dilutores	24
3.3. Obtención de espermatozoides epididimarios de cuy por lavado retrógrado	25
3.4. Evaluación de espermatozoides epididimarios de cuy antes y después de la congelación	26
3.4.1 Concentración espermática	26
3.4.2 Motilidad individual	26
3.4.3 Integridad de membrana	27
3.4.4 Reacción del acrosoma	27
3.4.5 Evaluación de la supervivencia espermática en hipotermia (4°C)	28
3.5. Congelación de espermatozoides epididimarios de cuy	29
3.6. Descongelación de espermatozoides epididimarios	31
3.7. Análisis estadístico	31
IV. RESULTADOS	32
V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	57
VII. RECOMENDACIONES	58
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	67

Título: Efecto de la congelación en la viabilidad de espermatozoides epididimarios de *Cavia porcellus* "cuy"

Autora: Bach. Katherine Jaqueline Vallejos Sánchez

Asesores: Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, MsCs. Hugo Mauricio Gonzáles Molfino.

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivos coleccionar espermatozoides epididimarios de cuy mediante el lavado retrógrado, evaluar la viabilidad espermática pre-congelamiento y post-descongelamiento de los espermatozoides epididimarios de cuy en base a la motilidad individual, integridad de membrana y reacción del acrosoma. Se emplearon 104 pares de testículos procedentes de cuyes beneficiados para consumo humano en el Mercado de Caquetá - San Martín de Porres, se transportaron al Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal -Universidad Ricardo Palma a temperatura ambiente. El lavado de las caudas se realizó mediante flujo retrógrado con el diluyente a base de Tris, obteniéndose una concentración que osciló entre $10 \times 10^6 - 30 \times 10^7$ esp/ ml y una vitalidad espermática promedio de 71.29%. Para evaluar el efecto de la congelación de los espermatozoides epididimarios se utilizó diferentes agentes crioprotectores: glicerol al 2% añadido en un paso, dos pasos y 30 minutos, etilenglicol a concentraciones de 5, 10 y 15 % y Dimetilsulfóxido (DMSO) a concentraciones de 5, 10 y 15 % y la combinación de etilenglicol a concentraciones de 5, 10 y 15 % + 2% de glicerol a cada una, DMSO a concentraciones de 5, 10 y 15 % + 2% glicerol a cada una, los que se añadieron al medio base en el que se encontraban los espermatozoides, permanecieron entre 2 - 3 horas a 5° C, para el proceso de estabilización, se aspiró manualmente en pajillas de 0.25 cc, se expuso a vapores de nitrógeno líquido por 10 minutos para luego sumergirlos por completo. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que la motilidad pre-congelación osciló entre 54.17 - 68.33 % y post-descongelación de 3% siendo la más alta obtenida mediante el uso de glicerol, integridad de membrana pre-congelación medida por la prueba de Shock hipo-osmótico (HOST) osciló entre 46.67 - 70.17% y evaluada mediante la Prueba del Agua (WT) osciló entre 47.50 - 69.50 % y post-congelación por la prueba de HOST 9.83 % cuando se usó glicerol como crioprotector y por la prueba de WT 9.27% cuando se usó DMSO + 2% glicerol y reacción del acrosoma inducida por la adición de imidazol al medio SM pre-congelación que fue 62.30 +/- 8.96 % y no se observó reacción del acrosoma post-descongelación. Según los resultados obtenidos, se concluye que la congelación en nitrógeno líquido (a -196°C) afecta drásticamente la viabilidad de los espermatozoides epididimarios de cuy.

Palabras clave: *espermatozoides, epidídimo, congelación, crioprotectores.*

I. INTRODUCCIÓN

El cuy es un pequeño roedor mamífero originario de la zona andina de Bolivia, Colombia, Perú y Ecuador, identificado con la vida y costumbres de la sociedad indígena, ahora está ampliamente distribuido y reconocido por su carne de alto valor nutritivo, así como mascota y animal de experimentación.

Debido al creciente interés por la conservación de los recursos genéticos se han venido desarrollando diferentes biotecnologías entre ellas la criopreservación de gametos. Esta técnica permite conservar las células vivas por largos períodos de tiempo, mediante la utilización de bajas temperaturas, sin embargo; no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones en las membranas celulares y organelas, estos efectos varían entre especies e inclusive entre individuos de la misma especie por la fisiología y bioquímica de los mismos.

La congelación de gametos y embriones de estos animales, ofrece la potencialidad de preservar el genoma animal mediante la creación de bancos de recursos genéticos, donde se mantengan de forma indefinida, pero la condición previa a la formación de este tipo de depósitos genéticos debe ser la existencia de metodologías adecuadas para obtener, congelar, conservar y mantener la viabilidad post-descongelación del material criopreservado.

Una alternativa de estudio es la obtención y utilización de espermatozoides de animales *post mortem* de alto valor genético, de laboratorio e inclusive de animales en peligro de extinción, ya que de acuerdo a los avances en estas biotecnologías se podrán orientar las investigaciones a los pequeños núcleos de animales de razas autóctonas que son más vulnerables al riesgo de extinción y por tanto a la pérdida de la diversidad genética que llevan en su código de ADN.

Los espermatozoides del epidídimo de cuy se pueden mantener en la cauda y conservar la capacidad fecundante por períodos prolongados de tiempo en condiciones hipotérmicas, pero no se conoce si estos son factibles de ser congelados en nitrógeno líquido y de este modo preservados por periodos aún más prolongados.

Los objetivos del presente estudio fueron:

- Colectar espermatozoides epididimarios de cuy mediante el lavado retrógrado.
- Evaluar la viabilidad espermática pre congelamiento de los espermatozoides epididimarios de cuy en base a la motilidad individual, integridad de membrana y reacción del acrosoma.
- Evaluar la viabilidad espermática post descongelamiento de espermatozoides epididimarios de cuy en base a la motilidad individual, integridad de membrana y reacción del acrosoma.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Polge et al., (1949) criopreservaron espermatozoides, lo que desencadenó lo que hoy llamamos criopreservación de gametos, por lo que se ha venido desarrollando el estudio de los efectos de la congelación en espermatozoides de distintas especies debido a la diferencia entre estos, básicamente por dos fuentes de variabilidad: i) la fisiología y bioquímica de los mismos espermatozoides y ii) las variaciones en la anatomía y fisiología del espermatozoide durante el transporte en el tracto reproductivo de la hembra (Holt, 2000).

Vivanco y col., (1977), al refrigerar los espermatozoides de cuy reportaron que el dilutor que ofreció mejores resultados fue el Tris glicerinado, que mantuvo viables a los espermatozoides por 15 días a 4°C.

González (1988), hace referencia que los espermatozoides de cuy pueden ser mantenidos hasta por 336 horas en el Medio San Marcos (SM) cuando estos se encuentran en la cauda epididimaria bajo condiciones de hipotermia.

En ratas, se obtuvo descendencia utilizando espermatozoides epididimarios criopreservados, mediante inseminación intrauterina, haciendo uso de 0.7% Equex Stem (Nakatsukasa et al., 2001).

Así mismo, los espermatozoides de rata se mostraron más sensibles a la adición en un solo paso de 0.9 M de dimetilsulfóxido (DMSO) a temperatura ambiente, lo que causó un efecto negativo sobre la motilidad, integridad de la membrana y la integridad acrosomal, además que son muy sensibles a los cambios de osmolaridad, con respecto a la utilización de otros crioprotectores como son: el glicerol, etilenglicol y propilenglicol (Si et al., 2006).

Al trabajar con espermatozoides de conejos se demostró que la estandarización de los protocolos de congelación se consigue utilizando largos tiempos de estabilización y congelación lenta, por lo que se demuestra la variación que existe entre especies y la sensibilidad que muestran ante la exposición a diversos agentes crioprotectores (Strazinger et al., 1971).

Andrieu (1976) (cit. por Alvaríño, 1993), propone una dilución combinada, haciendo una pre-dilución a 35° C en un medio crioprotector y nutritivo (strazinger), seguido de un enfriamiento hasta 5 °C, tras lo que diluye luego en un medio que contiene glicerol, ello permitiría añadir inicialmente DMSO y yema de huevo carente de glicerol, que a 32 °C tiene efectos tóxicos, siendo indispensable como protector durante la congelación; sin embargo esta combinación disminuye de manera acentuada la motilidad espermática.

2.2 Aspectos generales del cuy

El cuy es una especie nativa importante en la sociedad y cultura Andina. El Perú es el primer productor mundial con 22 millones de animales que se crían generalmente en zonas pobres; el principal producto de estos animales es su carne de buenas características nutritivas: 19,1% de proteína y 7,41% de grasa, destinados principalmente al autoconsumo; y su crianza es una actividad complementaria a la agrícola (INIA, 2004).

Hace 30 años, el INIA inició investigaciones en las áreas de mejoramiento genético, nutrición, alimentación y manejo de cuyes, liderando esta actividad en el ámbito nacional e internacional. La línea de base tecnológica con la que partió la investigación fue el reflejo de una selección negativa mantenida en el tiempo.

En 1970, los cuyes a las 8 semanas de edad pesaban 386 g; sin embargo, 27 generaciones después (2002), debido al proceso de selección el peso vivo se incrementó a 1,040 g (269% de incremento). La mejor raza en la actualidad es la raza Perú, que tiene varias líneas mejoradas como la Merino Andina, Inti, Mantaro, entre otras y 5 ecotipos nativos.

2.2.1 Ubicación taxonómica

Reino	-----	Animalia
Phylum	-----	Chordata
Subphylum	-----	Vertebrata
Clase	-----	Mammalia
Infraclase	-----	Placentalia
Orden	-----	Rodentia
Suborden	-----	Hystricomorpha
Infraorden	-----	Hystricognathi
Familia	-----	Caviidae
Subfamilia	-----	Caviinae
Género	-----	Cavia
Especie	-----	porcellus
Nombre científico	-----	<i>Cavia porcellus</i> (Linnaeus, 1758).

2.2.2 Sexualidad del macho

Está determinada principalmente bajo el influjo de la intensa virilidad, por tanto se trata de animales polígamos. La intensa actividad endocrina del testículo determina en ellos una constante actividad sexual y marcada virilidad (Álvarez, 1993).

2.2.2.1. Aparato reproductor masculino del cuy

Descrito por Martín y col. (2004):

1. Los Testículos: En los cuyes están ubicados en la cavidad abdominal a ambos lados de la vejiga, su forma es ovoide y miden 22 mm. de largo por 18 mm. de ancho, y su peso va desde 2,5 a 4 gramos. Se encuentran en bolsas testiculares que son retraibles. Cuando el macho se excita, los testículos descienden a la región inguinal, a un saco, en este saco ciego se encuentra una porción del músculo cremaster que es el que permite la migración de los testículos a la región abdominal.
2. El Epidídimo: Es voluminoso a la altura de la cabeza y cola de donde sale el ligamento testicular.
3. Conducto deferente: Después de la cola del epidídimo continua el conducto deferente, los cuales junto con las glándulas vesiculares desembocan en la uretra pélvica.
4. Glándulas vesiculares: Son dos glándulas alargadas que se sitúan en la cara ventral de la uretra y presenta un pliegue con gran vascularización que se sitúa entre ambas glándulas, tienen 12 cm. de largo y 6 mm. de diámetro en su parte media. La parte líquida del semen es proporcionado por las vesículas seminales.

4. Próstata: Formada por dos lóbulos, situados en la cara ventral de la uretra y dos lóbulos prostáticos de mayor tamaño situados en la cara dorsal.

5. Glándulas coagulantes y Bulbo uretrales: Cumplen funciones de segregación de sustancias mucilaginosas que taponan la vagina de la hembra después de la cópula.

6. Pene: Órgano copulador del macho, presenta una flexuosidad en forma de S, en el interior existe una zona osificada o hueso peñeano. El glande presenta forma de cono truncado con un orificio en la parte ventral que es el orificio uretral.

2.2.2.2. Gameto masculino en el epidídimo del cuy

En el tracto reproductor masculino de mamíferos, el epidídimo, órgano donde ocurre la maduración post-testicular del espermatozoide, está formado por compartimientos limitados por células epiteliales absorptivas y secretoras dependientes de andrógeno, en cuyos lúmenes se encuentran los espermatozoides (González, 1988).

Basados en criterios morfológicos e histológicos el epidídimo puede ser dividido en tres regiones: caput o cabeza, corpus o cuerpo, cauda o cola, donde los espermatozoides estarán almacenados, siendo una importante reserva (Thibault et al., 1993). Es en la cola del epidídimo donde se almacenan los espermatozoides, conteniendo alrededor del 75 % de las células espermáticas alojadas en el epidídimo (Hafez y Hafez, 2000).

Las funciones del epidídimo son el transporte, almacenamiento y maduración de espermatozoides, en los cuales el tiempo de permanencia en las diferentes regiones del epidídimo son: en la cabeza 3 días, en el cuerpo 2 días y en la cola

de 6 – 8 días (Thibault et al., 1993), según esta referencia es en la cola del epidídimo que se almacena por mayor tiempo, siendo esto dependiente de la actividad sexual del individuo.

La composición y regulación del fluido epididimal es imprescindible para que ocurran tres cambios:

1. Una reducción en el volumen de flujo epididimal debido a la absorción de iones y agua, conduciendo a un aumento sustancial de espermatozoides.
2. Formación de un medio estable distinto al plasma sanguíneo, con la característica de mantenerlos inmovilizados pero vivos.
3. Síntesis de proteínas específicas del epidídimo

Mediante el transporte de sustancias que se realiza a través de la barrera epitelial, es posible distinguir los cambios que contribuyen al advenimiento de la capacidad fecundante, de los cambios concernientes a mantener el espermatozoide almacenado en la cauda epididimaria (Thibault et al., 1993).

Según Hafez y Hafez (2000), el desarrollo de la capacidad fecundante se asocia con cambios de la integridad funcional de los espermatozoides:

- a. Desarrollo del potencial para la motilidad progresiva sostenida
- b. Modificación de los patrones metabólicos y el estado estructural de organelas específicos de la cola
- c. Cambios en la cromatina nuclear
- d. Cambios en la naturaleza de la superficie de la membrana plasmática
- e. Movimiento y pérdida de la gota citoplasmática

El espermatozoide del género *Cavia* tiene una cabeza larga y el acrosoma es más sensible a daños, por lo que en la matriz luminal, los espermatozoides están asociados por fuerzas cohesivas, cabeza a cabeza formando rouleaux

(Sheperd et al., 1974) que exhiben cierto grado de motilidad y a su vez le confieren protección, ya que al agruparse no son fagocitados por los polimorfos en la vagina, cervix o el útero del cuy hembra, como sería con las células individuales (Martan and Shepherd, 1973), dichas agrupaciones pueden facilitar la supervivencia de la asociación espermática en la hembra.

Cavia aperea, el ancestro no domesticado del cobayo presenta una aglutinación en la misma región que el cuy (Parte distal de la cabeza: Fawcett and Hollenberg, 1963, cauda: Hoffer and Greenberg, 1978), la aglutinación de espermatozoides es observada también en otras especies como *Glaucomas volans* "ardilla voladora", reportado por Martan and Hruban (1970).

2.3 Sistema de colección de espermatozoides epididimarios

Hay diferentes técnicas de colección de espermatozoides epididimarios, se conocen tres técnicas para coleccionar espermatozoides de animales muertos y dos técnicas para coleccionar espermatozoides de animales vivos y pueden ser utilizados a menudo a los seres humanos. Se detallan a continuación:

- **Incisiones:** Consiste en separar el epidídimo del testículo de la manera más aséptica posible, siendo este uno de los métodos de colección más rápidos y el más fácil de realizar. Se realizan varias incisiones longitudinales que se hacen en el extremo distal del epidídimo para exponer el esperma al ambiente externo, estos son coleccionados en medios isotónicos. Este proceso tiene una buena tarifa de recuperación de esperma, sin embargo, puede haber contaminación con sangre durante el proceso (Guerrero, 2006).

- **Trituración:** Es un proceso largo donde se requiere filtrar y quitar pedazos de tejido, siendo ahí donde hay un deterioro de la muestra esperma. La viabilidad espermática puede ser afectada debido a la centrifugación y a la exposición a los componentes de la sangre. Este método proporciona una alta tarifa de recuperación de la esperma, sin embargo, hay una alta probabilidad de contaminación con sangre proveniente del tejido (Guerrero, 2006).

- **Lavado a presión:** Consiste en hacer un lavado con un medio líquido la cauda de cada testículo por la presión ejercida. El esperma se recoge en un tubo de prueba de 15 ml. Este método proporciona la tarifa de recuperación más alta y de menor contaminación (Guerrero, 2006).

- **Aspiración epididimal percutánea del esperma (PESA)** (Craft et al., 1995, Patrizio, 2000).

- **Aspiración epididimal microquirúrgica del esperma (MESA)** (Patrizio y col., 1988). Este acercamiento proporciona una tarifa de recuperación más alta que PESA, sin embargo, él es más invasor y costoso (Patrizio, 2000).

2.4 Contratación de la calidad espermática

El análisis de los espermatozoides tiene por objeto valorar la calidad de la suspensión obtenida de la cauda epididimaria. La necesidad de utilizar diferentes técnicas en la valoración de la calidad de los espermatozoides se debe a la falta de una sola prueba que determine su fecundidad, debido en gran parte, a que el espermatozoide es una célula altamente especializada y con una función biológica compleja, influenciada por diversos factores externos *in vitro*, por los

tratamientos a los que es sometido o *in vivo*, por los cambios que sufre en el tracto reproductor de la hembra (Cortes, 2003).

2.4.1 Motilidad espermática

La valoración de la motilidad espermática implica la estimación subjetiva de la viabilidad de los espermatozoides, los parámetros de motilidad incluyen (Hafez y Hafez, 2000):

- Estimar el porcentaje (0 – 100%) de espermatozoides en una muestra de semen pudiendo diluirse en una solución isosmótica.
- Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.
- Así mismo puede valorarse en una escala de 0 a 5 en orden a la progresión del movimiento (Maxwell y Evans, 1990).
- Longevidad de la motilidad espermática en semen puro y semen diluido.

La motilidad espermática se valora rutinariamente de manera subjetiva mediante un microscopio que tenga lente de contraste de fase (a 10 x ó 20x), los actuales sistemas de análisis de imagen asistidos por ordenador ó sistemas C.A.S.A (Computer-Assisted- Sperm-Analysis) son capaces de determinar, de manera objetiva, toda una serie de parámetros de velocidad y angulañidad.

El movimiento desarrollado por los espermatozoides es característico de especie y del estado fisiológico en que se encuentre, estando sujeto también al efecto ejercido por el método de recogida, factores ambientales, manejo del semen tras su obtención (Maxwell y Evans, 1990). El espermatozoide del cuy en el epidídimo de acuerdo a su movimiento puede ser valorado de acuerdo a la zona en la que se encuentre, donde se pueden ver espermatozoides con movimientos no progresivos, generalmente los que se encuentran en la región distal de la

cabeza del epidídimo, y los que presentan movimiento progresivo, que muestran un incremento de la velocidad, viéndose este tipo de movimiento entre las regiones proximal –distal de la cauda del epidídimo (Hunnicut et al., 1997).

2.4.2 Prueba de permeabilidad de membrana

La prueba de permeabilidad de membrana está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática, la prueba consiste en la inclusión de células espermáticas en una solución hipoosmótica provocando el paso del agua a través de la membrana desde el medio extracelular hacia el interior del espermatozoide hasta alcanzar su equilibrio osmótico (Eckert et al., 1989), observándose cambios morfológicos a nivel de la cola. El hinchamiento se evidencia más fácilmente en el flagelo espermático por ser en esta porción la membrana plasmática más flexible y estar más separada de las estructuras inferiores que en la cabeza (Jeyendran et al., 1984), si la membrana se encuentra dañada, o se ha vuelto altamente permeable, no se observan dichos cambios.

Según el WHO (1993), la prueba de endósmosis no se debe utilizar como prueba para determinar la función espermática, sino que puede ser usado como una prueba de vitalidad.

La prueba de permeabilidad de membrana se realiza comúnmente mediante la prueba hipo-osmótica - HOST (endósmosis ó Hipo-osmotic swelling test), la cual se realiza utilizando una solución de fructosa y citrato de sodio (150 mOs.l^{-1}) descrito por Jeyendran et al., (1984), posteriormente Lomeo and Giambersio (1991), describieron un nuevo procedimiento para la determinación de este parámetro utilizando agua destilada (0 mOs.l^{-1}), a la que denominaron como

prueba del agua o WT (water test), que consiste en poner en contacto el espermatozoide con agua destilada, a la que se le atribuye como una técnica más rápida y sencilla con respecto al HOST.

2.5 Capacitación espermática y reacción del acrosoma

2.5.1 Capacitación y reacción acrosómica *in vivo*

Los espermatozoides desarrollan su capacidad inicial de fecundar óvulos durante su transporte por el epidídimo, dicha capacidad se considera potencial, porque los espermatozoides deben experimentar capacitación antes de que puedan penetrar el óvulo (Hafez y Hafez, 2000), durante la eyaculación, las secreciones de las glándulas accesorias se adhieren a la membrana espermática, dichas secreciones previenen la expresión prematura de la habilidad fertilizante del espermatozoide.

In vivo, los espermatozoides pasan del plasma seminal a los fluidos del tracto femenino, esto ocurre en la cervix cuando la eyaculación es intravaginal (en la mayoría de mamíferos), en el útero cuando el eyaculado es depositado en la vagina, en la cervix (roedores), o directamente en el útero (cerda, yegua, perra) (Thibault et al., 1993). La velocidad de los espermatozoides y su patrón de motilidad se modifican cuando dichos gametos son transportados a través de los diferentes segmentos del aparato reproductor femenino, la hiperactivación espermática ocurre principalmente en el oviducto casi al momento de la ovulación, y puede ser decisiva en el transporte final de los gametos, la capacitación completa de éstos y la reacción acrosomal (Hafez y Hafez, 2000).

La capacitación es definida como el tiempo que el espermatozoide permanece en el tracto reproductor femenino, antes de que adquiera la habilidad de

fecundar al ovocito (Austin, 1952), seguido de la reacción del acrosoma, que es un evento excitotico, corto, dependiente del Ca^{+2} (Thibault et al., 1993), donde están involucradas múltiples fusiones entre la membrana plasmática del espermatozoide y la membrana acrosomal externa y resultan en la formación de una membrana vesiculada, con diferentes dominios entre ambas membranas (Flaherty and Olson, 1988; Yanagimachi, 1994), el tiempo de capacitación del espermatozoide de cuy, obtenido de la cauda epididimaria es de aproximadamente 10 – 12 horas (Thibault et al., 1993).

Durante la capacitación ocurren dos cambios (Thibault et al., 1993):

- La amplitud del movimiento incrementa debido a la gran flexibilidad del flagelo desde la pieza intermedia, consecuentemente la cabeza del espermatozoide nada ligeramente en oposición al flagelo
- La rotación de la cabeza cesa de manera que de un movimiento progresivo se vuelve circular.

2.5.2 Capacitación y reacción acrosómica *in vitro*

La capacitación y la reacción del acrosoma *in vitro* pueden ser separadas temporalmente, la presencia de Ca^{++} es requerida para que ocurra la reacción del acrosoma y esto sugiere un incremento de la concentración de cGMP/cAMP lo que promueve el ingreso del Ca^{++} , por lo tanto la reacción del acrosoma del cuy (Santos and Gordon, 1980).

Cuando los ácidos grasos se unen al glicerol se altera el equilibrio de los fosfolípidos de la membrana, aumentando notablemente los lisofosfolípidos, los cuales se ha comprobado desencadenan la reacción acrosómica en el cobayo (Fleming and Yanagimachi, 1981), pero se ha demostrado en otras especies que

este estrés puede reducirse mediante la incorporación en etapas del glicerol, en el proceso de criopreservación (Gao et al., 1993).

Barros et al., (1984) refieren que en animales como el hámster sirio y el cuy se evidencia directamente la capacitación espermática y la reacción del acrosoma en espermatozoides vivos, sin embargo la capacidad fecundante será evaluada después de que halla penetrado al oVocito (Gonzáles, 1988).

Gonzáles (1988), utiliza el Medio San Marcos (SM), que separa temporalmente la capacitación de la reacción del acrosoma en el modelo espermatozoide de cuy, la capacitación se logra en 2 horas, y la reacción del acrosoma es inducida por la adición de 10 mM de imidazol.

2.6 Criopreservación de gametos

La Criobiología es una disciplina que se encarga de estudiar los efectos de bajas temperaturas en células y tejidos, y a su vez permitir la conservación, frenando los procesos de envejecimiento y degeneración celular (Elder and Dale, 2003; Mazur, 1984), es decir los materiales permanecen genéticamente estables y metabólicamente inertes (Hafez, 1986), generalmente entre -80°C y -196°C referido al punto de ebullición del nitrógeno líquido, para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y mantenerlo en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas; por lo que esta disciplina aplicada a técnicas de reproducción asistida, proporciona la metodología más idónea para mantener la diversidad genética.

Elliinton (1999), refiere que la estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Estudios del efecto de la congelación sobre la membrana celular sugieren que la agrupación de las proteínas durante la fase de separación lipídica inducida por el enfriamiento no es enteramente reversible, esto podría tener implicancias sobre la estructura de los receptores y por lo tanto sobre la interacción de gametos.

Los pequeños núcleos de animales de razas autóctonas, son más vulnerables al riesgo de extinción y por tanto a la pérdida de la diversidad genética que llevan en su código de ADN. La congelación de gametos y embriones de estos animales, ofrece la potencialidad de preservar el genoma animal mediante la creación de Bancos de Recursos Genéticos, donde se mantengan a -196° C, de forma indefinida (Vázquez y col., 1998; Day and Stacey, 2007).

2.6.1 Tratamiento de espermatozoides para su congelación

2.6.1.1. Dilución de espermatozoides

Las células espermáticas individualmente son expuestas a altas y bajas concentraciones de sales simultáneamente, la incorporación de consideraciones de microarquitectura como hipótesis de crioinjuria, puede explicar porque algunos espermatozoides sobreviven intactos al proceso de criopreservación, mientras otros sufren daño acrosomal, en la membrana y pérdida de la motilidad (Holt, 2000), ya que no todas las células se encuentran en el mismo espacio, ni con las mismas concentraciones de los componentes del dilutor utilizado.

Los medios de dilución deben presentar las siguientes características:

1. Presión osmótica lo más isotónica posible con el esperma y mantenerla durante el almacenamiento (entorno a 320 miliosmoles/kg), balance electrolítico
2. Contener sustancias tampón que permitan mantener un pH invariable y neutro.
3. Contener sustancias coloidales capaces de proteger a los espermatozoides durante el congelamiento..
4. Poseer sustancias nutritivas o elementos que favorecen el metabolismo, vitalidad y longevidad de los zoospermos.
5. Estar libres de sustancias, productos bacterianos u organismos infecciosos perjudiciales para los espermatozoides, tracto genital de la hembra o proceso de fecundación, implantación y desarrollo embrionario (Berndtson and Pickett, 1978; Graham, 1978; Alvaríño, 1993).

Los diluyentes pueden ser divididos en dos grupos:

- Diluyentes iónicos: Se utilizan cuando se pretende inseminar con semen fresco.
- Diluyentes orgánicos: Se utilizan para periodos de conservación más largos en refrigeración o congelación.

Cabe mencionar que para la conservación de esperma es necesario la utilización de medios de procedencia biológica o sintética, entre ellos se encuentra la yema de huevo debido a su valor de descenso microscópico, similar al de semen y a su función protectora frente al "choque por frío", atribuible a la fracción lecitínica u otros fosfolípidos y lipoproteínas de baja densidad (Alvaríño, 1993; Foulkes,

1977). La presencia de yema de huevo en el dilutor (5-20%) se comporta como un protector ante los efectos del choque frío, utilizado para dilución de semen.

2.6.1.2. Refrigeración y equilibración de la célula espermática

Otro aspecto es el tiempo de equilibración, el cual se define como el período que transcurre desde que se añade el glicerol hasta que se congelan las células espermáticas (Graham et al., 1978).

Se realiza con el fin de lograr un descenso gradual de la temperatura y permitir que las células espermáticas se equilibren con el diluyente (5 °C).

2.6.1.3. Velocidad de congelación de la célula espermática

El rango crítico de temperatura para la supervivencia de los espermatozoides durante la congelación se encuentra entre los -10°C y los -40°C, por lo tanto cuanto antes pasen este intervalo mayor será la recuperación post - descongelación (Watson, 1990).

Cuando se utilizan velocidades de congelación altas los mejores resultados post-descongelación han sido obtenidos con descongelamientos también rápidos (Fiser et al., 1986). Por el contrario, si la congelación se realiza con velocidades lentas y la descongelación es rápida, no se concede a la célula espermática el tiempo suficiente para que reestablezca el equilibrio osmótico con el medio externo (Leibo, 1981), originándose la entrada de agua al interior del espermatozoide, provocando la ruptura de estructuras celulares (Fiser et al., 1986).

Las células espermáticas son congeladas a tasas bastante rápidas, en el rango de 15 – 60 °C/min lo cual ha sido empíricamente calculado como la velocidad de

congelación que permite mayor probabilidad de obtener una mejor tasa de supervivencia celular (Mazur, 1984).

2.6.1.4. Descongelación de las células espermáticas

Son múltiples factores que afectan la supervivencia de los espermatozoides al descongelado: la metodología de congelación y descongelación, la concentración espermática en el diluyente, el envasado, la composición del diluyente empleado (Stornelli y col., 2005).

Holt y North (1991), han demostrado que los signos de estrés manifestado por los espermatozoides luego de la congelación no se relacionan solo con el estrés osmótico sufrido en el descongelado sino también con el estrés sufrido durante el congelado.

El porcentaje de células que sobrevive a un proceso de congelación está determinado por la sensibilidad al estrés osmótico durante la adición y remoción de crioprotectores y durante el enfriamiento y el recalentamiento. Leibo and Bradley (1999), refieren que el hecho de que los individuos puedan ser clasificados como “buenos congeladores” o “malos congeladores” implica ciertas características de estructura de membrana, las cuales pueden estar genéticamente determinadas, predisponen a la supervivencia bajo el estrés de criopreservación.

En este sentido, la congelación intracelular es letal para la célula dependiendo particularmente del tamaño y de la cantidad de cristales de hielo formados en el citoplasma, ya que altas velocidades de enfriamiento producen cristales intracelulares pequeños que pueden llegar a ser inocuos,

pero éstos pueden unirse y crecer durante la descongelación por medio de un proceso denominado recristalización (Holt, 2000, Mazur, 1980).

2.6.2 Cambios ocurridos en la célula espermática durante el proceso de congelación

Se sabe que el daño a las células espermáticas crioconservadas es inducido por la formación de hielo intracelular, lo cual puede ocurrir tanto durante la congelación como la descongelación (Medina et al., 2005).

2.6.2.1. Shock de frío

El enfriamiento rápido del semen entre 30°C y 0°C induce un estrés letal en algunas células (Watson, 1981,1995), y un enfriamiento lento induce un estrés sobre la membrana del espermatozoide, este hecho está relacionado con un cambio de fase lipídica, estos cambios ocurren en su mayoría, entre los 5°C y 15°C y alteraría el estado funcional de la membrana (Stornelli y col., 2005), sin embargo se observó que los mayores daños de membrana ocurren durante el proceso de calentamiento luego de la descongelación (Holt y col., 1991)

Usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes (Quinn et al., 1980; Watson, 1981) debido a que los fosfolípidos y las lipoproteínas de baja densidad (Foulkes, 1977) poseen un efecto protector contra el shock de frío sobre las células espermáticas, Watson y Martin (1975), reportan que la yema de huevo protege frente al choque frío cuando ésta es añadida al semen a + 30 °C, mientras que cuando se adiciona a + 4°C su efecto protector es insuficiente.

Este shock varía entre especies (Fiser, 1989), y entre individuos de la misma especie (Maxwell, 1986), esto es más evidente en el rango de temperatura entre 0 y 20 °C, siendo dependientes de la temperatura los cambios a nivel de los lípidos de la membrana (Day and Stacey, 2007), lo cual determina requerimientos específicos entre especies en la composición de los diluyentes.

2.6.2.2. Agentes crioprotectores (ACPs) y estrés celular

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas ya que estos reemplazan el agua intracelular durante la congelación (Mizukami et al., 1999), permitiendo que el fluido intracelular pueda ser superenfriado a temperaturas entre -5 y -15 °C sin que ocurra la formación de cristales de hielo, debido a que estas sustancias disminuyen el punto de congelación por medio de la reducción en la interacción entre las moléculas de agua (Vincent et al., 1998) y en consecuencia una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación, pero estos producen a su vez un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides, principalmente por la penetración a través de las membranas celulares (Gao et al., 1993).

La adición de agentes crioprotectores es necesario para la sobrevivencia de los espermatozoides. Polge et al., (1949) trabajaron con semen de gallos y toros donde observaron que eran dependientes del glicerol y probablemente tendría un gran potencial como agente crioprotector. La mayoría de los protocolos usan concentraciones de 0.5 a 1.5 M (aproximadamente 4 – 10 % v/v).

2.6.2.2.1 Agentes crioprotectores penetrantes

Son de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular. Son utilizados: el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO), etilenglicol y propilenglicol. El dimetilsulfóxido es un solvente bipolar aprótico, hidrosoluble, de bajo peso molecular; desde el descubrimiento de sus propiedades el DMSO se ha usado como un crioprotector. García y Vila (1984), refieren que su acción crioprotectora se atribuye principalmente a la habilidad de prevenir acumulación excesiva de electrolitos y otras sustancias durante el proceso de congelamiento, y la formación de cristales de hielo que rompen la estructura de la membrana, su bajo peso molecular permite la entrada rápida través de la membrana celular, modula la estabilidad y fases de la bicapa de los fosfolipidos, así como también afecta los procesos de solvatación de agua.

El DMSO es más tóxico para espermatozoides humanos que el glicerol, recuperándose un menor porcentaje de espermatozoides motiles al descongelado cuando se utiliza este agente como crioprotector, es así que los componentes utilizados habitualmente para criopreservar otras células como el DMSO resulta menos satisfactorio para la criopreservación espermática (Chong, 1985), son las membranas plasmáticas y acrosomas intactos los que son significativamente afectados al exponerlos a DMSO (Si et al., 2006).

El glicerol es generalmente el crioprotector de elección, el cual produce estrés osmótico y la hiperosmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica (Aitken, 2000).

2.6.2.2 Agentes crioprotectores no penetrantes

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano. Estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar (Ávila y col., 2006).

La adición del criopreservante *per* genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los ACPs y después se hidrata. La definición de los parámetros biofísicos de cada célula y el estudio de la interacción con los ACPs durante la congelación y descongelación de las células deben ser definidos para establecer los límites físicos que aseguren la supervivencia de la célula (Ávila y col., 2006).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Recolección y transporte de testículos de cuy *post mortem*

Se colectaron 104 pares de testículos de cuyes beneficiados para consumo humano en el Mercado de Caquetá – Distrito de San Martín de Porres - Lima. Fueron transportados al Laboratorio de Biología del Desarrollo y Fisiología Animal (Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma), el tiempo transcurrido entre la muerte del animal y el transporte al laboratorio fue de 1 a 2 horas.

Las colectas se realizaron entre noviembre del 2008 y marzo del 2009, por colecta se obtuvieron de 5 – 10 pares de testículos, a partir de los cuales se separaron las caudas epididimarias.

3.2. Medios de cultivo y dilutores

Los reactivos utilizados fueron de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA), Merck, los medios fueron preparados el día de su uso:

- a. Dilutor tris – ácido cítrico –yema de huevo, utilizado como medio base al cual se añadieron los agentes crioprotectores de acuerdo a la concentración en estudio, ajustado a pH 6.7 (Cuadro Nº 04, anexo).

- b. Solución hipo-osmótica de fructosa y citrato de sodio, se utilizó para evaluar la permeabilidad de membrana de los espermatozoides de cuy (Cuadro N° 05, anexo).
- c. El medio San Marcos (SM) medio químicamente definido (González y Llerena, 1981), fue utilizado para evaluar la capacitación espermática y evaluar la reacción del acrosoma (*in vitro*), el pH para el medio de cultivo SM fue ajustado entre 7.35 a 7.5 (González, 1988) (Cuadro N° 07, anexo).

3.3. Obtención de espermatozoides epididimarios de cuy por lavado retrógrado

Se realizó mediante el lavado epididimario por flujo retrógrado:

1. Los vasos deferentes y la cola del epidídimo se separaron mediante el uso de implementos y técnicas asépticas.
2. Se localizó el *septum* (indentación) del epidídimo, correspondiente a la porción cercana de la zona media de la cola del epidídimo. Allí se realizó un corte transversal con el bisturí, justo antes que el diámetro del epidídimo se reduce, de ese modo se obtuvo la mayor cantidad de espermatozoides posibles.
3. La porción separada de la cola del epidídimo se colocó en una placa de Petri precalentada a 37°C y se mantuvo la porción libre de los vasos deferentes firmemente sujeta con los dedos pulgar e índice.
4. Las agujas para el lavado fueron preparadas limándole las puntas para hacerlas "romas". Se colocó la aguja dentro del lumen de la porción libre del vaso deferente (Figura N° 01, anexo). Se adaptó una jeringa (de tuberculina)

introdujo lentamente dentro del lumen de cada vaso deferente. Las paredes de los vasos deferentes se pinzaron con una pinza "mosquito" contra la aguja para evitar pérdida del líquido de lavado.

5. A medida que se perfundieron los vasos deferentes con el medio de lavado se observó un abultamiento visible de la cola del epidídimo. Al continuar con presión suave y continua con la jeringa, apareció en el extremo cortado de la cola del epidídimo el contenido epididimario, representado por un líquido espeso y de un color crema pálido o blanco cremoso, dependiendo de la concentración espermática obtenida (Albers y Barrios, 2006).

3.4. Evaluación de espermatozoides epididimarios de cuy antes y después de la congelación

3.4.1 Concentración espermática

Mediante una cámara de Neubauer, para recuento de células, se determinó a partir de la suspensión obtenida, la cantidad de espermatozoides colectados en ambas caudas epididimarias, Esta medición se realizó por duplicado, de manera que no hubiese diferencia mayor a 10 unidades entre ambas repeticiones (Maxwell y Evans, 1990).

3.4.2 Motilidad individual

Se evaluó colocando una gota de la mezcla obtenida luego del lavado retrógrado sobre un portaobjetos temperado entre 37 – 38 °C luego se colocó sobre ella un cubreobjetos que tenía en los extremos plastilina y se observó al microscopio de contraste de fase a un aumento de 400x.

Se estimó el porcentaje de espermatozoides en movimiento de 0 a 100, según Maxwell y Evans (1990), considerando a los espermatozoides libres como a los espermatozoides en rouleaux.

Se realizó el mismo procedimiento para evaluar las muestras post-congelación.

3.4.3 Integridad de membrana

Para evaluar la integridad de la membrana celular de los espermatozoides de cuy se utilizó dos técnicas: Prueba de shock hipo-osmótico - HOST y la prueba del agua -WT.

a. Para el HOST, se colocó 90 uL de buffer y se agregó 10 uL de la muestra, se mezclaron con una pipeta. Se incubó durante 45 – 60 minutos a 37 °C, después de la incubación se colocó una muestra en el portaobjetos y se cubrió con una laminilla. Usando un microscopio compuesto de contraste de fase con un aumento de 40X, se localizaron los espermatozoides y se contaron 200 espermatozoides como mínimo, reconociendo espermatozoides con cola hinchada (González y González, 2004), utilizando aquellos que presentaban una endósmosis positiva mayor o igual al 45 %.

b. Para la prueba del “water test” se colocó 40 µL de agua destilada estéril y 10 µL de la muestra, se incubó durante 5 minutos a 37 °C (Lomeo and Giambersio, 1991), después de la incubación se colocó una muestra sobre un portaobjetos y se cubrió con el cubreobjetos. Se siguió el procedimiento utilizado para la prueba HOS, para la determinación de endósmosis positiva.

3.4.4 Reacción del acrosoma

En discos de cultivo tipo Falcon se prepararon gotas de incubación bajo aceite mineral, que contenían 100 ul. de medio de cultivo “SM” (Cuadro N° 07, anexo),

calentaban previamente (5 – 10 minutos) a 37 °C antes de adicionarles 10 ul. de la dilución espermática obtenida luego del lavado retrógrado, para luego colocar los discos de cultivo en una incubadora de calor seco a 37 °C. La incubación se realizó durante 2 horas, tiempo en el cual se dio la hiperactivación espermática, para luego inducir a la reacción del acrosoma mediante la adición de imidazol (10 mM). En cada muestra se contaron 100 espermatozoides móviles con o sin acrosoma en un microscopio de contraste de fase a 40 X, para establecer el porcentaje de “espermatozoides reaccionados” (González, 1988), para la evaluación se procedió del mismo modo que para el análisis de la motilidad.

El imidazol, es utilizado como un activador de la fosfodiesterasa dependiente de los nucleótidos cíclicos, la capacitación puede involucrar un incremento intracelular de los niveles de cAMP, pero la reacción del acrosoma, puede ser asociado con la reducción de los niveles de cAMP (Santos and Gordon, 1980). La solución se preparo el día de uso y se mantuvo a 37 °C.

3.4.5 Evaluación de la supervivencia espermática en hipotermia (4°C)

Se hizo un experimento adicional para monitorear el comportamiento de los espermatozoides en condiciones de hipotermia, cuando estos se encontraban en el dilutor base y los diferentes agentes crioprotectores, se evaluó la motilidad, utilizando el mismo procedimiento que para las muestras frescas y post-congeladas y la supervivencia espermática mediante la tinción de vitalidad espermática, como se detalla:

3.4.5.1 Porcentaje de vivos y muertos

Esta tinción se utilizó para evaluar la supervivencia espermática de los espermatozoides mantenidos en condiciones hipotérmicas y diferenciar en los

progresivamente hasta llegar a los 5 °C en un tiempo de estabilización de 3 horas y se añadió el glicerol 30 minutos antes de la congelación.

2. Se aspiraron los espermatozoides diluidos en pajuelas de plástico de 0.25 cc. y se selló con alcohol polivinil.
3. Se usó una caja de tecnopor de 30 x 20 cm y se colocó nitrógeno líquido hasta una altura de 3-4 cm, luego sobre una rejilla que se dispuso a 8 cm. de la base del envase se colocó las pajillas y fueron congeladas en vapores de nitrógeno durante 10 minutos, para luego sumergirlas completamente.
4. Se almacenaron sumergidos en nitrógeno líquido.

3.6. Descongelación de espermatozoides epididimarios

Se realizó sumergiendo directamente las pajillas en baño maría a 37 °C durante 20 segundos, luego se secaron las pajillas con papel toalla, y se colocaron en tubos tipo Falcon de 15 ml, luego se procedió a evaluar las muestras.

3.7. Análisis estadístico

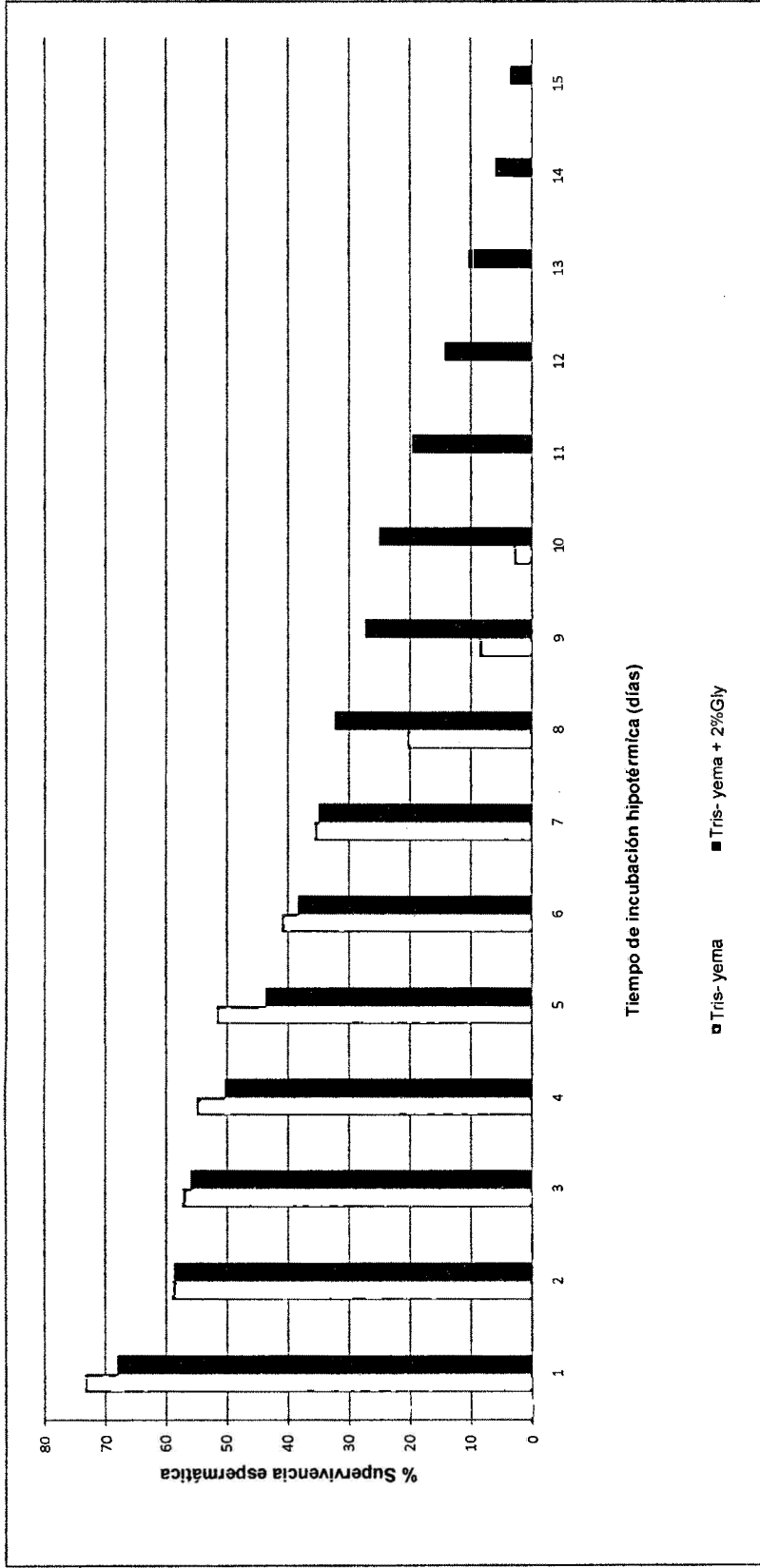
Los resultados sobre motilidad espermática e integridad de membrana se analizaron mediante un análisis de varianza dentro y entre tratamientos, y la prueba de Duncan, para hacer el análisis de medias entre y dentro de tratamientos. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15, considerándose para todos los análisis un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

En el caso de la evaluación de la integridad que se realizó por dos test para hallar el grado de similitud que existe entre el HOST y el WT, se utilizó el estadístico "t- student", tanto para las muestras pre-congelación como para las muestras post-congelación.

IV. RESULTADOS

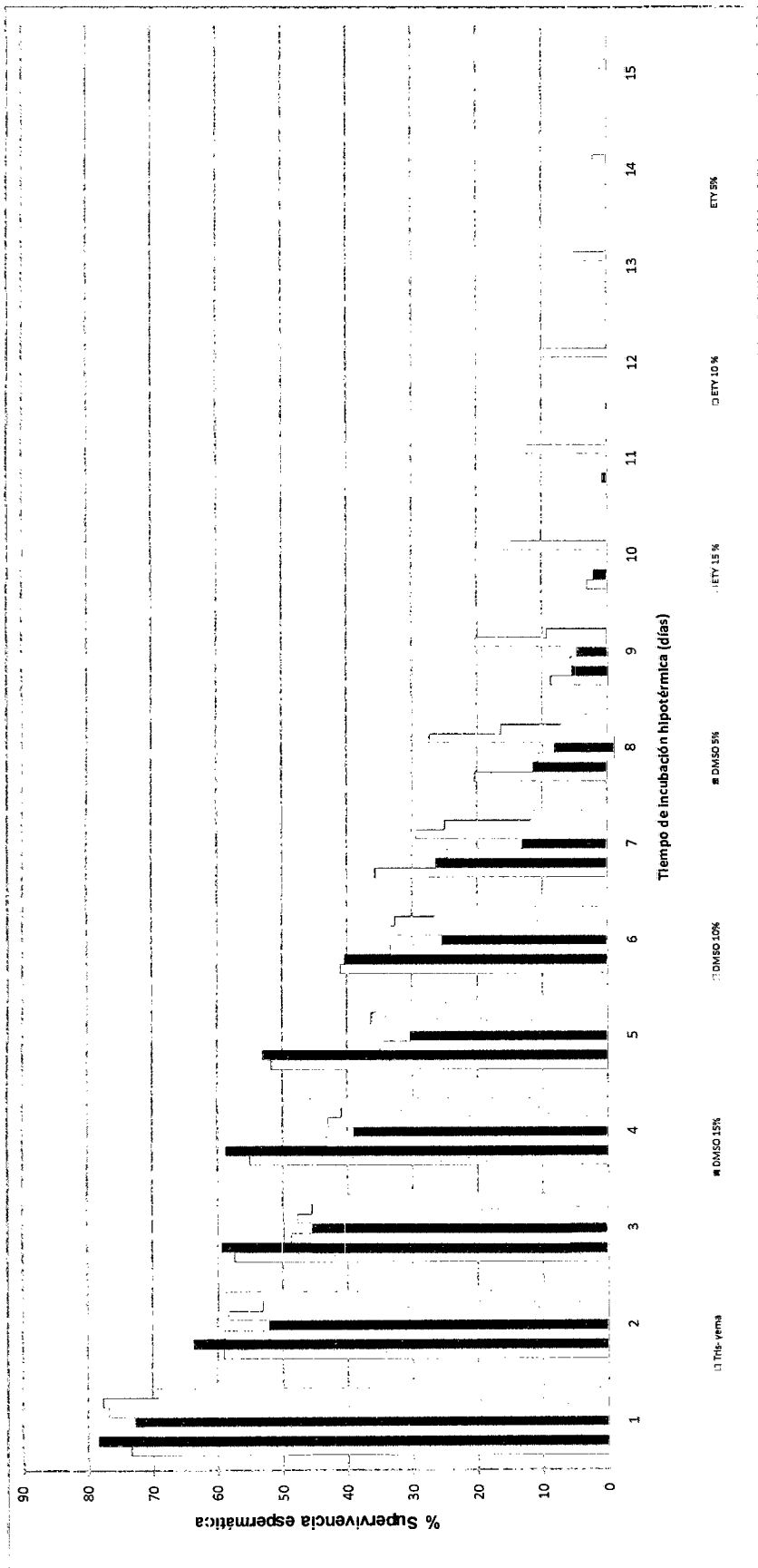
Obtención de espermatozoides epididimarios mediante lavado de flujo retrógrado

Para la obtención de los espermatozoides epididimarios se utilizó 0.5 ml del dilutor base sin yema de huevo (Cuadro N° 04, anexo), como medio de lavado para cada cauda epididimaria (Figura N° 01, anexo), a partir del lavado se obtuvo una concentración espermática que osciló entre 10×10^6 esp/ml – 30×10^6 esp/ml y vitalidad espermática promedio de 71.29 %, factores que varían de acuerdo al animal, la edad y actividad sexual, parámetros que no fueron controlados debido a que no fue objetivo del presente estudio.



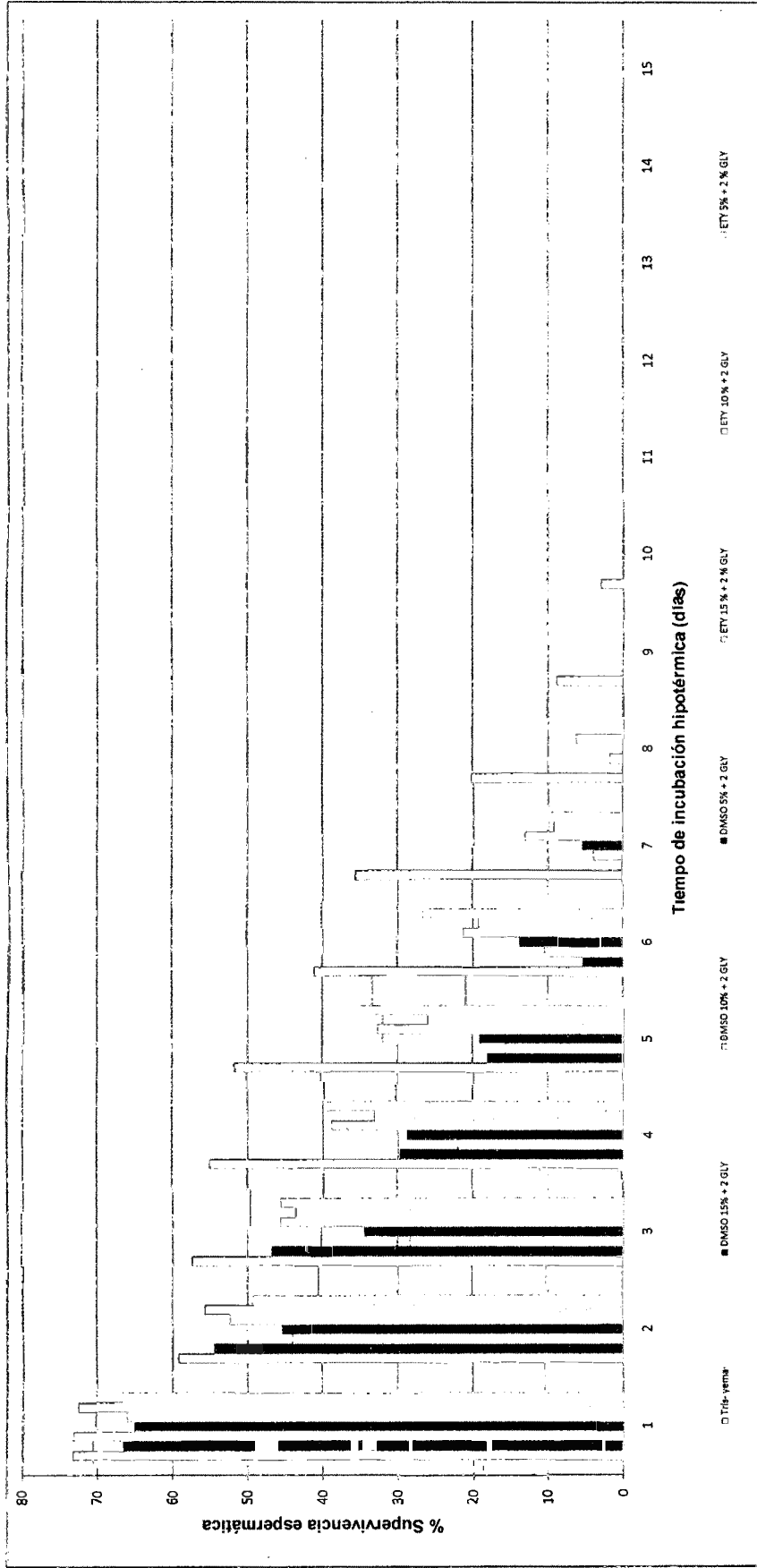
NOTA: GLY = GLICEROL

Gráfico N° 01.- Variación del porcentaje de supervivencia espermática de cuyes en presencia de glicerol a través del tiempo en condiciones de hipotermia (4°C).



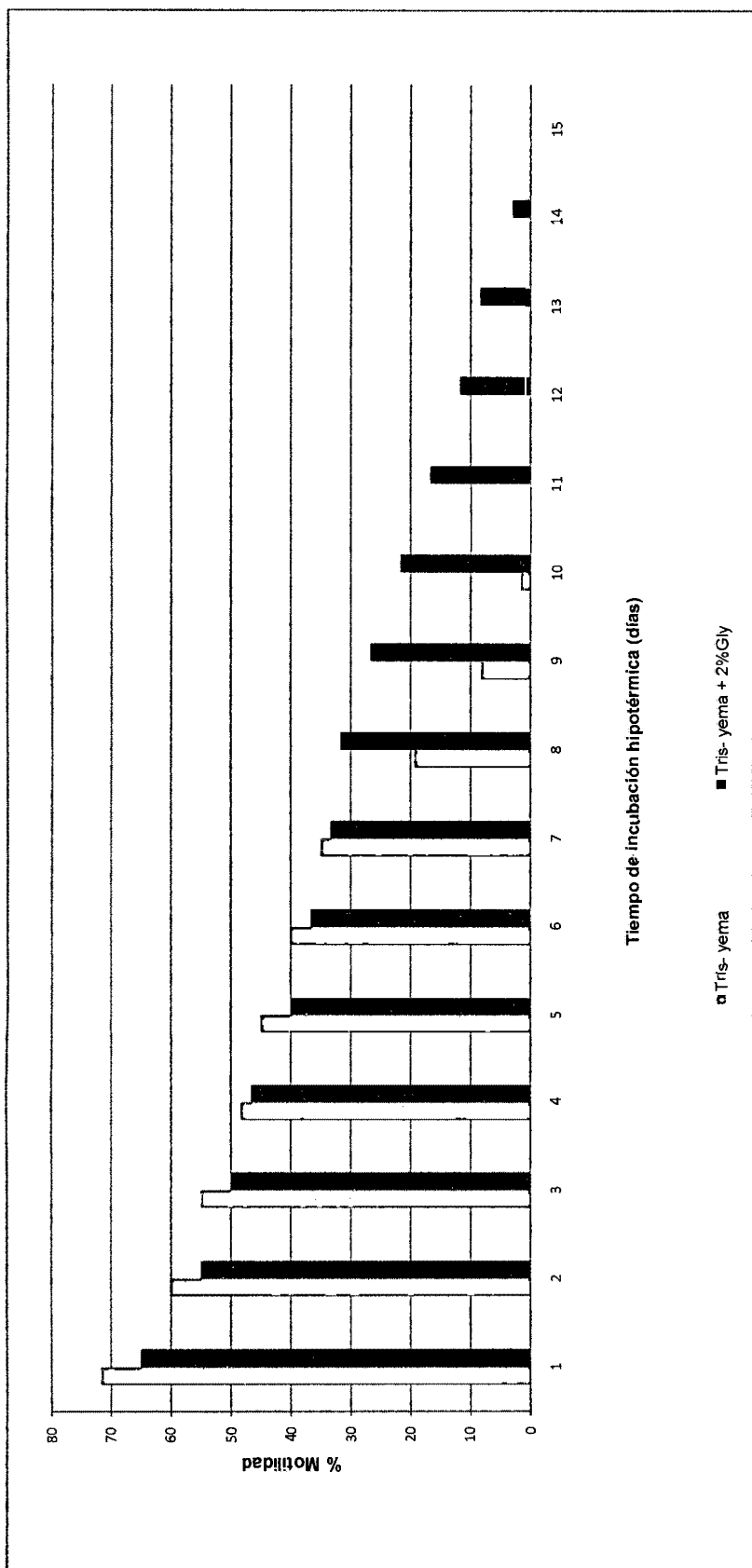
NOTA: DMSO = Dimetilsulfóxido, ETY = Etilenglicol

Gráfico Nº 02.- Variación del porcentaje de supervivencia espermática de cuyes a distintas concentraciones de DMSO y etilenglicol a través del tiempo en condiciones de hipotermia (4°C).



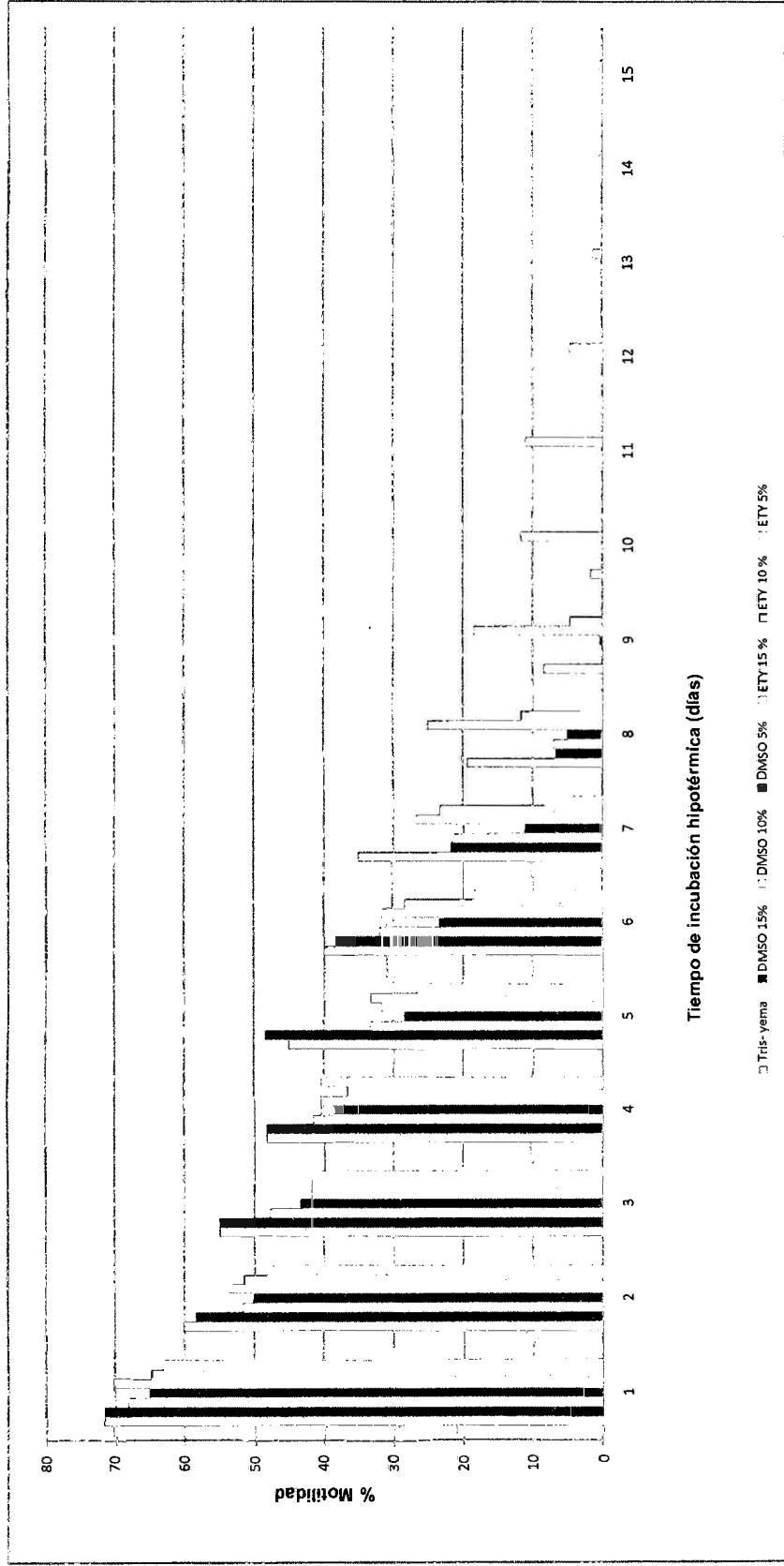
NOTA: DMSO = Dimetilsulfóxido, ETY = Etilenglicol, GLY = Glicerol

Gráfico N° 03.- Variación del porcentaje de supervivencia espermática de cuyes a distintas concentraciones de DMSO + 2 %GLY y etilenglicol + 2 %GLY a través del tiempo en condiciones de hipotermia (4°C).



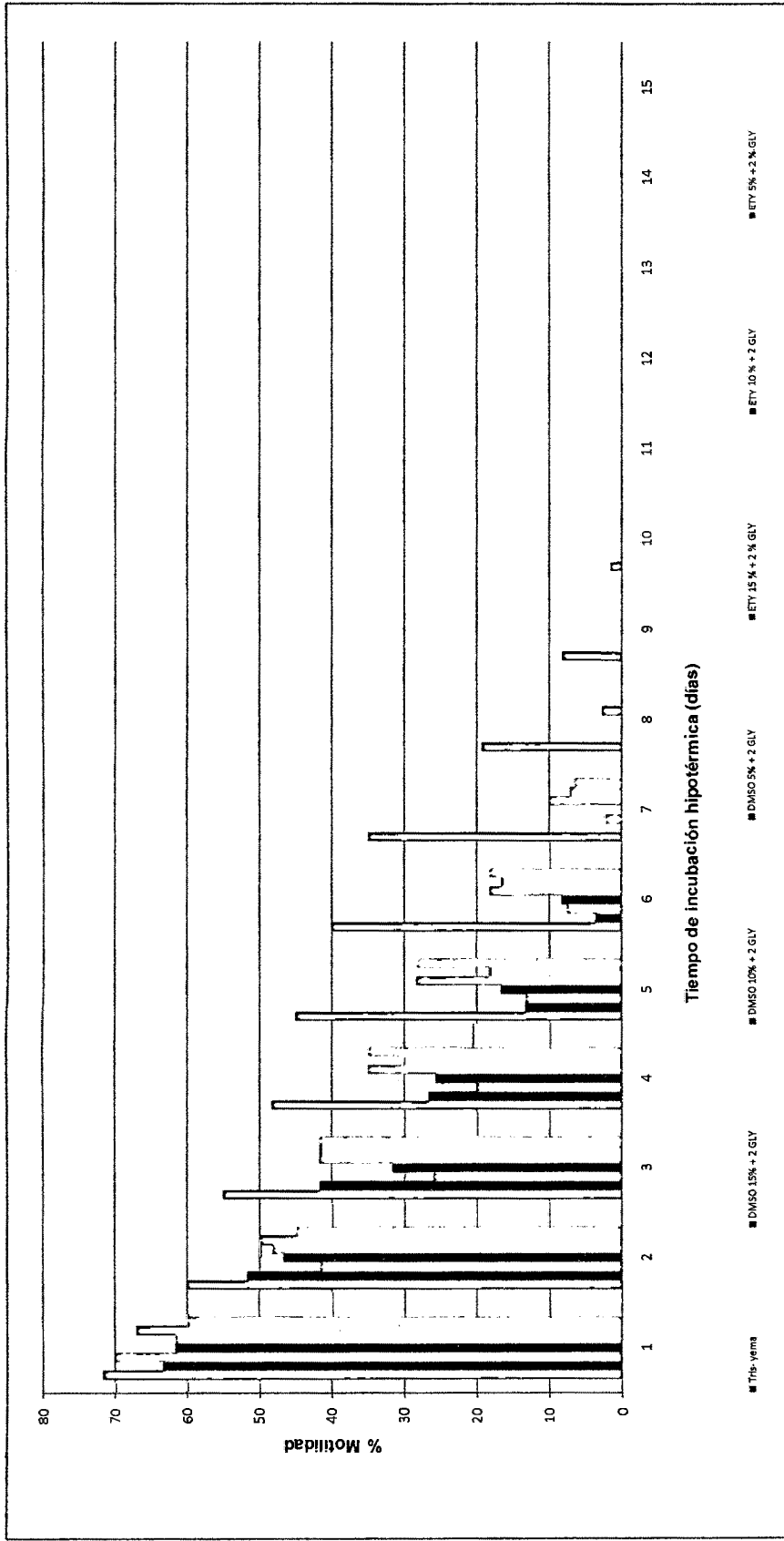
NOTA: GLY = Glicerol.

Gráfico N° 04.- Variación del porcentaje de motilidad de espermatozoides obtenidos del epidídimo de cuyes en presencia de glicerol a través del tiempo en condiciones de hipotermia (4°C).



NOTA: DMSO = Dimetilsulfóxido, ETY = Etilenglicol

Gráfico N° 05.- Variación del porcentaje de motilidad de espermatozoides obtenidos del epidídimo de cuyes a distintas concentraciones de DMSO y etilenglicol a través del tiempo en condiciones de hipotermia (4°C).



NOTA: DMSO = Dimetilsulfóxido, ETY = Etilenglicol, GLY = Glicerol

Gráfico N° 06.- Variación del porcentaje de motilidad de espermatozoides obtenidos del epididimo de cuyes a distintas concentraciones de DMSO + 2% GLY y etilenglicol + 2% GLY a través del tiempo en condiciones de hipotermia (4°C).

CUADRO N° 01: COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA DEL CUY ANTES Y DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN (a - 196°C) EN DIFERENTES CRIOPROTECTORES.

AGENTE CRIOPROTECTOR		MOTILIDAD (%)	
		Pre- congelación	Post- congelación
Glicerol (un paso)		60.00 +/- 5.48	2.83 +/- 1.47 ^a
Glicerol (dos pasos)		60.83 +/- 9.70	2.00 +/- 1.27 ^a
Glicerol (30')		63.33 +/- 9.94	3.00 +/- 1.65 ^a
DMSO:	DMSO al 5 %	65.00 +/- 4.47	0.83 +/- 0.41 ^b
	DMSO al 10 %	68.33 +/- 2.58	0.83 +/- 0.41 ^b
	DMSO al 15 %	57.50 +/- 6.89	2.67 +/- 1.21 ^a
DMSO + 2% Glicerol:	DMSO al 5 %	66.67 +/- 5.16	1.33 +/- 1.37 ^b
	DMSO al 10 %	60.00 +/- 8.37	1.83 +/- 2.04 ^{ab}
	DMSO al 15 %	57.00 +/- 6.33	3.40 +/- 1.35 ^a
Etilenglicol:	ETY al 5 %	60.83 +/- 5.85	1.17 +/- 1.60 ^a
	ETY al 10 %	59.17 +/- 7.36	0.17 +/- 0.41 ^a
	ETY al 15 %	61.67 +/- 6.83	0.67 +/- 0.52 ^a
Etilenglicol + 2%Glicerol:	ETY al 5 %	54.17 +/- 4.92	2.67 +/- 1.63 ^a
	ETY al 10 %	56.67 +/- 7.53	0.50 +/- 0.55 ^a
	ETY al 15 %	64.71 +/- 8.50	2.29 +/- 2.56 ^a

Se consideraron de 6-10 muestras por cada grupo.

^{a,b} Valores con diferente literal dentro de grupos, existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$)

CUADRO N° 02: PORCENTAJE DE INTEGRIDAD DE MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES DE CUY (Prueba de Shock Hipo-osmótico – HOST) ANTES Y DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN (a-196°C) EN DIFERENTES CRIOPROTECTORES.

AGENTE CRIOPROTECTOR		INTEGRIDAD DE MEMBRANA (%)	
		Pre- congelación	Post- descongelaón
Glicerol (un paso)		60.50 +/- 6.66	6.33 +/- 2.66 ^a
Glicerol (dos pasos)		57.83 +/- 7.83	4.33 +/- 2.07 ^a
Glicerol (30')		59.30 +/- 9.17	9.83 +/- 8.59 ^a
DMSO:	DMSOal 5 %	58.17 +/- 8.13	1.33 +/- 0.52 ^b
	DMSOal 10 %	64.17 +/- 9.95	1.50 +/- 0.55 ^b
	DMSOal 15 %	50.00 +/- 2.19	6.83 +/- 3.19 ^a
DMSO+ 2% Glicerol:	DMSOal 5 %	55.00 +/- 6.63	4.17 +/- 1.47 ^a
	DMSOal 10 %	65.00 +/- 8.46	13.17 +/- 11.92 ^a
	DMSOal 15 %	54.45 +/- 6.25	10.70 +/- 6.96 ^a
Etilenglicol:	ETYal 5 %	46.67 +/- 1.97	4.00 +/- 1.79 ^a
	ETYal 10 %	53.50 +/- 7.99	2.42 +/- 2.18 ^{ab}
	ETYal 15 %	70.17 +/- 7.57	0.67 +/- 1.03 ^b
Etilenglicol + 2% glycerol:	ETY al 5 %	55.17 +/- 6.56	9.17 +/- 3.19 ^a
	ETYal 10 %	56.33 +/- 4.68	8.00 +/- 2.28 ^a
	ETYal 15 %	61.86 +/- 12.85	8.43 +/- 8.72 ^a

Se consideraron de 6-10 muestras por cada grupo.

^{a,b} Valores con diferente literal dentro de grupos, existe diferencia estadística significativa (p>0.05)

CUADRO N°03: PORCENTAJE DE INTEGRIDAD DE MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES DE CUY (Prueba del Agua – WT) ANTES Y DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN (a-196°C) EN DIFERENTES CRIOPROTECTORES.

AGENTE CRIOPROTECTOR		INTEGRIDAD DE MEMBRANA (%)	
		Pre- congelación	Post- descongela ción
Glicerol (un paso)		59.50 +/- 6.98	6.00 +/- 2.28 ^a
Glicerol (dos pasos)		57.33 +/- 6.86	4.67 +/- 1.63 ^a
Glicerol (30')		58.10 +/- 10.00	8.93 +/- 7.60 ^a
DMSO:	DMSO al 5 %	59.00 +/- 8.15	1.42 +/- 0.49 ^a
	DMSO al 10 %	63.67 +/- 9.77	1.58 +/- 0.80 ^b
	DMSO al 15 %	50.50 +/- 2.43	7.50 +/- 4.46 ^b
DMSO + 2% Glicerol:	DMSO al 5 %	56.17 +/- 6.97	3.83 +/- 1.60 ^a
	DMSO al 10 %	60.17 +/- 10.05	12.75 +/- 12.07 ^a
	DMSO al 15 %	56.20 +/- 6.36	10.45 +/- 7.26 ^a
Etilenglicol:	ETY al 5 %	47.50 +/- 1.87	4.50 +/- 1.05 ^a
	ETY al 10 %	54.00 +/- 7.56	2.33 +/- 1.37 ^b
	ETY al 15 %	69.50 +/- 9.09	1.00 +/- 0.89 ^b
Etilenglicol + 2% glycerol:	ETY al 5 %	56.00 +/- 4.98	9.50 +/- 3.02 ^a
	ETY al 10 %	58.17 +/- 7.57	8.17 +/- 3.31 ^a
	ETY al 15 %	62.00 +/- 12.82	9.00 +/- 7.46 ^a

Se consideraron de 6-10 muestras por cada grupo.

^{a,b} Valores con diferente literal dentro de grupos, existe diferencia estadística significativa ($p > 0.05$)

Evaluación de la reacción del acrosoma *in vitro* de espermatozoides epididimarios de cuy pre-congelación y post-descongelación.

La reacción del acrosoma se evaluó bajo condiciones *in vitro*, se realizó la evaluación pre-congelación y post-descongelación, para la primera condición, tras un proceso de incubación en medio SM bajo aceite mineral por espacio de dos horas, se observó la reacción del acrosoma mediada por la adición de imidazol 10 mM, obteniéndose un promedio de 62.30% de espermatozoides reaccionados, sin embargo; los espermatozoides post-descongelación no experimentaron dicho proceso.

V. DISCUSIÓN

Los espermatozoides de cuy pueden ser obtenidos de diversos modos, Holt (1977), obtuvo semen del género *Cavia* mediante la técnica de electroeyaculación obteniendo 13×10^6 espermatozoides /eyaculado, $n = 2$, en otros experimentos se obtuvo entre $50 \times 10^5 - 20 \times 10^6$ esp/ml con un volumen entre 0.4 – 0.8 ml. (Hafez y Hafez, 2000), pero generalmente se obtienen espermatozoides del epidídimo de animales bajo anestesia o *post mortem*, los cuales se mantienen viables por largos periodos. Gonzáles (1988), obtuvo un promedio de 25×10^7 esp/ml por cauda mediante incisión de la misma. En el presente trabajo a través del lavado retrógrado de la cauda epididimaria se obtuvieron espermatozoides tanto del conducto deferente como de la región distal de la cauda epididimaria, en una concentración que osciló entre los $10 \times 10^6 - 30 \times 10^7$ esp/ml, considerando la aleatoriedad de las muestras obtenidas en base al peso, edad, raza, actividad sexual, siendo estos espermatozoides móviles y presentando una agrupación característica de la especie denominada "rouleux" que quiere decir apilamiento (Figura N° 02, anexo).

En el cuy, la agrupación de los acrosomas en rouleux donde los espermatozoides aparecen más uniformes, puede estar relacionada con la protección de los acrosomas frágiles que sufren variaciones durante el paso por el epidídimo y sobre la posibilidad de ser perdido por el estímulo de un ionóforo (Hunnicut et al., 1997), esta agrupación de espermatozoides está mediada por

una proteína de superficie (WH-30) que está presente en los espermatozoides testiculares, pero dicha asociación sólo ocurre durante el paso por el epidídimo, pudiendo deberse a un cambio en la conformación de la proteína o una interacción con la secreción epididimal (Flaherty et al., 1993).

Guerrero (2006), refiere que mediante el "flushing" o lavado de flujo retrógrado se evidencia menos contaminación, referida a la mezcla de células sanguíneas, tejido y microorganismos, de tal modo que durante nuestros ensayos, durante el tiempo transcurrido en condiciones hipotérmicas (4°C), a pesar de que el dilutor base que se utilizó tenía en su composición un componente orgánico, la yema de huevo a un 20 % de concentración, no experimentó contaminación sobre todo a nivel microbiano.

La determinación de la supervivencia espermática en soluciones crioprotectoras mantenidos en hipotermia (4°C), se realizó con el fin de monitorear la variación de la motilidad y la supervivencia espermática (Figura N° 03, anexo) cuando estos se mantienen en un dilutor base en contacto con los diferentes agentes crioprotectores en condiciones de hipotermia (4°C), obteniéndose espermatozoides de cuy pueden permanecer fuera del epidídimo por periodos prolongados de tiempo.

Vivanco y col. (1977), hicieron referencia de la supervivencia espermática en tris glicerinado hasta por 15 días, en nuestro estudio mediante la evaluación en medios compuestos de un dilutor base más yema de huevo al 20 % que se utilizó como control se mantiene la motilidad con 1.67% (Gráfico N° 04) y 3% de supervivencia espermática al décimo día (Gráfico N° 01) y esta supervivencia puede ser prolongada cuando se añaden crioprotectores como son el glicerol al 2% manteniendo una motilidad de 3% hasta el décimo cuarto día (Gráfico N° 04) y 3.5 % de supervivencia espermática hasta décimo quinto día (Gráfico N° 01) y

el etilenglicol al 15 % manteniendo 1% de motilidad (Gráfico N° 05) y 0.33% de supervivencia espermática hasta el décimo quinto día (Gráfico N° 02).

En espermatozoides de ratas se observó que la adición en un paso, es decir la adición del crioprotector a temperatura ambiente, el DMSO 0.9 M presenta el efecto más nocivo sobre la motilidad espermática, integridad de membrana y la integridad acrosomal con respecto al etilenglicol, glicerol y propilenglicol a la misma concentración (Si et al., 2006), debido a la alta capacidad de difusión a través de las membranas celulares, por ello al mantener los espermatozoides de cuy en incubación hipotérmica tanto del DMSO y etilenglicol más la adición de glicerol, la supervivencia se ve drásticamente disminuida (Gráfico N° 03), así como la motilidad (Gráfico N° 06).

González (1988), refiere que los espermatozoides pueden ser mantenidos en las caudas del epidídimo bajo condiciones de hipotermia (4°C) hasta por 14 días, pero que la dilución por la inmersión de las caudas en medio acuoso influye directamente sobre la célula, pudiendo ser revertida al agregar plasma de la cauda epididimal como se observa en espermatozoides de epidídimo de hámster *in vitro*, debido a los factores de supervivencia espermática que se encuentran en este fluido (Morton et al., 1979). De acuerdo a lo mencionado se pone en evidencia que los espermatozoides de cuy pueden ser almacenados en condiciones de hipotermia fuera o en el epidídimo.

Para determinar el efecto de la congelación en la viabilidad de los espermatozoides de cuy, se tuvo en consideración como fue la variación con respecto a la motilidad individual, integridad de membrana y la reacción del acrosoma antes y después de la congelación.

la capacitación, inducidos por los procesos de congelación en la célula espermática (Stornelli, 2005).

En especies como el conejo (Strazinger et al., 1971; Alvarino, 1993; El-Gaafary and Marai, 1994), el elefante (Jones, 1973) el DMSO es el agente crioprotector de elección, en el presente estudio cuando se usó este crioprotector a diferentes concentraciones, se observó que el espermatozoide de cuy a una concentración de 15 % de DMSO presentó una motilidad de 2.67 +/- 1.21 % habiendo diferencia significativa (ANVA, Test de Duncan, $p < 0.05$) con respecto a los tratamientos en los que se utilizó concentraciones de 5 y 10 % de DMSO (Cuadro N° 01), siendo la más baja entre los tratamientos en estudio, lo que implica y resalta la toxicidad de este crioprotector sobre la célula espermática de cuy.

La motilidad espermática para los tratamientos en los que se usó la combinación DMSO + 2% GLY, a 15 % de DMSO se observó 3.40 +/- 1.35 % de motilidad que presenta diferencia significativa (ANVA, Test de Duncan, $p < 0.05$), con respecto a los tratamientos en los que se utilizó concentraciones de 5 y 10 % de DMSO (Cuadro N°01) y que a su vez es mayor con respecto a la utilización de sólo el DMSO como agente crioprotector, sin embargo la motilidad espermática se ve severamente afectada.

Al usar el etilenglicol como agente crioprotector no se observó diferencias significativas frente al uso de diferentes concentraciones de este crioprotector, obteniéndose una motilidad promedio de 0.67 % de la población espermática (ANVA, Test de Duncan, $p > 0.05$), (Cuadro N°01), cuando se usó el etilenglicol + 2 % GLY, a diferentes concentraciones de etilenglicol como agente crioprotector no se observaron diferencias significativas dentro del grupo (ANVA, Test de Duncan, $p > 0.05$), obteniéndose una motilidad promedio de 1.84 % del total de la

población espermática (Cuadro N°01), pero la motilidad es mayor con respecto a la utilización de etilenglicol en ausencia de glicerol.

De acuerdo a los tratamientos realizados la motilidad observada al descongelar las muestras y mantenerlas a 37°C para los distintos tratamientos fue de 3 – 2.83 % que fue el mejor resultado, obtenido en el medio que contenía glicerol al 2 % sin encontrarse diferencias significativas (ANVA, Test de Duncan, $p > 0.05$), si éste crioprotector era añadido en un solo paso o 30 minutos antes de la congelación, y la menor motilidad observada entre los tratamientos en experimentación fue de 0.67% cuando se usó etilenglicol (Cuadro N°01).

Al hacer una comparación y analizar la sobrevivencia espermática en condiciones de hipotermia (4°C) se aprecia que los espermatozoides de cuy se mantienen mótils por largos períodos y los crioprotectores permiten incrementar su supervivencia hasta por 15 días en el caso del glicerol y el etilenglicol, sin embargo al someterlos al proceso de congelación la supervivencia se ve muy afectada, por tanto es una etapa crítica que afecta directamente la vitalidad espermática.

En toros el efecto de la exposición de los espermatozoides epididimarios al plasma seminal antes de la criopreservación fue evaluado y demostrado que causa un efecto benéfico sobre la mayoría de características espermáticas incluyendo motilidad progresiva, protección contra las anomalías morfológicas derivadas del proceso de congelación (Guerrero, 2006), posiblemente sea un factor que pueda contribuir a mejorar la supervivencia espermática en espermatozoides de cuy.

Frecuentemente durante el proceso de congelación – descongelación se pierde aproximadamente el 50 % de la población inicial de espermatozoides debido a

los efectos de la criopreservación sobre las membranas, citoesqueleto, aparato motor y núcleo del espermatozoide; pero se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (Watson, 1995), debido a que en los procesos de congelación se pierde la fluidez de sus compuestos lipídicos, alterando sus funciones y otorgándole un alto grado de fragilidad durante la deshidratación celular (Seidel, 2006), por lo que la lesión celular producida se explica en función de la formación de hielo intracelular y el estrés osmótico al que se ven sometidas las membranas celulares durante la congelación (Ávila y col., 2006).

La integridad de membrana fue analizada al inicio de cada tratamiento mediante dos técnicas: la Prueba de Shock Hipo-Osmótico (HOST) y la Prueba del Agua (WT), que osciló entre 46.67 – 70.17% (Cuadro N°02) y 47.50 – 69.50 % (Cuadro N°03) respectivamente, observándose que para los distintos tratamientos se utilizó muestras casi uniformes; el rango en el que oscilaron los valores de integridad de membrana pudo deberse a la alta variación entre individuos y posiblemente a la madurez sexual de los mismos, debido a que al momento de la recolección de la muestra se aprovecharon las oportunidades de beneficio de los cuyes.

Los resultados post-descongelación muestran que al utilizar el glicerol, añadido de tres maneras distintas, glicerol (un paso), glicerol (dos pasos), glicerol (30 min.), no representa diferencias significativas dentro del tratamiento (ANVA, Test de Duncan, $p > 0.05$), obteniéndose 9.83 % analizado mediante el HOST y 8.93 % con el WT como el valor más alto obtenido para integridad de membrana cuando el glicerol fue añadido 30 minutos antes de la congelación, en este caso el proceso de dilución con el glicerol de diferentes formas no fue significativo que

contrariamente es beneficiosa en algunos casos como una alternativa para minimizar el estrés osmótico asociado con la adición de crioprotectores permeantes (Gao et al. , 1995).

Entre los tratamientos en los que se utilizó DMSO, a una concentración de 15% se obtuvo mejores resultados para integridad de membrana mediante HOST, siendo 6.83% (Cuadro N°02) y WI siendo 7.50% (Cuadro N°03), habiendo diferencia significativa (ANVA, Test de Duncan, $p < 0.05$) con respecto a los tratamientos en los que se utilizó concentraciones de 5 y 10% de este crioprotector, pero al evaluar la integridad de membrana espermática para los tratamientos en los que se usó la combinación DMSO +2% GLY, no presentó diferencias significativas dentro de los tratamientos; sin embargo, se observa que al utilizar una concentración de 10% de DMSO se obtiene 13,17% y 12,75% de integridad de membrana mediante el uso de las técnicas de HOST y WT respectivamente (Cuadros N°02-03), lo cual evidencia que las combinaciones de agentes crioprotectores penetrantes fue ejercer un efecto protector mayor sobre la célula espermática, que sin embargo no es evidenciado en la motilidad de las mismas.

Al usar el etilenglicol como agente crioprotector se observan los mejores resultados para integridad de membrana cuando se usó 5% de este crioprotector obteniéndose 4% de integridad de membrana mediante el HOST (Cuadro N°02) y 4.5 % de integridad de membrana mediante el WT (Cuadro N°03), habiendo diferencias significativas (ANVA, Test de Duncan, $p < 0.05$), dentro del tratamiento con respecto a las concentraciones de 10 y 15 %. Cuando se usó la combinación etilenglicol + 2% GLY, no se observaron diferencias significativas dentro del grupo ($p > 0.05$), pero se obtuvo mayor porcentaje de integridad de membrana

9.17 % y 9.50 % mediante HOST y WT, cuando se usó 5 % de etilenglicol (Cuadros N°02-03).

El –Gafarry and Marai (1994), refieren que en el caso de congelación de espermatozoides de conejo es aconsejable utilizar una combinación de 8% DMSO + 2% GLY ya que cuando no se usa el glicerol resulta ser perjudicial. En el caso de los espermatozoides de cuy la utilización de combinaciones de DMSO + 2 % glicerol y etilenglicol + 2 % de glicerol presentaron diferencias significativas con respecto al uso de un solo agente crioprotector para mantener la integridad de membrana (ANVA, test de Duncan, $p < 0.05$, Cuadros N°02-03); sin embargo, no se observa el mismo efecto sobre la motilidad espermática bajo condiciones de congelación en nitrógeno líquido.

Con respecto a las técnicas utilizadas para evaluar la integridad de membrana, cuando se utilizó el HOST se obtuvo 9.83% de integridad de membrana como mejor tratamiento, obtenido en el medio que tenía glicerol al 2 % añadido 30 minutos antes de la congelación, encontrándose diferencias significativas (ANVA, Test de Duncan, $p < 0.05$), dentro de los tratamientos en los que se utilizó sólo el glicerol como crioprotector. El porcentaje mas bajo de integridad de membrana obtenido fue de 2.36% que se obtuvo al utilizar el etilenglicol y 3.22 % al utilizar sólo DMSO (Cuadro N°02); sin embargo, cuando se utilizó el WT se obtuvo que los ensayos que mantenían una mejor integridad de membrana fueron el DMSO + 2% GLY, Glicerol (30'), etilenglicol + 2 % GLY con 9.27 %, 8.93%, 8.89%, respectivamente, en tanto que los porcentajes más bajos se obtuvieron al utilizar el etilenglicol y el DMSO con 2.61% y 3.50% respectivamente, por lo que se encontró diferencias significativas entre tratamientos (ANVA, Test de Duncan, $p < 0.05$) (Cuadro N°03).

Adicionalmente al realizar la comparación entre dos técnicas para la determinación de la integridad de membrana el HOST y el WT se encontró una correlación positiva de 0.906 para muestras frescas y de 0.971 para muestras post-descongelamiento, siendo el WT una técnica más rápida y fácil de realizar para determinar uno de los parámetros de la calidad espermática ($p > 0.05$, t-student). Similares resultados de una buena correlación se han obtenido en humanos (Bahamondes et al., 2001; Fuse et al., 1993; Lin et al., 1998), ratones (Sliwa et al., 1993), macho cabrío (Nur et al., 2005), perros, usando espermatozoides epididimarios (Hishinuma and Sekine, 2003), encontrándose en la mayoría de los casos una buena correlación entre ambas técnicas, sin embargo es necesario realizar mas estudios para validar este test de vitalidad espermática.

Un factor importante y determinante durante el proceso de congelación es el constante cambio que sufre la membrana del espermatozoide desde la maduración durante el paso por el epidídimo hasta que finalmente haya fecundado al ovocito, estos cambios están relacionados con la permeabilidad al agua del espermatozoide. En el testículo los espermatozoides presentan una permeabilidad diferente a los que se encuentran en el eyaculado (Elder and Dale, 2000), este punto es referido debido al uso de la yema de huevo, ya que es ampliamente utilizado como dilutor para semen (Benson et al., 1967) y que en el caso de espermatozoides epididimarios funciona en condiciones de hipotermia (Gráfico N° 01) manteniéndolos hasta 9 días, pero para la congelación no es recomendable su uso según Elder and Dale (2000), además ellos plantean en el caso de humanos el uso de una solución que contenga 8 % de glicerol en buffer fosfato suplementado con Albúmina de Suero Humano (HSA) al 3% y el

equivalente de este último en animales podría ser la Albúmina de Suero Bovino (BSA).

La evaluación de la reacción del acrosoma como parámetro de la evaluación de la adquisición de la capacidad fecundante de espermatozoides, es esencial, existen diversos reactivos que inducen la reacción acrosómica del cuy *in vitro* como detergentes (Yanagimachi, 1975), ionóforos como el A – 23187 (Green, 1978) y esta puede ser observada en espermatozoides vivos (Barros et al., 1984) por las características morfológicas del gameto.

Se observó la reacción del acrosoma tras una pre-incubación en medio SM a 37 °C bajo aceite mineral y la sucesiva adición de 10 mM de imidazol donde se obtuvo 62.30 +/- 8.96 % de espermatozoides reaccionados, en comparación a 77.46 +/- 5.75 obtenido por Gonzáles (1988). Fue menor posiblemente debido a la madurez fisiológica de los espermatozoides obtenidos tras el lavado retrógrado. La función del imidazol según Gonzáles (1988), sería el acondicionar un entorno adecuado para favorecer el ingreso de Ca^{+2} extracelular al interior del citosol espermático y no se comportaría como un activador de la fosfodiesterasa como lo propone Santos y Gordon (1980), además en el proceso de capacitación de espermatozoides frescos se observó aglutinación que no necesariamente requiere de Ca^{2+} o Mg^{2+} , pero sí contribuyen a un aumento vigoroso de la motilidad (Singh et al., 1978).

Al descongelar las células espermáticas no se logró evaluar la reacción acrosómica post-descongelación por la baja tasa de supervivencia espermática tras este proceso, sin embargo al observar las células espermáticas se apreció que perdieron el acrosoma tras el proceso de congelación- descongelación, posiblemente porque la congelación halla inducido una capacitación prematura

debido a que existe gran similitud entre los cambios ocurridos durante el enfriamiento y la reacción acrosómica, es así que la primera comienza como una versión desorganizada de la segunda (Spungin et al., 1995), en consecuencia la permeabilidad de la membrana aumenta con el enfriamiento, por lo tanto la regulación del calcio se ve afectada (Robertson et al., 1990) y la absorción de calcio durante el enfriamiento posibilita que ocurran cambios relacionados con el proceso de capacitación (Watson, 1995) como la fusión entre membrana plasmática y la capa externa de la membrana acrosomal. Fleming and Yanagimachi (1981), refieren que cuando los ácidos grasos se unen al glicerol se altera el equilibrio de los fosfolípidos de la membrana aumentando notablemente los lisofosfolípidos, los cuales se ha comprobado que desencadenan la reacción acrosómica en el cuy.

Hasta ahora la fertilidad que se logra con semen congelado es aún inferior con respecto al semen fresco, este hecho está relacionado con los daños subletales instaurados en la población espermática que sobrevive al proceso de descongelación. Diversos factores como son: shock de frío, velocidad de enfriamiento, composición de los diluyentes y estrés osmótico, son responsables de la disminución de la fertilidad de semen congelado (Stornelli et al., 2005). Se sabe además que la peroxidación lipídica está relacionada con la disminución en la motilidad espermática y la muerte celular, durante el proceso de criopreservación se presenta un incremento significativo en los niveles de especies reactivas de oxígeno que también estarían produciendo la capacitación espermática prematura y la exocitosis del acrosoma por lo que se podría añadir antioxidantes. Ruiz (2005), sugiere la utilización de Tempo 0.5 mM al finalizar la fase de enfriamiento al medio de dilución el que mejora la calidad de semen ovino criopreservado.

Por tanto, el efecto de la congelación en la viabilidad de espermatozoides epididimarios de *Cavia porcellus* "cuy", implica una serie de cambios drásticos los que se apreciaron mediante la evaluación de distintos parámetros, a nivel de motilidad se observó que tras el proceso de congelación se obtuvo 3% de motilidad usando como agente crioprotector el glicerol al 2%. Para la evaluación de la integridad de membrana se utilizó el HOST y WT, mediante el HOST se obtuvo un 9.83% usando como crioprotector el glicerol al 2 %, mientras que al ser evaluado por el WT, se obtuvo 9.27% de integridad de membrana cuando se usó DMSO + 2% de glicerol, a su vez 8.93% cuando se usó glicerol al 2% y 8.89 % cuando se empleó etilenglicol + 2% de glicerol, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre estas.

Cabe resaltar que la reacción del acrosoma no pudo evidenciarse tras el proceso de congelación- descongelación bajo las condiciones en las que se trabajó, debido a la baja tasa de supervivencia de los mismos, causado posiblemente por los daños generados por los procedimientos *in vitro*, y el mismo proceso de congelación- descongelación.

Se concluye, que bajo los protocolos aquí desarrollados el proceso de congelación afecta drásticamente la viabilidad espermática del cuy, pero el mantenimiento a corto plazo de espermatozoides epididimarios en condiciones de hipotermia presenta mayor ventaja sobre los procesos de congelación – descongelación.

VI. CONCLUSIONES

1. La colección de espermatozoides epididimarios de cuy se logró realizar mediante la técnica de lavado retrógrado, aquí se obtuvo buena calidad espermática sin evidencias de contaminación cuando permanecía en condiciones de hipotermia (a 4°C) por periodos prolongados de tiempo.
2. La viabilidad de los espermatozoides epididimarios de cuy fue evaluada antes del proceso de congelación en base a la motilidad individual que osciló entre 54.17 - 68.33%, integridad de membrana 46.67 – 70.17% y reacción del acrosoma 52.24 – 78.79 %.
3. La viabilidad de los espermatozoides de cuy post descongelamiento se evaluó en base a la motilidad individual que osciló entre 3 – 0.67 % e integridad de membrana 9.83 – 2.36 %, la reacción del acrosoma no se observó debido a la baja tasa de supervivencia espermática. Por tanto, bajo las condiciones desarrolladas, la congelación en nitrógeno líquido a –196°C, afecta drásticamente la viabilidad espermática de los espermatozoides epididimarios de *Cavia porcellus* "cuy".
4. Los espermatozoides epididimarios de *Cavia porcellus* pueden ser mantenidos en condiciones de hipotermia, mediante el uso de dimetilsulfóxido al 15 % y Tris– Yema, quienes mantienen una supervivencia mayor al 50% después de cinco días de almacenamiento; posibilitando así su uso en programas de inseminación artificial para el mejoramiento genético del cuy.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar el proceso de criopreservación bajo la forma de pellets, es decir realizar una congelación rápida.
2. Evaluar distintos tiempos y temperaturas de descongelación.
3. Probar otros crioprotectores y diferentes concentraciones de los utilizados en el presente trabajo.
4. Evaluar el efecto de agentes crioprotectores no penetrantes tales como la rafinosa, trehalosa y la incorporación de agentes antioxidantes.
5. Evaluar el efecto que podría tener la adición de plasma seminal antes del proceso de criopreservación.
6. Evaluar el efecto de la criopreservación en espermatozoides del epidídimo, considerando la raza, estado de madurez fisiológica y sexual entre otros factores que afectan la reproducción de los cuyes.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aitken, J. (2000).** Possible Redox Regulation of sperm Motility Activation. *Journal Of Andrology* 21 :491-496
2. **Albers, M. y Barrios, D. (2006).** Movilidad individual de espermatozoides epididimarios de toros *post mortem* obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Trop.*, 24(3):267-280.
3. **Álvarez, C. (1993).** Utilización de diferentes niveles de maca en la fertilidad de cobayos. Tesis Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cerro de Pasco, Perú.
4. **Alvariño, M. (1993).** Control de la Reproducción en el Conejo. Ediciones Mundi Prensa. Madrid.
5. **Austin, CR. (1952)** The capacitation of sperm. *Nature* 170: 326
6. **Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J. y Requero, M. (2006).** Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología* Vol. 57 No. 4 pp 291 – 300.
7. **Bahamondes, L., Fazano, F., De Lucio, M., Neves, P., BottcherLuiz, F. and Lorenzetti, G. (2001).** Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and the hypoosmotic test. *Andrologia* 33: 75-77.
8. **Barros, C., Jedlicki, A., Bize, I. and Aguirre, E. (1984).** Relationship between the length of sperm preincubation and zona penetration in the golden hamster: A scanning electron microscopy study. *Gamete Res* 9: 31 –43.
9. **Benson, R., Pickett, B., Komarekm, R. and Lucas, J. (1967).** Effect of incubation and cold shock on motility of boar spermatozoa and their relationship to lipid content. *Journal of Animal Science* 26: 1078–1081.

10. **Berndtson, W. and Pickett, B. (1978).** Techniques for the cryopreservation and field handling of bovine spermatozoa. In: "The Integrity of Frozen Spermatozoa". Washington, DC.
11. **Chong, A. (1985).** Artificial insemination and sperm banking: clinical and laboratory considerations. *Semin. Reprod. Endocrinol.* 3:193–200.
12. **Cooper, T., Weydert, S., Yeung, C., Künzi, C. and Sachser, N. (2000).** Maturation of epididymal spermatozoa in the nondomesticated guinea pigs *Cavia aperea* and *Galea musteloides*. *Journal of Andrology.* 21: 154 –163.
13. **Cortés, S. (2003).** Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Tesis – UCM. Facultad de Ciencias Biológicas. España.
14. **Craft, I., Tsigotis, M., Bennett, V., Taranissi, M., Khalifa, Y., Hogewind, G. and Nicholson, N. (1995).** Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil. Steril.* 63:1038-1042.
15. **Day, J. and Stacey, G. (2007).** Cryopreservation and Freeze – Drying Protocols Second Edition. Humana Press. New Jersey – USA.
16. **Didion, B., Dabrinsky, J., Giles, J. and Graves, C. (1989).** Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res.* 22: 512 – 557.
17. **Eckert, R., Randall, D. and Auoustitne, O. (1989).** *Fisiología Animal.* Ed. McGraw-Hill Interamericana. México
18. **Elder, K. and Dale, B. (2000).** *In vitro* fertilization. Second edition. Cambridge University Press.
19. **El-Gaafary, M. and Marai, F. (1994).** Artificial Insemination .in Rabbits CIHEAM - Options Méditerranéennes. University, Zagazig, Egipto.
20. **Ellinton, J., Samper, J., Jones, A., Oliver, S., Brunett, K. and Wrigth, R. (1999).** *In vitro* interaction of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct (uterine tube) epithelial cells or their secretory products. *Anim. Reprod.* 56: 51 – 65.
21. **Fawcett, D. and Hollenberg, R. (1963).** Change in the acrosome of guinea pig spermatozoa during passage through the epididymis. *Zeitschrift für Zellforschung* 60, 276—292.
22. **Fiser, P. (1989).** Criobiology of gametes. En: "Forum Internacional sobre la Reproducción Animal". España.

23. **Fiser, P., Fairfull, R. and Marcus, G. (1986).** The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. *Cryobiology*. 23: 141-149.
24. **Flaherty, S. and Olson, E. (1988).** Membrane domains in guinea pig sperm and their role in the membrane fusion events of the acrosome reaction. *Anat. Rec.* 220: 267- 280.
25. **Flaherty, S., Swann, N., Primakoff, P. and Myles, D. (1993).** A role for the WH – 30 protein in sperm-sperm adhesion during rouleux formation in the guinea pig. *Dev. Biol.* 156: 243–252.
26. **Fleming, A. and Yanagimachi, R. (1981).** Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosoma reaction. *Gamete Res.* 4: 253 – 273.
27. **Foulkes, J. (1977).** The separation of lipoproteins from eggs yolk and their effect on motility and integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil* 49: 277–284.
28. **Fuse, H., Ohta, S., Sakamoto, M., Kazama, T. and Katayama, T. (1993).** Hypoosmotic Swelling Test with a Medium of Distilled Water. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 30: 111-116.
29. **Gao, D., Liu, J. and Liu, C. (1995).** Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod.* 10: 1109-1122.
30. **Gao, G., Ashworth, E., Watson, P., Kleinhans, F., Mazur, P. and Crister, J. (1993).** Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermatolysis. *Biol. Reprod.* 49, 112–123.
31. **García, J. y Vila, L. (1984).** Criopreservadores: concepto y manejo. *Biol. Clin. Hematol.* 6(4): 219-225.
32. **Gonzáles, H. (1988).** Análisis de la capacidad fértil del espermatozoide de cuy en función a la estabilidad territorial de la cauda del epidídimo. Tesis UNMSM. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima.
33. **Gonzáles, H. y Gonzáles, M. (2004).** Manual de Biotecnología Reproductiva. Universidad Ricardo Palma. Lima.

34. **González, H. y Llerena, G. (1981).** Supervivencia y Capacitación de espermatozoides de hámster y cuy. Resúmenes II Cong. IberoAmericano Biol. Cel. Abst. Pg.44.
35. **Graham, E. (1978).** Fundamentals of the preservation of spermatozoa. In: "The integrity of frozen spermatozoa". Washington, DC.
36. **Graham, E., Schmehl, M., Evensen, B. and Nelson, P. (1978).** "Semen preservation in non-domestic mammals". Svmp. Zool. Soc. Lond. 43: 153-173.
37. **Green, D. (1978).** The induction of the acrosome reaction in guinea pig sperm by the divalent metal cation ionophore A 23187. J. Cell. Set. 32, 137-151.
38. **Guerrero, C. (2006).** Cryopreservation and intracytoplasmic sperm a injection with bovine epididymal spermatozoa. A Dissertation B.S., Louisiana State University. The Interdepartmental Program of Animal and Dairy Sciences.
39. **Hafez, E. (1986).** Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. McGraw-Hill. México.
40. **Hafez, E., y Hafez, B. (2000).** Reproducción e Inseminación Artificial en animales. Séptima edición. Edit. McGrawHill. México.
41. **Hishinuma, M. and Sekine, J. (2003).** Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. J. Vet. Med. Sci. 65 (7):817-820.
42. **Hoffer, A. and Greenberg, J. (1978).** The structure of the epididymis, efferent ductules and ductus deferents of the guinea pig: a light microscope study. Anat Rec. 190: 659–678.
43. **Holt, W. (1977).** Postnatal development of the testes in the cuis, Galea musteloides. Lab Anim.11:87–91.
44. **Holt, W. (2000).** Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science 62: 3 – 22.
45. **Holt, W. and North, R. (1991).** Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. Journal Reproduction and Fertility 91: 451 – 461.
46. **Hunnicut, G., Koppel, D. and Myles, D. (1997).** Analysis of the process of localization of fertilin to the sperm posterior head plasma membrane

- domain during sperm maturation in the epididymis. *Dev. Biol.* 191: 146 – 159.
47. **INIA. (2004).** Perú: Primer informe nacional sobre la situación de los recursos zoogenéticos. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Lima.
 48. **Jeyendran, R., Van Der Ven,H., Perez-Pelaez,M., Grabo, B. and Zanaveld, L. (1984).** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relation ship other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219 – 228.
 49. **Jones, R. (1973).** Collection, motility and storage of spermatozoa from the African elephant, *Loxodonta Africana*. *Nature (London)*. 243: 38-39.
 50. **Jones, R. and Murdoch, R. (1996).** Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of Eutherian and marsupial mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 553-558
 51. **Leibo, S. and Brandley, L. (1999).** Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Gagnon, C. ed. *The male gamete*. Vienna II, Cache River Press. 501–516.
 52. **Leibo, S. (1981).** Conservación de ovocitos y embriones mediante congelación. *Avances en zootecnia. Nuevas técnicas de Reproducción Animal*. Ed. Acribia Zaragoza- España.
 53. **Lin, M., Morshedi, M., Srisombut, C., Nassar, A. and Oehninger, S. (1998).** Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin -Y staining. *Fertil. Steril.* 70: 1148- 1155.
 54. **Lomeo, A. and Glambersio, A. (1991).** "Water test": a simple method to assess sperm-membrane integrity. *Int. J. Androl.* 14: 278-282.
 55. **Martan, J. and Shepherd, B. (1973).** Spermatozoa in rouleux in the female genital tract. *Anat. Rec.* 175: 625 – 630.
 56. **Martan, J. and Hruban, Z. (1970).** Unusual spermatozoan formations in the epididymis of the flying squirrel (*Glaucomys volans*). *J. Reprod. Fertil.* 21:167 –170.
 57. **Martín, R., Marín, P. y Gonzalez, J. (2004).** Atlas de Anatomía de Animales Exóticos. Edit. Masson, España.

58. **Maxwell, W. (1986).** Artificial insemination of ewes with frozen – thawed semen at a synchronised oestrus I. Effects of the onset of oestrus ovulation and insemination on fertility. *An. Reprod. Sci.* 10: 301 – 308.
59. **Maxwell, W. y Evans, O. (1990).** Inseminación Artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia S.A. Madrid.
60. **Mazur P. (1980).** Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. En: 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Madrid.
61. **Mazur, P. (1984).** Freezing of living cells. Mechanism and implications. *Am J. Physiol* 147: 125– 142.
62. **Medina, V., Velasco, Y. and Cruz, P. (2005).** Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleosteos. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18: 34-48.
63. **Mizukami, A., Carrell, D. and Peterson, C. (1999).** Cryopreservation of embryos. En: *Encyclopedia of reproduction.* vol 1. Utah: Academic Press; Washington, DC.
64. **Morton, B., Fraser, C. and Albagli, L. (1979).** Studies on factors in hamster caudal epididymal plasma and other sources which inhibit sperm dilution damage. *Fertil. Steril.* Jul; 32(1):99-106.
65. **Nakatsukasa, E, Inomata, T., Ikeda, T., Shino, M. and Kashiwazaki, N. (2001).** Generation of live rat offspring by intrauterine insemination with epididymal spermatozoa cryopreserved at – 196 °C. *Journals of reproduction and Fertility* 122: 463 – 467.
66. **Noiles, E., Bailey, J. and Storey, B. (1995).** The temperature dependence in the hydraulic conductivity, L_{pp} , of the mouse plasma membrane shows a discontinuity between 4 and 0 °C. *Cryobiology.* 32: 220 – 238.
67. **Nur, Z., Dogan, I., Gunay, U., and Soylu, K. (2005).** Relationships between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of saanen goat bucks. *Bull Vet Inst Pulawy* 49: 183 – 187.
68. **Palma, G. (2001).** Biotecnología de la Reproducción.
69. **Patrizio, P. (2000).** Cryopreservation of epididymal sperm. *Molec. Cell Endocrinol.* 169: 11-14.
70. **Patrizio, P., Silber, S., Ord, T., Balmaceda, J. and Asch, R. (1988).** Two births after microsurgical sperm aspiration in congenital absence of vas deferens. *Lancet* 2:1364.

71. **Polge, C., Smith, A. and Parkes, A. (1949).** Revival spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164: 666 - 668
72. **Quinn, P., Chow, P. and White, I. (1980).** Evidence that phospholipids protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* 60: 403 – 407.
73. **Robertson, L., Baiey, J. and Buhr, M. (1990).** Effects of cold shock and phospholipase A₂ on intact spermatozoa and sperm head plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 143-149.
74. **Ruiz, L. (2005).** Efecto de dos antioxidantes (Tempo y Tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. Tesis UNMSM. Facultad de Medicina Veterinaria. Lima.
75. **Santos, J. and Gordon, M. (1980).** Induction of the acrosome reaction in guinea pig spermatozoa by cGMP analogues. *J. Cell Biology* 85: 798 – 803.
76. **Seidel, G. (2006).** Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 65: 228–235.
77. **Sheperd, B., Martan, J. and Murphy, R. (1974).** In vitro studies of guinea pig spermatozoa in rouleux. *Biol. Reprod.* 11: 470-474.
78. **Si, W., Benson, J., Men, H. and Critser, J. (2006).** Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*. 53: 336–348.
79. **Singh, J., Babcock, D. and Lardy, H. (1978).** Increased Calcium-Ion Influx is a Component of Capacitation of Spermatozoa. *Biochem. J.* 172: 549-556.
80. **Sliwa, L. (1993).** Usability of the hypoosmotic swelling “Water Test”, a simple method to assess sperm membrane integrity in mouse spermatozoa. *Folia Biol. (Krakow)* 41: 29-31.
81. **Songsasen, N., Betteridge, K. and Leibo, S. (1997).** Birth of five mice resulting from oocytes fertilized *in vitro* with cryopreserved spermatozoa. *Biol. Reprod.* 56(1): 143-152.
82. **Spungin, B., Maregalit, I. and Britbart, H. (1995).** Sperm exocytosis reconstructed in a cell free system. Evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membrane fusion. *J. Cell. Sci.* 108: 2525–2535.
83. **Stornelli, M., Tittarelli, C., Savignone, C. and Stornelli, M. A. (2005).** Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria* 25(2): 28 – 35.

84. **Strazinger, G, Maurer, R. and Pauffer, K. (1971).** Fertility of frozen rabbit semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, 24: 111-113.
85. **Thibault, C. Levasseur, M. and Hunter, R. (1993).** *Reproduction in mammals and man.* Editorial Ellipses.
86. **Vázquez, Y., Borque, C. y Díaz, C. (1998).** *Criobiología Aplicada a Reproducción Animal. Área de Reproducción Animal, Arch. Zootec.* 47: 357. Madrid.
87. **Vincent, C., Pruliere, G., Pajot, E., Champion, E. and Douzou, P. (1998).** Biophysical chemical aspects of cellular cryobehavior. *Biophys. Chem.* 29:161-69.
88. **Vivanco, W., Angeles, V., Muscari, J. y Chávez, J. (1977).** Colección evaluación y conservación del semen de cuy doméstico. Estación experimental Agropecuaria La Molina. APPA. Primera Reunión Científica Anual, Lima.
89. **Watson, P. (1981).** The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg – yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 62: 483-492.
90. **Watson, P. (1995).** Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post – thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 781 – 791.
91. **Watson, P. and Martin, I. (1975).** Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Abst. J. Biol. Sci.* 28:153 – 159.
92. **Watson, P. (1990).** Artificial insemination and the preservation of semen. En: *Lamming. GE Ed. Marshall's Physiology of Reproduction. 2: Reproduction in the Male.* Churchill Livingstone Edimburgo.
93. **World Health Organization (1993).** *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction.* 3rd edition Cambridge: Cambridge University. U.K.
94. **Yanagimachi, R (1975).** Acceleration of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa by detergent and other reagents. *Biol. Reprod.* 13: 519 - 526
95. **Yanagimachi, R. (1994).** *The Physiology of Reproduction, third edition.* Edit. Raven Press, New York – USA.

ANEXOS

**CUADRO N° 04: COMPOSICIÓN DEL DILUTOR BASE PARA
CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES**

Componentes	Cantidad
Tris(hydroxymethyl)- aminomethano	3.029 (g)
Acido cítrico	1.675 (g)
D-glucosa	1.250 (g)
Agua destilada	100 (ml)
Yema de Huevo	20 (mi)

Fuente: Alvaríño (1993).

Nota: Cuando se añaden los crioprotectores se debe restar el volumen de agua para enrasar a la misma cantidad.

**CUADRO N° 05: SOLUCIÓN HIPO-OSMÓTICA (HOS) PARA LA
EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE MEMBRANA DE
ESPERMATOZOIDES**

Componentes	Cantidad (g/L)
Citrato de sodio	7.35
Fructosa	13.51

Fuente: Gonzáles y Gonzáles (2004).

CUADRO Nº 06: SOLUCIÓN DE EOSINA AL 2 %, PARA TINCIÓN DE VITALIDAD ESPERMÁTICA

Componente	Cantidad
eosina	0.2 (g)
citrato de sodio dihidratado	0.3 (g)
agua destilada	10,0 (ml)

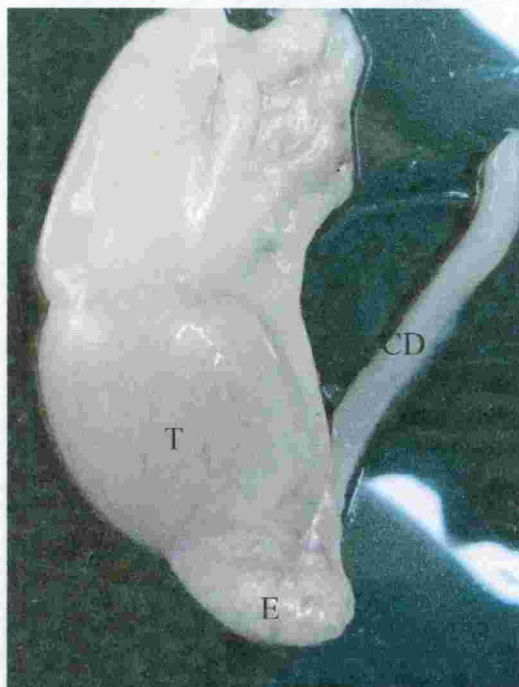
Fuente: Palma (2001).

**CUADRO Nº 07. COMPOSICIÓN DEL MEDIO SAN MARCOS (SM), PARA
CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA E INDUCCIÓN DE LA REACCIÓN DEL
ACROSOMA**

Componentes	SM(mM)
NaCl	113.69
KCL	5.34
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1.76
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1.03
NaH ₂ PO ₄	0.3
NaHCO ₃	11.89
Piruvato - Na	22.13
D-Glucosa	5.56

Fuente: Gonzáles (1988).

FIGURA Nº 01: FOTOGRAFÍA DEL TESTÍCULO DE CUY Y TÉCNICA DE LAVADO RETRÓGRADO.

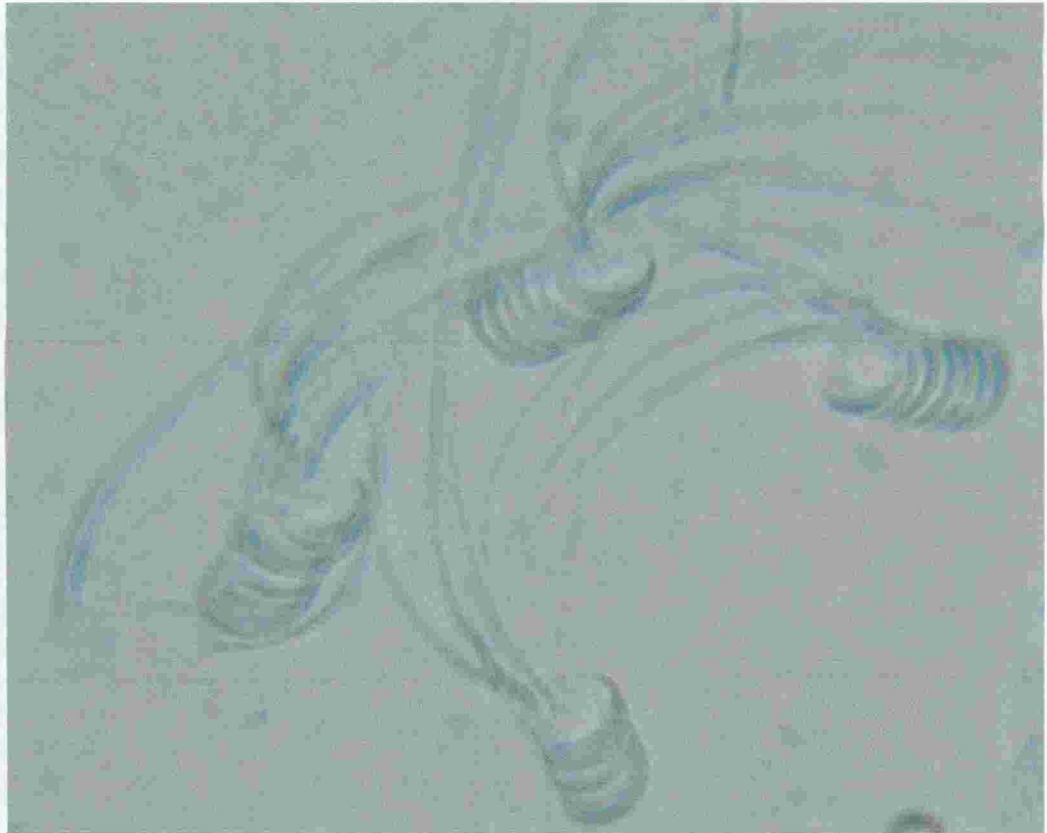


(A) Estructuras gonadales: Testículo (T), epidídimo (E) y conducto deferente (CD) de cuy.



(B) Colección de espermatozoides mediante lavado retrógrado de la cauda epididimal.

FIGURANº 02: FOTOGRAFÍA DE ESPERMATOZOIDES DE CUY MOSTRANDO LA ASOCIACIÓN TÍPICA DENOMINADA “ROULEUX”.



FIGURANº 03: TINCIÓN DE VITALIDAD REALIZADA CON EOSINA AL 2%,
LOS ESPERMATOZOIDES NO TEÑIDOS (VIVOS) Y LOS TEÑIDOS
(MUERTOS).

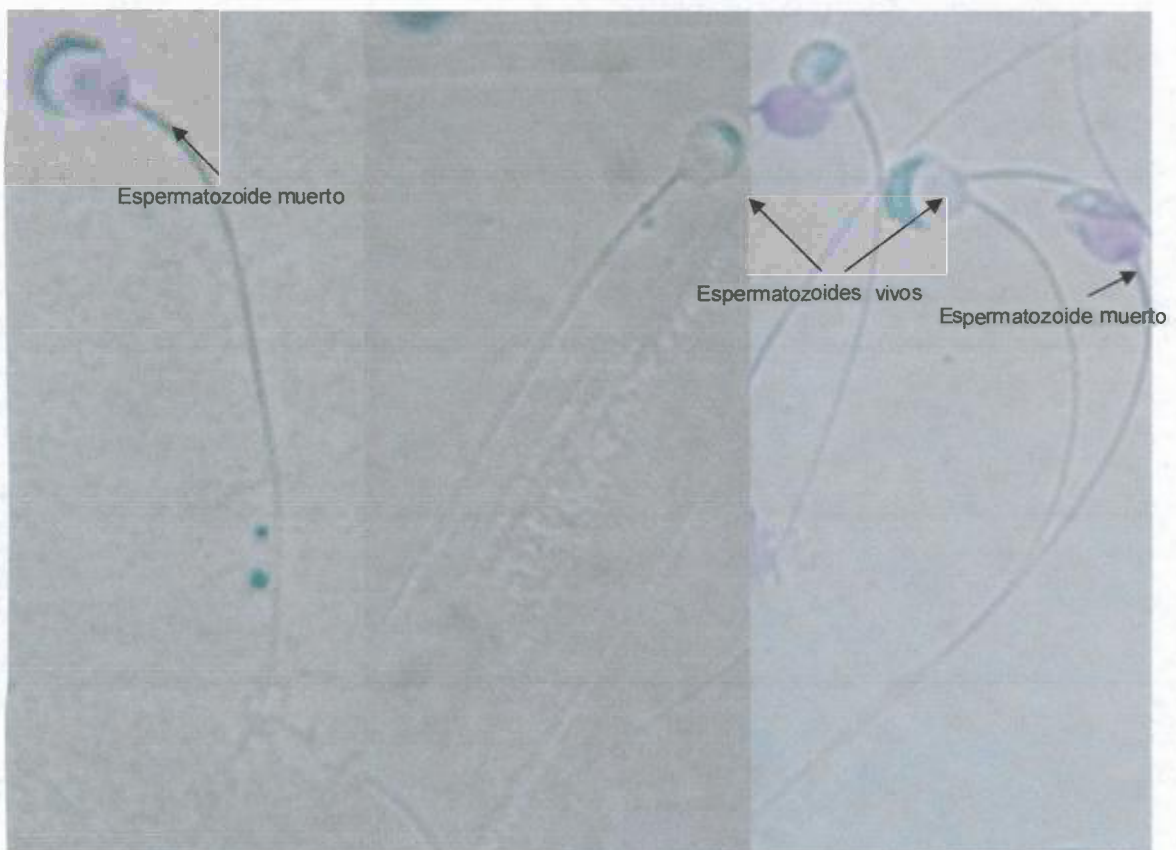
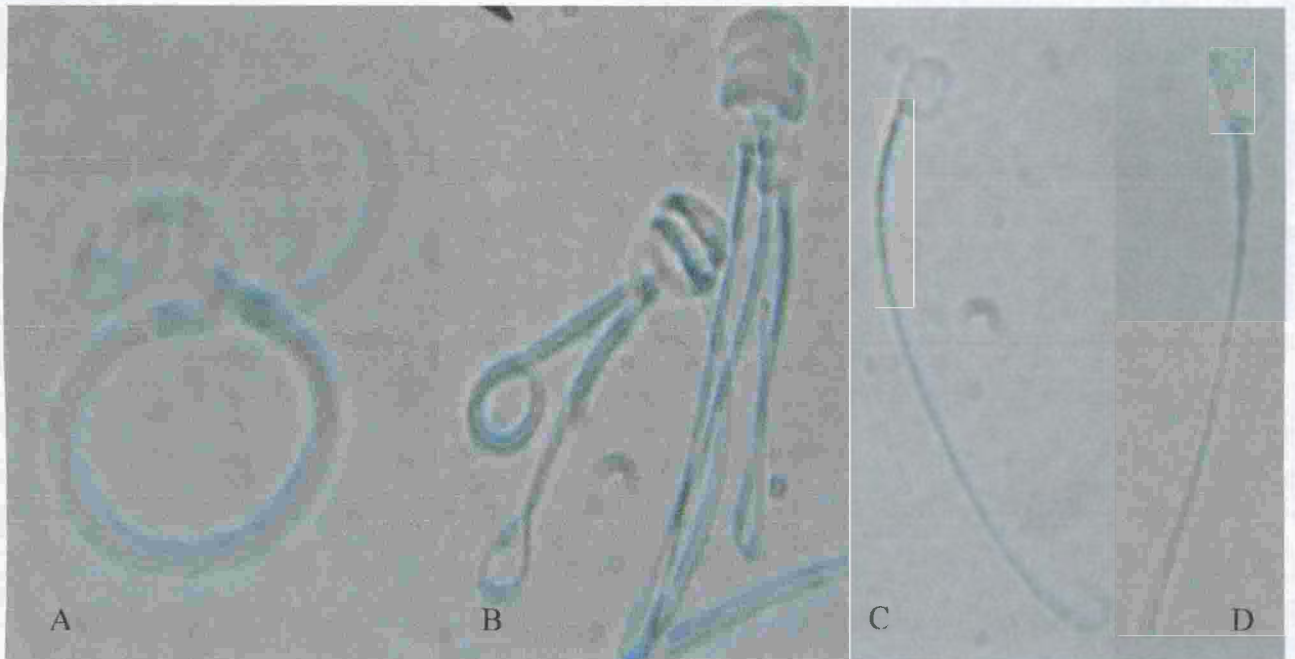


FIGURA Nº 04: FOTOGRAFÍAS MICROSCÓPICAS DE LA PRUEBA DE INTEGRIDAD DE MEMBRANA.



Espermatozoides con endósmosis positiva: (A), (B) Endósmosis total (C), (D) Endósmosis parcial.