

EFFECTO DEL TIPO DE CRIOPROTECTOR Y TEMPERATURA DE EQUILIBRIO EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ALPACA (*Vicugna pacos*)

Effect of cryoprotectant type and equilibrium temperature on cryopreservation of alpaca sperm (*Vicugna pacos*)

Wilber Garcia-Vera^{1*} ; Verónica Macedo², Elizabeth Mendoza², Nubia Catacora³ , Julio Malaga³ 

¹ IVITA-Marangani-
Facultad de Medicina
Veterinaria – UNMSM-
Lima-Perú.
² Escuela Profesional de
Veterinaria-UNSAAC –
Cusco-Perú.
³ Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia-
UNA-Puno.

* Corresponding author:
Wilber Garcia, Mail:
wgarcia@unmsm.edu.pe

Recibido: 21/06/2021

Aceptado: 26/07/2021

Publicado: 31/07/2022

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of glycerol (GL), dimethyl sulfoxide (DMSO) and dimethylformamide (DMF) at temperatures of 5 °C and 16 °C of equilibrium on sperm quality, after cryopreservation. 6 males were used in the semen collection, motility parameters were evaluated with the CASA system, viability, acrosomal integrity and mitochondrial activity by flow cytometry in fresh and thawed semen. We collected 30 ejaculates of which 10 were discarded for not fulfilling (volume ≥ 1 ml and total motility ≥ 60 %), the 20 ejaculates were mesclo in a tube to form pool carrying out the assessment of the initial quality of fresh semen, obtaining a total motility (MT) $61,6 \pm 3,4\%$, progressive motility (MP) $51,7 \pm 3,7\%$, viability $78,1 \pm 9,1\%$, mitochondrial activity (MA) $77,4 \pm 7,7$ and acrosomal integrity $88,9 \pm 11,5\%$. After cryopreservation no equilibrium temperature effect was observed, independently of cryoprotectant in the parameters of seminal quality. Cryoprotective effect ($P \leq 0,05$) was observed, presenting superior values in the sperm conserved in GL with respect to the rest of cryoprotectants, with significant differences ($P \leq 0,05$) in MT, MP, viability and AM and without significant differences in acrosomal integrity. The equilibrium temperature of 16 °C was effective for cryopreservation of alpaca sperm. In addition, the 5% GL preserved better the functional characteristics of sperm compared to 7% (DMF and DMSO)

Keywords: sperm, cryoprotectants, cryopreservation, alpacas

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del glicerol (GL), dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF) a temperatura de 5 °C y 16 °C de equilibrio, sobre la calidad espermática, después de la criopreservación. Se utilizaron 6 machos en la colección de semen, se evaluaron los parámetros de motilidad con el sistema CASA, la viabilidad, integridad acrosomal y actividad mitocondrial mediante citometría de flujo en el semen fresco y descongelado. Se colectó 30 eyaculados de los cuales se descartó 10 por no cumplir (volumen ≥ 1 ml y motilidad total ≥ 60 %), los 20 eyaculados se mesclo en un tubo para formar pool realizándose la valoración de la calidad inicial del semen fresco, obteniéndose una motilidad total (MT) $61,6 \pm 3,4\%$, motilidad progresiva (MP) $51,7 \pm 3,7\%$, viabilidad $78,1 \pm 9,1\%$, actividad mitocondrial (AM) $77,4 \pm 7,7$ e integridad acrosomal $88,9 \pm 11,5$ %. Después de la criopreservación no se observó efecto de la temperatura de equilibrio, independientemente de crioprotector en los parámetros de calidad seminal. Se observó efecto crioprotector ($P \leq 0,05$), presentando valores superiores en los espermatozoides conservados en GL respecto al resto de crioprotectores, con diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en MT, MP, viabilidad e AM y sin diferencias significativas en integridad acrosomal. Se concluye la temperatura de equilibrio de 16 °C fue eficaz para criopreservación de espermatozoides de alpaca. Asimismo, el GL al 5% conservaron mejor las características funcionales de los espermatozoides en comparación al 7% (DMF y DMSO).

Palabras clave: espermatozoides, crioprotectores, criopreservación, alpacas

INTRODUCCION

Los camélidos sudamericanos (CSA) constituyen un recurso de suma importancia social, económica, cultural y científica no solo para Perú, también para países de la Región Andina (Fernández-Baca, 2005). La creciente demanda de fibra superfina y carne con bajo porcentaje de colesterol ha estimulado la creación de programas de mejoramiento genético para la obtención de animales genéticamente superiores. Es así, entre las limitaciones que se está observando en el mejoramiento genético de las alpacas, es la falta de programas de inseminación artificial (IA) utilizando semen criopreservado. Esto debido a las bajas tasas de preñez obtenidas en estas especies (Bravo et al., 2000; Aller et al., 2003; Vaughan et al., 2003; García et al., 2020).

La criopreservación de semen de alpaca ha tenido un progreso lento y desalentador comparado con otras especies domésticas debido a la dificultad en la colección de semen y el manejo de las muestras seminales, debido a su alta viscosidad, escaso conocimiento sobre curvas de congelación y dilutores apropiados se constituyen en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación con resultados óptimos de calidad espermática post-descongelado. Esto determina que la IA quede restringida al uso de semen fresco. Por otra parte, la mayoría de trabajos en criopreservación de espermatozoides de alpaca y llama han empleado glicerol (GL) (6-7%) como agente crioprotector, donde los resultados demuestran una recuperación pobre tras la descongelación, acompañada con la pérdida parcial de la motilidad inicial (Vaughan et al., 2003; Santiani et al., 2005; Valdivia et al., 2005; Ordoñez y Verastegui 2007, Canorio et al., 2015), obteniendo tasas de preñez de 0-26% (Bravo et al., 2000; Aller et al., 2003; Vaughan et al., 2003, García et al., 2020). A pesar de sus beneficios, el GL es potencialmente citotóxico a ciertas concentraciones (Holt, 2000; Watson, 2000; Carretero et al., 2014), no siendo la base de sus propiedades crioprotectoras completamente conocidas (Aires et al., 2003), la búsqueda de diluyentes crioprotectores alternativos para la crioconservación de espermatozoides de CSA está más que justificada.

Uno de los candidatos propuestos a sustituir el GL como crioprotector son las amidas (Alvarenga et al., 2005) por su naturaleza altamente hidrofílica y su bajo tamaño molecular, causando menor daño osmótico en comparación con el GL. En la última década se ha venido empleando dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF) y etilenglicol en estudios de criopreservación de semen de alpaca. Choez et al. (2017) utilizando DMSO a 0.9M, en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca obtuvieron 35.8% de motilidad y 38 % de viabilidad; de igual manera, Terreros et al. (2015) reportaron 31% de motilidad y 28 % de integridad funcional de membrana en espermatozoides de alpaca criopreservados con 7% (0.9M) de DMSO. En el caso de DMF con espermatozoides de alpaca colectados por electroeyaculación Flores et al. (2015) trabajo a concentraciones de 4 y 7% obteniendo 8 y 10 % de motilidad post-descongelado. Sin embargo, Carretero et al. (2014) obtuvo 23 % de motilidad en espermatozoides post-descongelado de llamas empleando DMF al 7 %.

Otro factor para tener en cuenta al implementar los protocolos de criopreservación es la temperatura de equilibrio utilizada

después de agregar el crioprotector a los espermatozoides. En CSA, la única temperatura de equilibrio utilizada ha sido 4-5 °C (Bravo et al., 2000; Aller et al., 2003; Vaughan et al., 2003). Actualmente, solo existe un reporte en llamas (Carretero et al., 2014) que ha estudiado, en el mismo eyaculado y bajo las mismas condiciones experimentales, una temperatura de equilibrio alternativa (temperatura ambiente), sobre diferentes parámetros de espermatozoides congelados-descongelados. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto tres crioprotectores (GL, DMSO y DMF) en dos temperaturas de equilibrio (5 °C y 16 °C) sobre la calidad espermática de la alpaca, después de la criopreservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio y Animales

El estudio se realizó de enero a marzo del 2020 en el Fundo San Marcos y Laboratorio de Reproducción del Centro de Investigación IVITA-Marangani de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, situado en el distrito de Marangani, Cusco, Perú, a una altitud de 3698 msnm. Se utilizaron 6 alpacas macho de 4 a 6 años de edad, condición corporal de 3 a 3,5. Los cuales se mantuvieron en pastos cultivados (Raygras-trebol) durante todo el estudio. Los machos pertenecieron al grupo elite de reproductores del centro.

Preparación del diluyente de congelación.

Se utilizó el método descrito por (García et al., 2020) para congelación de espermatozoides alpacas. La fracción A fue en base a 3.03 g de Tris, 1,70 g de ácido cítrico, 1,25 g de fructosa, 10 mg de tilosina, 50 mg de gentamicina, 180 mg de lincomicina y 20 ml de yema de huevo de gallina, y se completó hasta 100 ml con agua bidestilada. La fracción B del dilutor estuvo compuesta por la fracción A y 14 % de Dimetilsulfóxido (DMSO); 14 % Dimetilformamida (DMF) y 10 % de Glicerol (GL).

Selección y entrenamiento de los machos

Diez machos adultos (4 a 6 años de edad) fueron adiestrados para la recolección de semen durante 15 días. De estos, seis animales demostraron alta libido aceptando la vagina artificial, la colección de semen se realizó con una frecuencia de 2 veces/semana antes del periodo experimental, para su acostumbramiento al personal, monta y uso de la vagina artificial dentro de un maniquí que tenía la forma de una hembra receptiva. Asimismo, para mantener la temperatura interna de la vagina artificial de 40 a 42 °C, se usó una frazadilla eléctrica durante la monta. Al finalizar se evaluó las características seminales de volumen y motilidad de cada macho. Durante el periodo experimental, se colectó un total de 30 eyaculados, de los cuales 10 se desechó por no presentar el volumen ≥ 1 ml y motilidad total ≥ 60 %. Por lo tanto, se trabajó con 20 eyaculados, cada eyaculado se pipeteo con una jeringa de 5 ml y aguja 18G por 1½ con la finalidad de disminuir la viscosidad y facilitar la manipulación. A continuación, los eyaculados fueron mezclados en un solo tubo (pool).

Proceso de crioconservación

Para el proceso de crioconservación la mezcla de eyaculados, se dividieron en seis alícuotas que se diluyeron (1:1) con la fracción A del dilutor a 35 °C. Seguidamente, tres alícuotas fueron enfriadas hasta 5 °C en un tiempo de 90 min,

descendiendo 3 grados por min, las otras 3 alícuotas fueron enfriados a 16 °C en 30 min. A estas temperaturas los espermatozoides enfriados se diluyeron 1:1 con la fracción B del dilutor, obteniéndose una concentración final de 5% de GL, 7% DMF y 7 % de DMSO y se dejó equilibrar por 30 min (Figura 1), seguidamente todo el semen de las seis alícuotas fue envasado en pajillas de 0,25 ml.

Para la congelación, las pajillas fueron expuestas a vapores de nitrógeno líquido (LN2) a 4 cm por encima del nivel LN2 durante 20 min en una caja de poliestireno expandido (tecnopor), para finalmente ser sumergidas en él para su almacenamiento hasta su descongelación. La descongelación se realizó sumergiendo cada pajilla en baño maría a 37 °C por 60s.

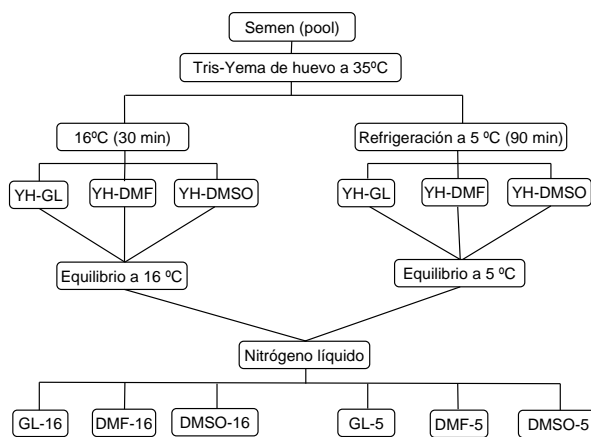


Figura 1. Diagrama que muestra el diseño experimental utilizado para evaluar las diferentes combinaciones de temperatura de equilibrio y crioprotector en un protocolo de congelación-descongelación en espermatozoides de alpaca ($n = 6$, $r = 5$). YH-GL: semen diluido con yema de huevo (YH) y glicerol, YH-DMF: semen diluido con YH y dimetilformamida, YH-DMSO: semen diluido con YH y dimetilsulfóxido, GL-16: semen descongelado, crioconservado con GL y se equilibró a 16 °C, DMF-16: semen descongelado, crioconservado con DMF y se equilibró a 16 °C, DMSO-16: semen descongelado, crioconservado con DMSO y se equilibró a 16 °C, GL-5: semen descongelado, crioconservado con GL y se equilibró a 5 °C, DMF-5: semen descongelado, crioconservado con DMF y se equilibró a 5 °C, DMSO-5: semen descongelado, crioconservado con DMSO y equilibrado a 5 °C.

Evaluación de la Calidad Espermática

Se hizo una primera evaluación de la calidad de los espermatozoides luego de su colección en semen fresco, una segunda posterior a la descongelación.

Concentración espermática. Se realizó una dilución de 1:100, en solución de NaCl al 3%. La muestra se homogenizo con ayuda del vortex, posteriormente se procedió a colocar 10 μ l de la muestra en la cámara de Neubauer. La concentración espermática se expresó en millones de espermatozoides por mililitro.

Motilidad. La evaluación de la cantidad y calidad de movimiento de los espermatozoides en las distintas suspensiones espermáticas en fresco y post-descongelación se

realizó mediante el sistema (AndroVision© Minitube) de análisis de semen asistido por computadora (CASA). Con este fin, las distintas muestras seminales se diluyeron en la solución TGC (300mM Tris, 28 mM glucosa, 95 mM ácido cítrico) a una concentración final de 50×10^6 espermatozoides/mL. A continuación, se depositó una gota de 10 μ l de la suspensión espermática en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos (22x22 mm) y se capturaron de 4 a 6 campos para cada muestra mediante un microscopio de contraste de fases (BH-2 Olympus), analizándose un mínimo de 200 células/muestra. Los parámetros analizados fueron: motilidad total (MT%) y motilidad progresiva (MP%).

Viabilidad. Se utilizó la técnica descrita por IMV Technologies para lo cual, cada muestra se lavó dos veces por centrifugación con PBS a 600 x g por 8 min, eliminándose el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 μ l de PBS.

La viabilidad fue evaluada por el Easykit de viabilidad (IMV-Technologies: 024708). Para esta evaluación, primero se agregó 180 μ l de Easybuffer B (IMV Technologies: 023862.) en un pocillo del Easykit se homogenizo y se adiciono 20 μ l de muestra de semen después del lavado, homogenizándose con una pipeta de 200 μ l y se incubó a 38 °C por 10 min en una cámara oscura.

Integridad del Acrosoma. Cada muestra fue centrifugada a 600 g por 10 min en dos oportunidades y reconstituida en 300 μ l de PBS. La evaluación de la integridad del acrosoma se hizo mediante Easykit de viabilidad e integridad acrosomal (IMV-Technologies: 025293). Primeramente, se agregó 180 μ l de Easybuffer B (IMV Technologies: 023862.) en un pocillo del Easykit y se pipeteo para homogenizar el pellet, luego se adiciono 20 μ l de muestra de semen lavado se homogenizo con una pipeta de 200 μ l y se incubó a 38 °C por 45 min en una cámara oscura.

Los espermatozoides fueron clasificados en cuatro poblaciones celulares: a) espermatozoides vivos con integridad acrosomal, b) espermatozoides vivos con daño acrosomal, c) espermatozoides muertos con integridad acrosomal y d) espermatozoides muertos con daño acrosomal).

Actividad Mitocondrial (AM). La AM se evaluó con la técnica descrita por IMV Technologies para lo cual, cada muestra se lavó dos veces por centrifugación con PBS a 600 x g por 10 min, eliminándose el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 100 μ l de PBS.

La evaluación de la actividad mitocondria se hizo mediante Easykit de actividad mitocondrial (IMV-Technologies: 024864). Primero se agregó 10 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) en cada pocillo del Easykit, y se pipeteo para homogenizar el pellet, luego se adiciono 20 μ l de muestra de semen lavado y se homogenizo con una pipeta de 200 μ l encubando a 38 °C por 30 min en una cámara oscura.

Se consideraron espermatozoides con actividad mitocondrial a aquellos que presentaron fluorescencia roja. Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides con actividad mitocondrial.

Citometría de Flujo

Las evaluaciones se realizaron mediante un citometro de fujo Guava easyCyte 12HT (Luminex, EEUU) adquiriendo 10,000 eventos compatibles con espermatozoides mediante el programa Guava Clean 3.0. El láser de excitación de 488 nm fue utilizado para Viabilidad (SYBR-14 y PI) e Integridad Acrosomal (FITC-PNA). Mientras la Actividad Mitocondrial (Mito Tracker Deep Red FM) fue excitado por el láser de longitud de 642. La fluorescencia emitida fue detectada por el canal 2 (Ch02: 505-560 nm) para SYBR-14 y FITC-PNA, Canal 5 (Ch05: 642-740nm) para PI y Canal 11 (Ch11: 642 – 740 nm) para Mito Tracker Deep Red FM.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el procedimiento GLM (ANOVA) de SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), en un diseño factorial, teniendo como factor temperatura de equilibrio (16 °C vs 5 °C), tipo de crioprotector (DMSO, DMF y GL). Se realizó 6 repeticiones por unidad experimental. Cuando las diferencias fueron significativas ($p < 0,05$), se realizó el test de Tukey de comparación de medias a posteriori. La normalidad y homogeneidad de varianza de los parámetros espermáticos se comprobaron con el tests de Kolmogorv-Smirnov y Levene. Las variables dependientes que no cumplieron con los supuestos de igualdad de varianza y distribución normal fueron sometidas a una transformación arcoseno, antes del análisis estadístico.

RESULTADOS

El tiempo promedio de cópula, volumen, motilidad y concentración espermática de los 30 eyaculados colectados fue de $26,9 \pm 2,9$ min, $2,3 \pm 0,3$ ml, $54,4 \pm 5,7$ % ml y $88,7 \pm 15,1 \times 10^6$ /ml, de los cuales se descartó 10 eyaculados por no cumplir (volumen ≥ 1 ml y motilidad total ≥ 60 %), los 20 eyaculados se mesclo en un tubo para formar pool realizándose la valoración de la calidad inicial del semen fresco, se obtuvo una motilidad total de $61,6 \pm 3,4$ %, motilidad progresiva de $51,7 \pm 3,7$ %, viabilidad de $78,1 \pm 9,1$ %, actividad mitocondrial de $77,4 \pm 7,7$ e integridad acrosomal de $88,9 \pm 11,5$ %.

El análisis de los distintos parámetros cinéticos, viabilidad, actividad mitocondrial e integridad acrosomal de los espermatozoides descongelados (Tabla 1) se observó que ninguno de estos parámetros se vio afectado por el efecto de la temperatura de equilibrio, independientemente de crioprotector. Tampoco se observó interacción entre las diferentes temperaturas de equilibrio y los crioprotectores para ninguna de las características seminales rutinarias evaluadas.

Una vez analizados los distintos parámetros espermáticos tras la descongelación de las muestras seminales (Tabla 2), se observó efecto crioprotector ($P \leq 0,05$), presentando valores superiores en los espermatozoides conservados en GL respecto al resto de crioprotectores, con diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en MT, MP, viabilidad e AM y sin diferencias significativas en integridad acrosomal.

Tabla 1. Efecto de la temperatura de equilibrio (5 °C y 16 °C) en la motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), viabilidad, actividad mitocondrial (AM) e integridad acrosomal de espermatozoides criopreservados en glicerol (GL), dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilfomamida (DMF) y evaluados post-descongelación.

Crioprotector	MT (%)	MP (%)	Viabilidad (%)	AM (%)	Integridad Acrosomal (%)
DMSO 16	33,5 ± 0,9	21,4 ± 4,3	12,7 ± 1,7	18,3 ± 2,1	54,9 ± 12,1
DMF 16	33,8 ± 1,1	21,9 ± 4,9	12,5 ± 1,1	16,8 ± 2,9	66,1 ± 11,5
GL 16	37,1 ± 1,4	26,6 ± 5,1	15,8 ± 1,5	24,7 ± 4,3	78,6 ± 12,8
DMSO 5	33,6 ± 0,7	19,0 ± 3,8	13,0 ± 1,9	18,1 ± 2,6	65,1 ± 12,2
DMF 5	35,0 ± 0,9	25,8 ± 3,6	16,0 ± 2,6	18,2 ± 1,5	64,0 ± 11,7
GL 5	37,1 ± 1,3	26,7 ± 6,0	18,5 ± 2,4	29,0 ± 3,6	62,0 ± 13,2

^{a,b,c} Valores con superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Tabla 2. Efecto de los crioprotectores: glicerol (GL), dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilfomamida (DMF) en la motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), viabilidad, actividad mitocondrial (AM) e integridad acrosomal de espermatozoides evaluados post-descongelación.

Crioprotector	MT (%)	MP (%)	Viabilidad (%)	AM (%)	Integridad Acrosomal (%)
DMSO	33,5 ± 2,4 ^a	20,2 ± 2,8 ^a	12,8 ± 1,3 ^a	18,2 ± 1,6 ^a	60,0 ± 8,4 ^a
DMF	34,4 ± 2,8 ^a	23,9 ± 3,0 ^{ab}	14,3 ± 1,5 ^a	17,5 ± 1,6 ^a	65,0 ± 7,9 ^a
GL	37,1 ± 3,7 ^b	26,7 ± 3,8 ^b	18,0 ± 1,4 ^b	26,9 ± 2,8 ^b	74,8 ± 8,9 ^a

^{a,b,c} Valores con superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Las características seminales encontradas en alpacas machos de la raza Huacaya del presente estudio colectadas por el método vagina artificial son similares a reportes en alpacas (Bravo et al., 2000; Raymundo, 2006; Huanca et al., 2011; Olagibel y Navaro 2014) y llamas (Aller et al., 2003) sin embargo, los valores de volumen, motilidad y concentración fueron mejores a los reportados en alpacas (Dávalos y Olazábal, 2002; Flores et al., 2015) colectados con vagina artificial y (Cayo, 2013; Franco 2015) por electroeyacuación. Así mismo, fueron inferiores al semen colectado por el método poscópula en alpacas (Alarcon et al., 2012; Garcia et al., 2019, 2020), en volumen y motilidad. Parámetros como volumen, motilidad, concentración espermática son altamente variables entre machos, entre eyaculados colectados del mismo macho, edad, época, tipo de alimentación, método de colección y especie (Sumar y Leyva, 1981; Bravo et al., 1997; Aller et al., 2003). Así, eyaculados obtenidos por vagina artificial en alpacas tienden a disminuir en volumen, concentración y viscosidad, cuando se incrementa la frecuencia de uso (Bravo et al., 1997).

Respecto al crioprotector, la búsqueda de diluyentes crioprotectores alternativos y de composición definida para la criopresevación de espermatozoides de alpaca está más que justificada. Son pocos los estudios que se han enfocado en crioprotectores alternativos como las amidas (dimetilsulfóxido o dimetilformamida) en consideración a su naturaleza altamente hidrofílica y su bajo tamaño molecular y nivel de toxicidad inferior al del GL (Flóres et al., 2015; Carretero et al., 2014; Canorio et al., 2015; Terreros et al., 2015; Choez et al., 2017). Es así, la DMF reduce la formación de cristales de hielo intracelular e incrementa la permeabilidad de la membrana y teóricamente, en un menor potencial para generar daño espermático mediante el choque osmótico (Holt, 2000), en tanto que la penetración del DMSO en la membrana de los espermatozoides es también rápida debido a su bajo peso molécula. (Lovell et al., 1959) y ha sido usado con éxito en varias especies (Kundu et al., 2002).

En el presente estudio, al comparar la capacidad crioprotectora del DMSO, DMF y GL podemos afirmar que no se aprecia ningún efecto de la temperatura de equilibrio de 16 y 5 °C en los parámetros cinéticos, viabilidad, actividad mitocondrial e integridad acrosomal de los espermatozoides descongelados; en otros trabajos como el de Carretero et al. (2014) obtuvieron resultados contrarios en la criopresevación de espermatozoides de llamas, al comparar DMF y GL, a concentración del 7 % observaron una mayor motilidad en DMF independientemente de la temperatura de equilibrio (5 °C y temperatura ambiente), una posible explicación de estos resultados obtenidos sería, los espermatozoides criopreservados con DMF parecen sufrir menos estrés osmótico (debido a su menor peso molecular) que las conservadas con GL y por lo tanto muestran una mejor motilidad. Sin embargo, cabe destacar que, en nuestro experimento, los espermatozoides de alpaca a pesar de que el GL se adiciona a temperatura de equilibrio de 16 °C tiene una menor toxicidad y permite un mayor acceso de este crioprotector a las células. Se sabe que la concentración óptima de GL a utilizar en los dilutores está limitada por su posible toxicidad, que a su vez depende de la especie, la velocidad de enfriamiento, la composición del dilutor (Holt, 2000). Otra

posible explicación, sería las diferencias entre especies en la composición de la membrana plasmática, el porcentaje de crioprotector en el diluyente, los aditivos incluidos, el tiempo de refrigeración y/o el método de congelación (Watson, 1995; Medeiros et al., 2002; Holt, 2000).

Con respecto a las muestras equilibradas a 5 °C, nuestros resultados con DMSO fueron similares a los trabajos de Terreros et al. (2015); Choez et al. (2017) quienes obtuvieron de 31 a 35.8 % de motilidad e inferiores en viabilidad (38 %). En ambos trabajos utilizaron muestras con motilidades iniciales mayores al 50%, con espermatozoides epididimarios y usaron como dilutor (leche descremada, yema de huevo y fructuosa).

Por otra parte, los resultados de la evaluación de la actividad mitocondrial fueron superiores a los reportados por Contreras (2018) en espermatozoides epididimario de alpaca, donde con la inclusión de dimetilacetamida y DMF en los diluyentes de criopresevación se obtuvo 15.86% y 16.70% de actividad mitocondrial post descongelado respectivamente. Cabe señalar que en el trabajo se utilizó como parámetros de evaluación mediante citometría de flujo el fluorocromo MitoTracker Deep Red FM para actividad mitocondrial al igual que el presente trabajo. La evaluación de la actividad mitocondrial es un nuevo parámetro que cada vez está siendo estudiado ya que los espermatozoides son dependientes de la energía producida por las mitocondrias (Plaza et al., 2015). La función de las mitocondrias en la producción de ATP es vital para la motilidad del espermatozoide y para otras funciones relacionadas con la fecundación (Folgero et al., 1993), por lo tanto, medir la actividad mitocondrial podría ser una opción factible para la evaluación de la calidad del semen (Ortega-Ferrusola et al., 2009).

A pesar del efecto tóxico del GL (Garner et al., 1999). En la criopresevación de los espermatozoides de alpaca tiene mejor calidad seminal al descongelado en MT, MP, viabilidad y AM que el DMSO y DMF (Cuadro 2), nuestros resultados con GL son similares a los reportados con el uso de 6-8% de GL (llama: Von Baer y Helleman, 1998; Aller et al., 2003; alpaca: Vaughan et al., 2003; Santiani et al., 2005; Santiani et al., 2013; Choez et al., 2017) obteniendo motilidades post-descongelado entre 6 y 36%, integridad funcional de la membrana de 45 % y viabilidad de 10 a 33,8 %. No obstante, otros investigadores no pudieron apreciar este mayor efecto crioprotector del GL, obteniendo una calidad seminal, después del descongelado, similar o menor para los diluyentes con DMSO y DMF (Flores, 2015; Terreros et al., 2015; Choez et al., 2017). Estas diferencias entre autores sobre el efecto del GL en la criopresevación podrían explicarse, en parte, a que utilizado en altas concentraciones puede llegar a tener una acción tóxica (Hammerstedt y Graham, 1992; Carretero et al., 2014), causando un posible daño osmótico a los espermatozoides (Watson, 1995). Daño que dependerá, a su vez, de las tasas de enfriamiento y congelación, de la composición del diluyente y del método de adición del GL (Anel et al., 2003), lo que dificulta la comparación entre resultados de diferentes laboratorios. Sin embargo, a pesar de ello, el GL es considerado como el crioprotector más eficaz en rumiantes (Leibo y Songsasen, 2002), tal y como hemos podido corroborar en nuestro experimento.

CONCLUSIONES

La temperatura de equilibrio de 16 °C fue eficaz para criopreservación de espermatozoides de alpaca; por lo tanto, podría usarse para simplificar los protocolos de criopreservación.

Luego del proceso de congelación y descongelación se obtuvieron mejores valores de motilidad total, motilidad progresiva, viabilidad y actividad mitocondrial cuando se usó glicerol al 5% ($p < 0,05$) en comparación al 7% (DMF y DMSO).

CONFLICTO DE INTERESES

No hay conflicto de intereses

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

La concepción y diseño de estudio (WG), adquisición de datos (VM, EM), Análisis e interpretación de datos (JM y NC), redacción del artículo y aprobación (WG)

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al financiamiento del proyecto N° 014-FONDECYT/BM.

REFERENCIAS

- Aires A, Hinsch D, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller-Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology* 2003. 60: 269–279.
- Alarcón V, García W., Bravo W. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev Inv Vet Perú* 2012, 23: 58-64. doi: 10.15381/rivep.v23i1.882
- Aller J, Rebuffi G, Cancino A, Alberio R. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch Zootec* 2003, 52: 15-23.
- Alvarenga M, Papa F, Landim-Alvarenga F, Medeiros A. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science* 89 (2005) 105–113.
- Anel L, de Paz P, Álvarez M, Chamorro C, Boixo J, Manso A, González M, Kaabi M, Anel E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* 2003, 60: 1293–1308.
- Bravo W, Flores D, Ordoñez C. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biol Reprod*, 1997, 57: 520-524.
- Bravo W, Skidmore A, Zhao X. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim Reprod Sci*, 2000, 62: 173-193. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00158-5
- Canorio N, Paredes F, Valdivia M. Agentes Crioprotectores Alternativos para el Congelamiento Lento de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú*, 2015, 26(3): 434-443. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11185>
- Canorio N. Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*). Tesis de Magister. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2008: 73 p.
- Carretero M, Neild N, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of *Lama glama* spermatozoa. *Andrologia*, 2014:20, 1–9. doi: 10.1111/and.12319
- Cayo S. Inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen fresco, refrigerado y congelado colectado por el método de electroeyaculación (Tesis de pregrado). UNSAAC, 2013. Cusco, Perú.
- Choez K, Ruiz L, Sandoval R, Evangelista S, Santiani A. Determinación de la Concentración Óptima de Tres Crioprotectores para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Rev Inv Vet Perú*, 2017:28(3): 619-628. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13367>
- Contreras W. Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Médico Veterinario: Universidad Nacional Mayor San Marcos. 2018: 44-47p.
- Dávalos R., Olazábal J. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Comunicación en *Rev Inv Vet Perú*, 2002: 13 (2): 98-99
- Fernández-Baca S. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina. TCP/RLA/2914. Organización para la Agricultura y la Alimentación 2005. Oficina regional para América Latina y el Caribe.
- Flores N, Cucho H, Carretero M, Ciprian R, Quispe H, Calderón N, Miragaya M, Giuliano S. Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la movilidad de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS®. *Spermova*, 2015: 5(1), 47-50.
- Folgero T, Bertheussen K, Lindal S, Torbergsen T, Oian P. Mitochondrial disease and reduced sperm motility. *Hum Reprod*; 1993, 8:1863–1868.
- Franco E. Criopreservación de semen de alpaca (*Lama pacos*) en pellets (Tesis de pregrado). UNSAAC, 2015. Cusco, Perú.
- García W, Alarcón V. Efecto de la inseminación artificial con semen fresco, con uno y dos servicios, en la fertilidad y natalidad de las alpacas. *Rev Inv Vet Perú*, 2019:30(2): 760-767 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16072>
- García W, Maxi E, Macedo V, Mendoza E, Cardenas N, Malaga J. Efecto de dos métodos de crioconservación sobre la calidad seminal y tasa de preñez en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal. *Spermova*, 2020:10(2): 74-80. DOI. 10.18548/aspe/0008.11
- Garner D, Thomas C, Gravance C. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod Dom Anim*, 1999:34: 399-404. doi: 10.1111/j.1439-0531.1999.tb01392.x
- Hammerstedt H, Graham K. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 1992: 29: 26-38.

- Holt W. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*.2000, 53: 47-58.
- Huanca T, Mamani R, Navero M, Gonzales M. Variación individual y estacional de las características seminales en alpacas (*Vicugna pacos*). *Spernova* 2011, 1:98-100.
- Kundu CN, Chakrabarty j, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC. Effect of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined médium. *Anim Reprod Sci* 2002. 123: 907-913.
- Leibo S, Songsasen N. Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 2002, 57: 303-326.
- Lovelock J, Bishop M. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 1959, 183:1394-1395. doi: 10.1038/1831394a0
- Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodrigues J. Current status of sperm cryopreservation: why isnt it better. *Theriogenology*, 2002, 57: 327-344.
- Olaguivel, C., Naveros, M. (2014). Efecto de la enzima colagenasa en la congelación de semen en alpacas (*Vicugna pacos*). *Spernova* 2008, 4(1): 64 (Abstract).
- Ordoñez M, Verastegui H. Efecto de los crioprotectores (glicerol y etilenglicol) en la criopreservación de semen de alpaca (*Lama pacos*). Tesis de Ingeniero Zootecnista. Huancavelica: Univ Nacional de Huancavelica 2007. 55 p.
- Ortega-Ferrusola C, García B, Gallardo-Bolanos J, Gonzalez- Fernández L, Rodríguez-Martinez H, Tapia J. Apoptotic markers can be used to forecast the freeze ability of stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009, 114:393–403.
- Plaza D, Martín M, Tapia J, Ortega Ferrusola C, Balao da Silva C, Pena F. Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility 2015. [Internet], [15 setiembre 2020]. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0138777>
- Raymundo F, Huanca W, Huanca T, Huerta S, Cordero A. Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. *Rev Inv Vet Perú*, 2006, 17 (2): 125-130.
- Santiani A, Evangelista S, Valdivia M, Risopatron J, Sanchez R. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 2013, 79:842–846.
- Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. Effects on the quality of frozenthawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl* 2005, 7: 303-309. doi: 10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x
- Sumar J, Leyva V. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). En: IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos 1981. Punta Arenas, Chile.
- Terreros M, Huanca W, Arriaga I, Ampuero A. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 2015, 26: 420-426. doi: 10.15381/rivep.v26i3.11182
- Valdivia M, Canorio N, Carrillo N, Uipan P. Effects of cryoprotectans on alpaca's spermatozoa during cooling process. *Biol Reprod* 2005, 73: 228.
- Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*) RIRDC Project AAA-1A: Rural Industries Research and Development Corporation. Australia 2003. 90 p.
- Von Baer, Hellemann. Variables seminales en Llama (*Lama glama*). *Arch. Med. Vet.* 1998, 30 (2).
- Watson P. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev.*1995, 7: 871-891.
- Watson P. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.*2000, 60-61: 481-492.