

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios de cobayo sobre las características espermáticas post-descongelación

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista

Autores:

David Fernando Calderón Guamán

Sandro Rubén Pintado Sangurima

Director:

Dr. Fernando Pedro Perea Ganchou

ORCID:  0000-0001-8301-6339

Cuenca, Ecuador

2023-09-27

Resumen

En el presente estudio se evaluó el efecto de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios de cuyes sobre las características espermáticas post-descongelación. Para ello, de un total de veinte y dos cobayos, fueron recolectados cuarenta y cuatro testículos de un matadero local. Los espermatozoides se recuperaron mediante flujo retrógrado de la cola del epidídimo, usando 1 mL de medio TCG-YH (tris, ácido cítrico, glucosa, 20% [v/v] yema de huevo). Las muestras fueron refrigeradas durante 60 minutos a 5°C, cargadas en pajuelas de 0,25 ml y congeladas con TCG-YH y 5% de glicerol usando dos protocolos de congelación: 1) Protocolo convencional (CC) usando doble rampas de congelación (24 y 10 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido por tres y dos minutos respectivamente) en una caja de poliestireno, y 2) Protocolo con velocidades de enfriamiento programadas (CP) usando un congelador automático. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza usando el modelo lineal general y las medias se compararon con la prueba de los mínimos cuadrados. Los parámetros cinéticos disminuyeron drásticamente luego de la congelación y descongelación. La mayoría de parámetros cinéticos y el porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática y acrosomal intacta fueron mayores ($P < 0,05$) con el protocolo CC que con el protocolo CP. Sin embargo, el porcentaje de fragmentación del ADN espermático post-descongelación no varió entre tratamientos ($P > 0,05$). En conclusión, la congelación de muestras espermáticas epididimarias de cobayo con el procedimiento convencional resultó en mejor calidad espermática que la obtenida con la congelación programada.

Palabras clave: cuy, espermatozoides, epidídimo, yema de huevo, criopreservación



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The current study evaluated the effect of two freezing protocols in guinea pig epididymal spermatozoa on post-thaw sperm characteristics. For this purpose, from a total of twenty-two guinea pigs, forty-four testes were collected from a local slaughterhouse. Spermatozoa were recovered by retrograde flushing from the epididymal tail using 1 mL of TCG-YH medium (tris, citric acid, glucose 20% [v/v] egg yolk). Samples were refrigerated for 60 min at 5°C, loaded into 0.25 mL straws and frozen in TCG-YH and 5% glycerol using two freezing protocols: 1) Conventional protocol (CC) using double freezing ramps (24 and 10 cm above the liquid nitrogen level for 3 and 2 min respectively) in a polystyrene box, and 2) Protocol with programmed cooling rates (CP) using an automatic freezer. Data were analyzed by analysis of variance using the general linear model and means were compared with the least squares test. Kinetic parameters decreased drastically after freezing and thawing. Most kinetic parameters and the percentage of spermatozoa with intact plasma and acrosomal membrane were greater ($P < 0,05$) with the CC than with the CP protocol. However, the percentage of post-thaw sperm DNA fragmentation did not vary between treatments ($P > 0,05$). In conclusion, freezing guinea pig epididymal sperm samples with the conventional procedure resulted in better sperm quality than that attained with programmed freezing.

Keywords: guinea pig, sperm, epididymal, egg yolk, cryopreservation



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Capítulo 1	12
Introducción.....	12
Objetivos.....	14
Objetivo general	14
Objetivos específicos.....	14
Capítulo 2.....	15
Revisión de literatura	15
2.1 Anatomía del aparato reproductor del cobayo.....	15
2.1.1. Pene.....	15
2.1.2. Testículos.....	16
2.1.3. Epidídimo	16
2.1.4. Conductos deferentes.....	17
2.1.5. Uretra	17
2.1.6. Glándulas sexuales accesorias	17
2.1.6.1. Vesículas seminales	18
2.1.6.2. Próstata	18
2.1.6.3. Glándulas coagulantes.....	18
2.1.6.4. Glándulas bulbouretrales	18
2.2. Fisiología reproductiva del cobayo	18
2.2.1. Espermatogénesis	18
2.3. Características morfológicas de los espermatozoides de cobayo	20
2.4. Características seminales del cobayo	21
2.5. Evaluación de la funcionalidad espermática	22
2.5.1. Integridad de la membrana plasmática y acrosomal	22
2.5.2. Cinética espermática	23
2.5.3. Integridad del ADN.....	23
2.5.4. Actividad mitocondrial.....	24
2.6. Recuperación de espermatozoides epididimarios.....	24
2.7. Criopreservación de semen de cobayo	25
2.7.1. Daños producidos durante la crioconservación	26
2.7.1.1. Shock térmico.....	26
2.7.1.2. Daños físicos y químicos	27
2.7.1.3. Daños en las membranas espermáticas	27

2.7.1.4. Daño oxidativo.....	27
Capítulo 3.....	29
Metodología	29
3.1. Área de estudio	29
3.2. Diseño experimental	29
3.3. Preparación de los diluyentes.....	29
3.3.1. Adición de yema de huevo y glicerol al diluyente base (TCG) para la congelación.....	30
3.4. Obtención de testículos y transporte	30
3.5. Recuperación de espermatozoides epididimarios.....	30
3.6. Criopreservación espermática	31
3.7. Análisis de los parámetros cinéticos.....	32
3.8. Análisis de la integridad de las membranas plasmática y acrosomal.....	33
3.9. Análisis de la integridad del ADN	34
3.10. Análisis estadístico	34
Capítulo 4.....	36
Resultados	36
4.1. Cinética espermática.....	36
4.2. Integridad de las membranas espermáticas.....	36
4.3. Fragmentación del ADN espermático.....	37
Discusión.....	39
Conclusiones.....	42
Referencias	43
Anexos	52

Índice de figuras

Figura 1. Aparato reproductor del cuy.....	15
Figura 2. Esquema celular del túbulo seminífero.....	19
Figura 3. Espermiogénesis en mamíferos	20
Figura 4. Estructura del espermatozoide de cobayo (Guinea Pig).....	21
Figura 5. Porcentajes de espermatozoides con ADN fragmentado en muestras epididimarias de cobayo congeladas por el método convencional y programable.	38

Índice de tablas

Tabla 1. Diluyente sintético Tris, ácido cítrico y glucosa (TCG)	30
Tabla 2. Diluyente base más yema de huevo y glicerol para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cobayos	30
Tabla 3. Materiales para la recuperación espermática	31
Tabla 4. Materiales para la criopreservación espermática	31
Tabla 5. Materiales para el análisis de los parámetros cinéticos	32
Tabla 6. Materiales para el análisis de la integridad de membranas espermáticas	33
Tabla 7. Materiales para el análisis de la integridad del ADN espermático	34
Tabla 8. Parámetros cinéticos de espermatozoides epididimarios de cobayos frescos y diluidos con TCG-20YH, y congelados - descongelados en vapores de NL ₂ estático.....	36
Tabla 9. Integridad de membranas en espermatozoides epididimarios de cobayos luego de la descongelación en las distintas subpoblaciones en muestras congeladas con un protocolo convencional y programable en vapores de NL ₂ estático.	37

Dedicatorias

Esta tesis se la dedico primeramente a Dios por darme la fuerza para seguir adelante. A mis padres de manera muy especial Luis Marcelo y María de las Mercedes por todo su apoyo, amor, enseñanzas y consejos que me permitieron cumplir con esta meta tan anhelada y convertirme en la persona que soy hoy en día.

A mis hermanos Belén, Mateo y Emilia por su aliento y compañía. A mis abuelitos José, Julia y Sara por su amor incondicional. A mi pareja por su compañía y apoyo. A los amigos con los que he compartido en todo este largo camino y que han hecho del mismo una experiencia inolvidable.

David Fernando Calderón Guamán

Esta tesis se la dedico a la Virgen María quien me dio fuerzas y supo guiarme en el momento más difícil de mi vida para seguir adelante con mis estudios. A mis padres Segundo y Rocío por su amor, su valentía, consejos y apoyo que nunca me faltó en esta etapa de mi vida. Gracias a ellos soy la persona que soy.

A mis hermanos, Franklin, Alexandra, Marcia, María, Evelin y de manera muy especial a mi hermano Edison que siempre lo tengo presente por muy lejos que se encuentre, a ellos por su paciencia, amor y apoyo que siempre me lo demostraron. A mis sobrinos Danilo, Zoe, Edison, Isael, Dylan, Camila, Emanuel y Anthony por su ternura y amor puro que me brindan.

A mis abuelitos Raquel y Enrique por su amor y cariño. A mi primo Juan por su apoyo incondicional y lealtad. De manera especial a mi prima Valentina que desde el cielo me ha apoyado y acompañado siempre. A mis cuñadas y cuñados por todo su apoyo durante todo este tiempo. A mi hijo que está en el cielo, Thiago Said Pintado Ramón que siempre me está acompañando y cuidando, ayudándome a seguir adelante.

Sandro Rubén Pintado Sangurima

Agradecimientos

Agradezco a Dios por llenarme de salud y permitirme cumplir mis sueños. A mi familia por orientarme a través de todos estos años, a sus esfuerzos y sacrificios que facilitaron este logro.

Mi sincero agradecimiento a mi director de tesis Dr. Fernando Perea por todas sus enseñanzas académicas y por la dedicación para realizar esta investigación. A mi compañero de tesis Sandro Pintado por su compromiso y lealtad.

Agradezco a los técnicos docentes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Cuenca por su ayuda y guía en la investigación.

A la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca por permitirme realizar el sueño que tuve de pequeño.

David Fernando Calderón Guamán

Le agradezco a Dios y a la Virgen María por darme salud y vida para poder cumplir esta meta. A toda mi familia que siempre estuvieron pendientes y ayudándome a cumplir este objetivo. Agradezco a mi director de tesis Dr. Fernando Perea por su dedicación y a mi compañero de tesis David Calderón gracias por su paciencia y comprensión.

Agradezco al Dr. Xavier Samaniego y Dr. Mauricio Dumas quienes fueron guías y ayudaron en esta investigación.

A la Universidad de Cuenca por permitirme terminar mi carrera en esta institución.

A mis grandes amigos Emanuel Sangurima y Francisco Aguilar gracias por el apoyo y la ayuda mutua para poder cumplir este logro.

Sandro Rubén Pintado Sangurima

Lista de abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ALH: Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza

ALP: Fosfatasa alcalina

AST: Aspartato amino transferasa

ATP: Adenosín trifosfato

BCF: Frecuencia de batido del flagelo

CASA: Computer assisted sperm analysis

CC: Congelación convencional

CP: Congelación con velocidades de enfriamiento programadas

DPDA: Espermatozoide con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado

DPIA: Espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FSH: Hormona folículo estimulante

HOST: Test hiposmótico

IMA: Integridad membrana acrosomal

IMP: Integridad membrana plasmática

IPDA: Espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado

IPIA: Espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto

ISAS: Integrated sperm analysis system

LDH: Lactato deshidrogenasa

LIN: Linealidad

MT: Motilidad total

MP: Motilidad progresiva

NL₂: Nitrógeno líquido

ORT: Test de resistencia osmótica

PE: Ficoeritrina

PI: Ioduro de propidio

PNA: Peanut agglutinin

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SCD: Dispersión de cromatina espermática

STR: Rectitud

TCF: Tris, ácido cítrico y fructosa

TCG: Tris, ácido cítrico y glucosa

VAP: Velocidad promedio

VCL: Velocidad curvilínea

VCL-R: Velocidad curvilínea progresiva

VSL: Velocidad rectilínea

VSL-R: Velocidad rectilínea progresiva

YH: Yema de huevo

WOB: Oscilación

Capítulo 1

Introducción

Los cobayos (*Cavia porcellus*) son mamíferos roedores que habitan países andinos como Ecuador, Perú, Colombia y Bolivia. Es una especie que puede encontrarse tanto en regiones costeñas, en zonas llaneras y en alturas de hasta 4.500 msnm debido a que posee una excelente capacidad de adaptación (Zaldívar & FAO, 1997). Es una especie que se alimenta principalmente de forrajes de los cuales aprovecha eficientemente sus nutrientes (Andrade-Yucailla et al., 2016).

La crianza del cuy en zonas de Latinoamérica se ha desarrollado principalmente con sistemas familiares, destinados a cubrir necesidades de alimentación diaria. Estos sistemas suelen presentar porcentajes bajos de productividad debido a las elevadas tasas de mortalidad y morbilidad (Ramírez-Navarro & Cárdenas, 2019). En Ecuador en el año 2019, el censo agropecuario determinó la existencia de 5'067.049 cobayos, de los cuales el 97% se criaban con sistemas tradicionales y familiares (MINAGRI, 2019).

El principal beneficio de la producción de cobayos radica en la alta calidad proteica de su carne, además su ingesta contribuye a la seguridad alimentaria y provee de recursos económicos a la población (Lammers, Carlson, Zdorkowski, & Honeyman, 2009; Ngoula et al., 2017). En el año 2018 en Ecuador se registró un consumo per-cápita de 16,90 kg/año en el área rural y 8,52 kg/año en el área urbana (Calvopiña, 2018).

La criopreservación ofrece una alternativa reproductiva destinada a la conservación de semen de reproductores con el objetivo de perpetuar la especie e incluso transportar dicho material hacia lugares lejanos para ejecutar programas de crianza o experimentación (Bonaura, Nuñez, García, Tittarelli, & Stornelli, 2013; Chango, 2014). En cobayos, la criopreservación de espermatozoides epididimarios no ha logrado resultados efectivos con protocolos convencionales, por lo que sería necesario implementar protocolos de otras especies para incluirlos en los cobayos.

Recientemente se reportó la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cobayos (Galarza et al., 2023). En ese estudio se probaron dos diluyentes sintéticos elaborados a base de tris, ácido cítrico y glucosa (TCG) o fructosa (TCF), suplementados con 20 % de yema de huevo y 5 % de glicerol. Aunque se consideró exitosa la criopreservación de espermatozoides de cobayo, reportado por primera vez en forma detallada, la calidad espermática luego de la congelación y descongelación fue considerablemente menor a la alcanzada en un familiar silvestre del cobayo (*Galea spixii*; Silva et al., 2018; Moreira et al., 2021).

La criopreservación de espermatozoides de cobayos no demostró resultados favorables en la supervivencia celular, lo cual fue atribuido a una velocidad de enfriamiento inicial demasiado elevada, seguidas de una disminución de la misma (Galarza et al., 2023). Esto probablemente generó una ineficiente deshidratación celular y la producción de cristales intracelulares letales. Galarza et al., (2019) demostraron que la implementación de velocidades bajas de enfriamiento inicial (4 o 5 °C/min) continuadas de velocidades de enfriamiento más altas (25 a 60°C/min) después de la nucleación de hielo, brindaron mejores resultados de supervivencia espermática en carneros, ya que existió una menor exposición a soluciones hipertónicas extracelulares, permitiendo alcanzar la transición vítrea de forma más rápida (Woelders & Chaveiro, 2004).

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, se hipotetizó que probar un protocolo de congelación que utilice una velocidad inicial de enfriamiento hasta la nucleación más lenta, podría resultar en una calidad espermática mayor que la obtenida en un estudio previo (Galarza et al., 2023). Por tal motivo, el presente estudio tuvo como propósito la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cobayo mediante la aplicación de dos protocolos de congelación en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de dos protocolos de congelación de espermatozoides epididimarios de cobayo sobre las características espermáticas post-descongelación.

Objetivos específicos

- a. Determinar el efecto de dos protocolos de congelación sobre las características cinéticas e integridad de las membranas espermáticas post-descongelación.
- b. Evaluar el efecto de dos protocolos de congelación sobre la tasa de fragmentación de ADN post-descongelación.

Capítulo 2

Revisión de literatura

2.1 Anatomía del aparato reproductor del cobayo

El sistema reproductivo del macho está conformado por el pene, gónadas, conductos y glándulas sexuales accesorias. Su principal función es la formación y transporte de espermatozoides para lograr la fecundación en el sistema reproductor de la hembra (López García, Urbano Felices, & Cárdenas Povedano, 2012).

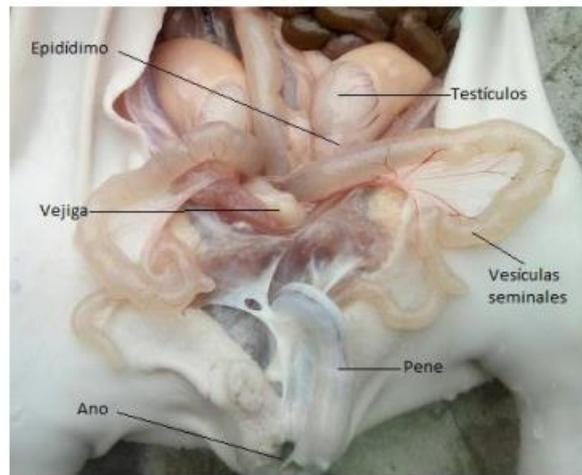


Figura 1. Aparato reproductor del cuy

Fuente: (Pinduisaca, 2018)

2.1.1. Pene

El pene corresponde al órgano copulador del cobayo que permite la liberación de semen y orina al exterior. Posee 4 cm de largo desde su raíz y 5 mm de ancho en promedio (Aragon Cruz, 2019). Se encuentra ubicado a nivel de la sínfisis púbica y está constituido por el glande, la porción intermedia y la raíz.

El glande (*Glans penis*) posee forma cilíndrica y mide 16 mm de longitud y 6 mm de diámetro aproximadamente (Márquez, Valencia, Chauca, & Verde, 2019). En su interior aloja al hueso *os penis* el cual le confiere rigidez al pene durante la cópula, también posee una saculación llamada saco intromitente característico de la especie (Almeida Herdoíza, 2016; Pinduisaca, 2018). Dentro de la saculación se encuentran las espículas peneanas que se definen como estructuras queratinizadas que se dirigen hacia el frente y hacia arriba y sobresalen durante la erección del pene, su funcionalidad no está definida del todo pero se cree que estarían involucradas a favorecer el orgasmo de la hembra (Almeida Herdoíza, 2016; Aragon Cruz, 2019).

La porción intermedia del pene está formada por los cuerpos cavernosos, los mismos que dan volumen al pene durante la excitación ya que se llenan de sangre. Por último, la raíz del pene lo mantiene unido a la pelvis (Aragon Cruz, 2019; López García et al., 2012).

2.1.2. Testículos

Los testículos de los cobayos tienen forma ovoide y miden 22 mm de largo y 18 mm de ancho aproximadamente, su peso varía entre 2.5 y 3 gramos (Hidalgo & Montes, 1995). Están ubicados lateralmente a la vejiga urinaria y normalmente se encuentran retraídos dentro del canal inguinal (Florin, 2015). Durante la monta, en la fase de excitación del cobayo, las gónadas se desplazan a través de los canales inguinales hacia un saco ciego, constituido por tejido subcutáneo y piel del área, todo esto gracias al músculo cremáster (Caguano Cevallos & Corrales, Trávez, 2012).

Las gónadas se encuentran recubiertas por la túnica vaginal y la túnica albugínea. De la túnica vaginal se originan la capa visceral que se encarga de cubrir a los testículos y epidídimos, se encuentra formada por mesotelio y tejido conectivo, el mismo que se une a la túnica albugínea, y la capa parietal la cual permanece unida al escroto cuando se realiza la orquiectomía (Dellmann, 1994). Por su parte, la túnica albugínea presenta un color blanquecino, es de apariencia sólida, irregular e inextensible, contiene fibras de colágeno, fibras elásticas, fibroblastos y una porción vascular. De ella emergen trabéculas hacia el mediastino testicular y dividen el parénquima testicular en lobulillos, los cuales contienen de uno a cuatro túbulos seminíferos contorneados rodeados de tejido laxo y fibras reticulares (Rodríguez, Madrid, Urdaneta, Aranguren, & Quintero, 2000).

Los túbulos seminíferos corresponden a la porción exocrina del testículo ya que producen espermatozoides. Son conductos sinuosos que se unen a la salida de cada lobulillo y forman los túbulos rectos que a su vez conforman la rete testis. De la rete testis se continúan los conductos eferentes que convergen en la porción dorsal del mediastino para luego llegar a la cabeza del epidídimo (Rodríguez et al., 2000). En el epitelio estratificado seminífero se ubican las células de Sertoli y las células germinales como las espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas (Bacha & Bacha, 2012; Dellmann, 1994). Las células mioideas peritubulares (MPT) se ubican adyacentes a los túbulos y las células de Leydig están en el espacio intertubular o intersticio (Lee & Cheng, 2008; Qing et al., 2018).

2.1.3. Epidídimo

El epidídimo es un conducto largo y enrollado que tiene como principales funciones la maduración, almacenamiento y transporte de los espermatozoides. El epidídimo consta de tres segmentos; cabeza, cuerpo y cola. La cabeza del epidídimo nace en el hilio del testículo

y se proyecta caudalmente formando el cuerpo, que se adhiere al cuerpo dorsal del testículo para luego formar la cola del epidídimo, que tiene la forma de un cono truncado de donde sale el conducto deferente y en cuya porción más externa se inserta el músculo cremáster externo (Zuñiga & Quisiyupanqui, 1995).

En la cabeza y cuerpo del epidídimo se lleva a cabo la maduración de los espermatozoides, los cuales posteriormente se almacenan en la cola, alcanzando un 75 % de espermatozoides en esta porción (Pino, 2014). Durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo, estos adquieren motilidad y sus receptores de superficie logran activarse (Zuñiga & Quisiyupanqui, 1995). Los espermatozoides al entrar a la cola del epidídimo, presentan la mayor capacidad fecundante (Pino, 2014).

A nivel celular, el epidídimo está constituido por las células basales y apicales, encargadas de realizar el proceso de pinocitosis y fagocitosis de solutos, proteínas y glicoproteínas, elementos de pequeño tamaño que se encuentran contenidos en el líquido seminal (Schimming & Domeniconi, 2013). La reabsorción de fluidos y solutos se da principalmente en la cabeza del epidídimo (Ortiz, 2000).

2.1.4. Conductos deferentes

Los conductos deferentes corresponden a estructuras tubulares que comunican la cola del epidídimo con la uretra. Tiene como principal función el desplazamiento de los espermatozoides hasta la desembocadura de la uretra (Chango, 2014; Solís & Chávez, 2015). Sus dimensiones varían, en su inicio poseen un diámetro de 0,1 mm y conforme avanzan en edad llegan a tener un diámetro de 0,25 mm en su porción final (Almeida Herdoíza, 2016; Aragon Cruz, 2019).

2.1.5. Uretra

La uretra cumple con dos funciones principales, el transporte y excreción de orina y de semen del cobayo. En cobayos adultos este conducto puede encontrarse obstruido debido a la sedimentación de las secreciones seminales (Chango, 2014; Pinduisaca, 2018; Tapia & Tello, 2016).

2.1.6. Glándulas sexuales accesorias

Las glándulas accesorias sintetizan sustancias serosas y mucosas que nutren y activan a los espermatozoides, asimismo limpian el canal uretral previo a la eyaculación. Las principales glándulas en los cobayos son las vesículas seminales, la próstata, coagulantes y bulbouretrales.

2.1.6.1. Vesículas seminales

Corresponden a dos sacos vermiformes de superficie lisa y de color transparente, tienen 12 cm de largo y 0,6 cm de diámetro. Su función principal es proveer al semen de la parte líquida (Aragon Cruz, 2019; Solís & Chávez, 2015). Su secreción está compuesta por 4 fracciones, una soluble, otra que contiene la proteína coagulante y las dos últimas son secreciones del epitelio de las vesículas (Aragon Cruz, 2019).

2.1.6.2. Próstata

Es una estructura bilobulada de tejido glandular que libera líquido prostático que nutre y protege a los espermatozoides. Cada lóbulo tiene entre 8 y 10 conductos excretores que desembocan en las vesículas seminales y conductos deferentes. Llega a medir 1,9 cm de largo y su ancho de 0,9 a 1,5 cm (Aragon Cruz, 2019; Almeida Herdoíza, 2016). Su secreción está compuesta por ácido cítrico y fosfatasas ácidas que le confieren su pH de 6,5, además posee zinc, magnesio y calcio (Aragon Cruz, 2019; Tapia & Tello, 2016).

2.1.6.3. Glándulas coagulantes

Son glándulas de forma piramidal lobulada, se sitúan en ambos lados de la línea media y poseen una coloración marrón. Están en estrecha comunicación con las glándulas vesiculares, ya que éstas facilitan la formación del tapón vaginal post coito y evitan el reflujo (Aucapiña & Marín, 2016).

2.1.6.4. Glándulas bulbouretrales

Son estructuras de forma oval con 0,8 cm de largo y 0,5 cm de ancho que producen una secreción de aspecto claro que facilita la movilidad espermática y que además se encarga de limpiar la uretra ya que neutraliza la orina (Martin, 2004).

2.2. Fisiología reproductiva del cobayo

Al llegar a la madurez sexual los cobayos tienen la capacidad de cubrir a las hembras y de producir un eyaculado de buena calidad. Aproximadamente el 70% de espermatozoides permanecen en el tapón vaginal, el 30% restante se dirige hacia el útero, en donde se mantienen hasta la ovulación y posterior fecundación de los ovocitos (Almeida Herdoíza, 2016).

2.2.1. Espermatogénesis

Es un evento que ocurre en los túbulos seminíferos (Figura 2) en el cual las espermatogonias, se transforman en espermatozoides, reduciendo a la mitad su número de cromosomas

(Almeda, 2001). Se encuentra controlado por el eje hipófisis-hipotálamo-gónadas (Franco & Uribe, 2012), su inicio está estimulado por la hormona folículo estimulante (FSH) y se da en los túbulos seminíferos (Simões et al., 2016) y su duración en cobayos es aproximadamente de 34 días en donde hay 4 ciclos de 8,5 días (Hajihoseini, Vahdati, Hosseini, Mehrabani, & Tamadon, 2017).

Comprende una división mitótica y dos divisiones meióticas que se dan en las células precursoras de los espermatozoides y consta de 3 etapas; el estadio de proliferación de espermatogonias, la diferenciación de espermatogonias en espermatocitos primarios, y la multiplicación de estos mediante dos divisiones meióticas sucesivas, dejando como resultado las espermátidas.

Cada espermatogonia tiene la capacidad de dar origen a cuatro espermatocitos primarios los cuales se mantienen unidos por puentes citoplasmáticos y comunicados con las células de Sertoli para su nutrición. Posteriormente mediante la primera meiosis se forman los espermatocitos secundarios con la mitad de cromosomas, continuando así con la segunda división meiótica en la cual se obtienen las espermátidas (Pinduisaca, 2018).

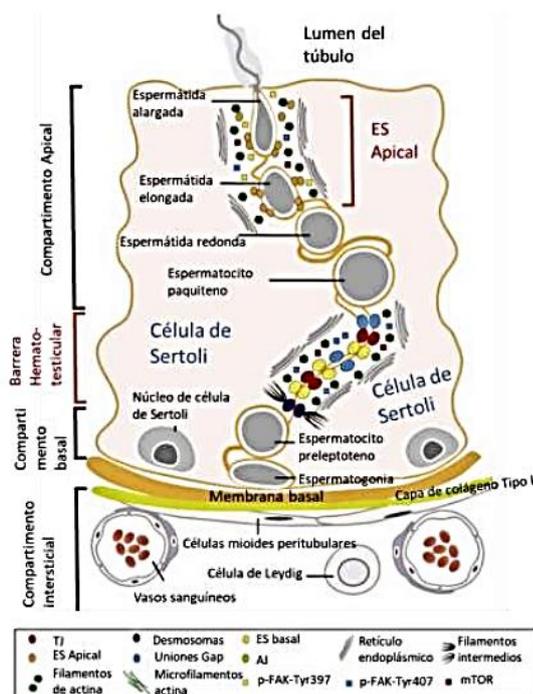


Figura 2. Esquema celular del túbulo seminífero

Fuente: Qing et al., (2018)

Una vez que las espermátidas se encuentran formadas, se inicia la etapa de espermiogénesis (Figura 3), en donde las células resultantes experimentan una fase de transformación que las convierte en espermatozoides, proceso inducido por las células de Sertoli y caracterizado por

cuatro fases de transformación: fase de Golgi, capuchón, acrosomal y de maduración (Olivera, Ruiz, Tarazona, & Giraldo, 2006). Este proceso implica la pérdida y alargamiento de gran parte del citoplasma, la migración de las mitocondrias hacia la pieza intermedia y la formación del flagelo.

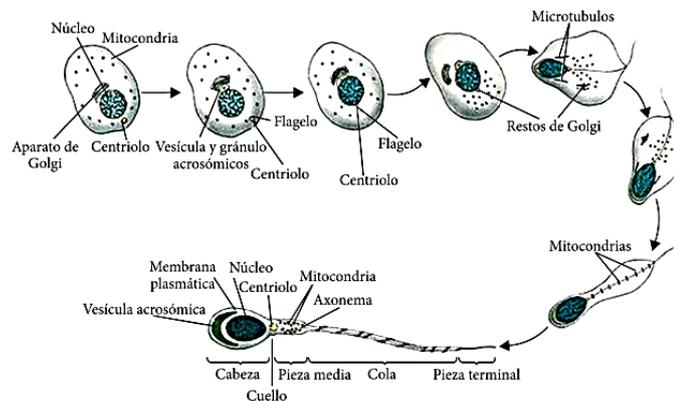


Figura 3. Espermiogénesis en mamíferos

Fuente: Gilbert (2005)

Finalmente ocurre la liberación de los espermatozoides desde las células de Sertoli hacia la luz de los túbulos seminíferos (Cabeza, 2019) proceso denominado como espermiación y que mediante movimientos peristálticos, los espermatozoides son desplazados desde la rete testis hasta los conductos eferentes y posteriormente hacia la cola del epidídimo en donde se almacenarán (Olivera et al., 2006).

2.3. Características morfológicas de los espermatozoides de cobayo

De acuerdo a la morfología espermática de los distintos animales se los puede clasificar en 2 grupos, los homomorfos y los heteromorfos; los cobayos están dentro del primer grupo, ya que mantienen una morfología constante de espermatozoides (Cabeza, Ordoñez, Meza, & Cucho, 2020).

Estructuralmente están constituidos por dos partes principales que son la cabeza y la cola (Tulsiani & Abou-Haila, 2012). La cabeza está formada por el acrosoma y el núcleo, mientras que la cola consta de cuatro segmentos: el cuello, pieza media, pieza principal y pieza final (Fawcett, 1965).

a) Cabeza

La cabeza del espermatozoide del cobayo es oval y mide alrededor de 8 micras, presenta un núcleo aplanado oval, que contiene una cromatina homogénea y muy compacta de ADN

unido a histonas espermáticas (Chango, 2014). La cabeza también posee vacuolas nucleares, que son cavidades presentes en el material nuclear. También existe una membrana nuclear que se encuentra íntimamente adherida al ADN, esta membrana posee poros solo en las regiones laterales que están por detrás del acrosoma (Cabeza, 2019).

b) Acrosoma

Es un saco membranoso en forma de capuchón que consta de una doble capa y está ubicado en el extremo anterior del núcleo. En el acrosoma se encuentran la acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas (Cabeza, 2019) como las esterases e hidrolasas ácidas, todas estas enzimas participan de forma activa durante el proceso de la fecundación (Chango, 2014).

c) Cola

Es un flagelo que mide alrededor de 108,3 micras y cuya función principal es permitir la movilidad espermática. La cola está dividida en 3 segmentos que son la pieza media, la pieza principal y la pieza final (Chango, 2014). En la pieza intermedia es en donde se implanta el flagelo y tiene relación con la vaina mitocondrial, cada espermatozoide puede tener de 80 a 85 mitocondrias. La pieza principal está compuesta por elementos fibrosos y es denominada como la hélice de la cola del espermatozoide. Por último, la pieza terminal, es muy similar a un cilio y está compuesta por varios filamentos bien unidos (Cabeza, 2019).

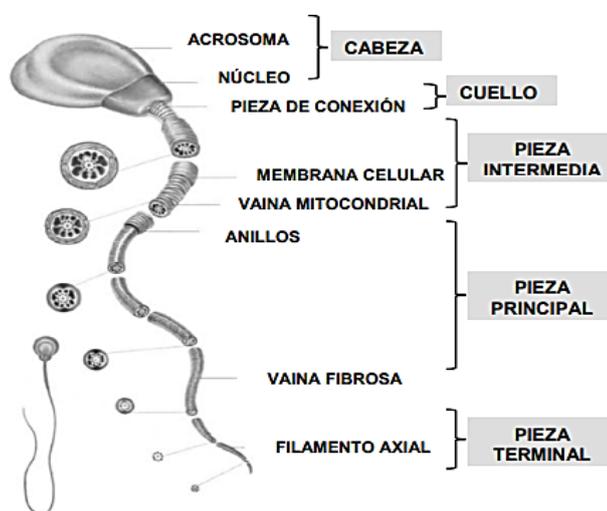


Figura 4. Estructura del espermatozoide de cobayo (Guinea Pig)

Fuente: (Morris, 1975)

2.4. Características seminales del cobayo

El semen corresponde a la suspensión celular líquida que posee los gametos masculinos y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino (Hafez, 1989). Es de color blanco nacarado, inoloro y su pH es de aproximadamente 7.4 (Pinduisaca, 2018). Los componentes químicos del plasma seminal proveen de energía a los espermatozoides por medio de la fructosa, glucosa y lípidos (Lahnsteiner, Patzner, & Weismann, 1993; Soengas et al., 1993). Así también, las sustancias de soporte, tales como sodio y potasio que estabilizan el balance osmótico (Zamiri & Khodaei, 2005) y el calcio, necesario para la estimulación de la esteroidogénesis en las células de Leydig (Henricks, 1991). Por otro lado, enzimas como la lactato deshidrogenasa (LDH), la aspartato amino transferasa (AST) y la fosfatasa alcalina (ALP), son esenciales para los procesos de sobrevivencia, motilidad y fertilidad de los espermatozoides (Turner & McDonnell, 2003).

Quispe, (2022) comenta que la calidad del semen va a depender de factores tales como la edad, estado nutricional, temperatura ambiental, enfermedades, etc. Por lo tanto, la evaluación macro y microscópica debe realizarse continuamente. Los aspectos macroscópicos están relacionados con volumen, grado de viscosidad, coloración, pH, entre otros y los microscópicos en la mayoría de casos requieren equipos especializados ya que mediante estos podremos determinar la capacidad fecundante de los cobayos.

2.5. Evaluación de la funcionalidad espermática

2.5.1. Integridad de la membrana plasmática y acrosomal

La evaluación de la integridad y funcionalidad espermática hace referencia a la valoración de las membranas plasmática y acrosomal. La primera interviene en el transporte de moléculas y en el proceso de adaptación del metabolismo al medio circundante (Aragon Cruz, 2019). Mientras que la segunda posee enzimas esenciales para la lisis de la zona pelúcida del ovocito y para desencadenar la reacción acrosomal (Barros, Bedford, Franklin, & Austin, 1967). Para evaluar la permeabilidad de estas membranas se utilizan pruebas como; el test de resistencia osmótica (ORT), el test de resistencia hiperosmótica o el test de endósmosis o hiposmótico (HOST) (Tapia & Tello, 2016).

Para este análisis también suele usarse una tinción de doble fluorescencia: un fluorocromo que puede atravesar las membranas dañadas o degeneradas ayudando a identificar las células muertas o dañadas, mientras que el otro colorante traspasa las membranas celulares que están intactas, identificando a las células vivas (Pinduisaca, 2018). El yoduro de propidio (PI) es el fluorocromo que más se utiliza para identificar las células muertas. Este elemento ingresa en espermatozoides que tienen la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y al ser excitado por la longitud de una onda apropiada (510-560nm), emite una fluorescencia roja (Estrada, 2014).

Al evaluar la integridad acrosomal hay muchos procedimientos, si se utiliza la citometría de flujo como método de análisis; el más común es el uso de una lectina conjugada con un fluorocromo. La lectina más utilizada es la PNA (peanut agglutinin) que se une específicamente a la membrana acrosomal interna de los espermatozoides. El uso de esta lectina conjugada con un fluorocromo como la fluoresceína (FICT) o ficoeritrina (PE), permite detectar a los espermatozoides que tienen la membrana acrosomal dañada, lo cual facilita el paso de la lectina y por tanto del fluorógeno al interior del compartimiento acrosomal (Muiño et al., 2005).

2.5.2. Cinética espermática

Los espermatozoides de cobayos tienen un movimiento curvilíneo con progresión irregular hacia adelante. La formación de rouleaux (paquetes unidos cabeza con cabeza) puede causar dificultades en la clasificación de la motilidad espermática en esta especie (Quispe, 2018). Los parámetros cinéticos de los espermatozoides son la motilidad total (MT) y progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad promedio (VAP), rectitud (STR), linealidad (LIN), oscilación (WOB), amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido del flagelo (BCF), los cuales son evaluados con varios sistemas computarizados como el sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) y el sistema ISAS (Integrated Sperm Analysis System) que proporcionan datos relativos de la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide (Ormachea, Calsin, & Zegarra, 2019).

La evaluación cinética del sistema CASA proporciona una serie de datos relativos a la velocidad y la trayectoria de cada espermatozoide, con lo que es posible obtener información precisa, objetiva y repetible sobre el porcentaje de células móviles que están presentes en la muestra y la calidad media de ese movimiento. Pero también, identifica subpoblaciones de espermatozoides con diferentes patrones de movimientos dentro de la misma muestra de espermatozoides (Abaigar, Holt, Harrison, & Del Barrio, 1999).

El análisis de la cinética espermática establece una clasificación entre espermatozoides estáticos y móviles. A los móviles se los clasifica según su trayectoria en progresivos y no progresivos (Cseh, Polichronopoulos, & Solti, 2004).

2.5.3. Integridad del ADN

La evaluación de la integridad del material genético permite identificar defectos de la molécula de ADN, los mismos que pueden causar efectos no deseables en los espermatozoides y en el embrión luego de la fecundación (Posado et al., 2011). Las anomalías del material genético se definen como defectos en la maduración o condensación nuclear, rupturas del ADN y anomalías cromosómicas (Sharma, Said, & Agarwal, 2004).

La fragmentación del ADN espermático en porcentajes mayores al 30% puede generar consecuencias como infertilidad en machos, complicaciones en la implantación del embrión, anomalías del desarrollo embrionario y abortos en fases avanzadas de la gestación (Silva & Gadella, 2006). Es un fenómeno que puede desencadenarse por factores ambientales, estrés térmico, espermatogénesis defectuosa o enfermedades preexistentes. Es por esto que se han establecido diversos métodos para su diagnóstico como la tinción naranja de acridina, tinción catiónica azul de toluidina, el ensayo cometa, la prueba de dispersión de cromatina espermática (SCD), entre otros (Quispe, 2022).

La tinción naranja de acridina, empleada en la presente investigación, se basa en su naturaleza metacromática, que, al unirse a la doble cadena de ADN, emite una coloración verde, mientras que, al unirse a cadenas simples de ADN, refleja una coloración roja-anaranjada. Los resultados de dicha tinción se expresan como el porcentaje de espermatozoides con fluorescencia verde sobre los espermatozoides totales (Cortés-Gutierrez, Davila-Rodríguez, López-Fernández, Fernández, & Gosálvez, 2007; Eggert-Kruse et al., 1996; Shamsi, Kumar, & Dada, 2008).

2.5.4. Actividad mitocondrial

Las mitocondrias están involucradas en la producción de ATP y participan en diversos procesos fisiológicos como la homeostasis del calcio, apoptosis y metabolismo de los aminoácidos (Logan, 2007; Suen, Norris, & Youle, 2008; Tait & Green, 2012). Su evaluación nos permite obtener información acerca de la calidad del esperma debido a que las mitocondrias contienen su propio ADN y su potencial de membrana puede ser fácilmente examinado *in vitro* para determinar la integridad del ADN y su motilidad (Amaral & Ramalho-Santos, 2010; Carra et al., 2004).

La evaluación del potencial de membrana mitocondrial se realiza con colorantes fluorescentes y tienen como objetivo evaluar la salud mitocondrial y la calidad celular (Liesa, Palacin, & Zorzano, 2009). También podemos mencionar a la citometría de flujo, la cual es usada para evaluar espermatozoides de buena calidad y examinar la integridad de sus mitocondrias (Marchetti, Obert, Deffosez, Formstecher, & Marchetti, 2002).

2.6. Recuperación de espermatozoides epididimarios

Para la obtención de los espermatozoides inicialmente se deben extirpar quirúrgicamente los testículos completos del animal o recuperarlos *post mortem*. Posteriormente se disecciona el epidídimo y se coloca una cánula en el conducto deferente, se secciona la unión entre la cabeza y la cola del epidídimo y se realiza un lavado retrógrado con el diluyente adecuado. Todo este proceso se denomina “swim out” (Serres, 2012; Tapia & Tello, 2016). Es una

técnica que resulta muy útil, pero se debe recordar que los espermatozoides no se encuentran en contacto directo con las sustancias protectoras naturales del plasma, haciendo que su capacidad de fertilización y su resistencia a procesos de congelación sean extremadamente bajas (Tapia & Tello, 2016).

2.7. Criopreservación de semen de cobayo

La criopreservación es una técnica compleja que debe ser diseñada de acuerdo a la especie ya que la bioquímica del semen y la fisiología de los espermatozoides varía entre las mismas (Durrant, 1984). Debemos considerar también las diferencias que existen entre gametos del eyaculado y aquellos que son extraídos del epidídimo, ya que las variaciones morfológicas y funcionales pueden influir en la estabilidad de la membrana espermática cuando se enfrenta al choque térmico y a la presión osmótica (Franco, 2007).

Esta biotecnología consiste en la refrigeración previa de las muestras, para estabilizarlas a temperaturas entre los 4-5°C y después alcanzar temperaturas bajo cero, llegando así a los -196°C, temperatura a la cual se criopreservan en nitrógeno líquido por tiempo indefinido (Chango, 2014; Ribeiro-Peres et al., 2014).

La finalidad de la congelación de las células espermáticas radica en la formación de bancos de material genético, logrando así disponer de dicho material sin plazo de vencimiento, aumentando la eficiencia en la reproducción animal (Amirat et al., 2004). Sin embargo, es una biotecnología que en la mayoría de casos, trae consigo una disminución en la capacidad fecundante y en la fertilidad al compararse con el semen fresco (Gonzalez, 2004).

Su eficiencia está relacionada con las velocidades de congelación utilizadas, ya que el tipo de curva de congelación va a tener influencia directa sobre las lesiones celulares (Moore, Squires, Bruemmer, & Graham, 2006). La crioconservación produce una serie de alteraciones espermáticas como la pérdida de la movilidad espermática (Ortiz, 2000), cambios en la morfología de los espermatozoides, incluyendo daños en el acrosoma, las mitocondrias y la cola. Por lo tanto, la proporción de espermatozoides completamente funcionales, capaces de retener las membranas intactas y el movimiento de la cola y la actividad mitocondrial normales después de la descongelación es baja (Gonzalez & Cornejo, 2009).

Los métodos de congelación existentes son el convencional y el automático. En el protocolo convencional, después de haber realizado la refrigeración, las pajuelas se colocan en gradillas metálicas a diferentes alturas dentro de una caja de poliestireno, para después ser sumergidas en nitrógeno líquido. Por otra parte, la congelación automatizada consiste en colocar las pajuelas en un congelador automático y seleccionar la curva de congelación más adecuada (Vasconcelos-Filho, 2010).

Hasta el momento hay escasa información sobre la criopreservación de espermatozoides de cobayos. Elder et al., (2013), reportaron 10% de motilidad y 50% de integridad acrosomal luego de la congelación, utilizando un diluyente compuesto por yema de huevo, 15% de glicerol, 10% de Ficoll, y 2% de urea. Recientemente, Galarza et al. (2023) lograron similares resultados diluyendo espermatozoides epididimarios con TCG (tris, ácido cítrico y glucosa) más 20% de yema de huevo y 5% de glicerol.

2.7.1. Daños producidos durante la crioconservación

Los espermatozoides sometidos a procesos de congelación sufren daños estructurales y bioquímicos como capacitación prematura, debido a la presencia elevada de Ca intracelular que activa las proteínas-quinasas, generando una alteración de membranas y la reacción acrosomal (Ferrián, 2007; Stornelli, Tittarelli, Savignone, & Stornelli, 2005). Durante la criopreservación también se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que afectan drásticamente la funcionalidad espermática (García Vera, 2014; Stornelli et al., 2005); se forman cristales intracelulares letales por el descenso brusco de la temperatura (Chango, 2014; García Vera, 2014) y se produce deshidratación celular extrema por un descenso muy lento de la temperatura (Chango, 2014; Stornelli et al., 2005) y por la presencia de crioprotectores.

La formación de cristales intracelulares está provocada por el descenso muy rápido en la temperatura, impidiendo que los líquidos intracelulares salgan y se formen cristales dentro del espermatozoide (Chango, 2014; García Vera, 2014). Por otro lado, en la deshidratación celular extrema, los espermatozoides son expuestos a velocidades de enfriamiento demasiado lentas, lo que produce un colapso de la membrana plasmática (Chango, 2014; Stornelli et al., 2005).

2.7.1.1. Shock térmico

El shock térmico ocurre en respuesta del espermatozoide frente a una situación de estrés, en este caso al descenso de la temperatura. Los daños que se producirán van a depender de la disminución de la velocidad de enfriamiento a la que estén sometidos (Morel, 1999).

Se ha comprobado que al llegar a temperaturas menores a los 20°C el espermatozoide experimenta cambios biofísicos a nivel de la membrana plasmática, mientras que entre temperaturas de 0°C y -20°C atraviesan procesos de descompensación iónica que generan shock térmico. Este evento se puede observar en aquellos espermatozoides que presentan la cola doblada, una baja motilidad y movimientos circulares, manifestando así la permeabilidad de membrana y pérdida de iones (Palacios, 2005).

2.7.1.2. Daños físicos y químicos

Durante la criopreservación los espermatozoides sufren daños físico-químicos, debido al estrés osmótico generado con la deshidratación, los daños de membrana y la presencia de cristales de hielo (Palacios, 2005).

La formación de hielo a nivel intra y extracelular destruye a las células, principalmente por la presión del hielo en expansión y por el daño osmótico que produce la acumulación de sales (Ortega-Ferrusola, Sotillo-Galán, Varela-Fernández, & Gallardo-Bolaños, 2008). Los cristales inician su formación cuando existen temperaturas menores a -5°C , y los solutos permanecen separados de los cristales y se acumulan en la fracción de agua no congelada (Palacios, 2005).

La congelación genera un aumento de la presión osmótica, ya que el agua intra celular tarda más tiempo en formar cristales que el agua extra celular (Morel, 1999), dando como resultado la salida de agua al exterior mediante gradiente osmótico y la consecuente deshidratación del espermatozoide.

2.7.1.3. Daños en las membranas espermáticas

Los principales daños corresponden a alteraciones en los receptores de membrana y proteínas, que incapacitan su capacidad de reconocimiento y transporte de agua e iones (Ortega-Ferrusola et al., 2008). Palma (2001) comenta que, al alcanzar los 5°C de temperatura, la permeabilidad del ion calcio aumenta, dificultando su eliminación por medio de las bombas de calcio, alcanzando niveles tóxicos para el espermatozoide y generando daños en el acrosoma.

2.7.1.4. Daño oxidativo

Las células obtienen sus nutrientes a partir de procesos oxidativos, uno de los más importantes es la cadena respiratoria realizada en las mitocondrias, fuente principal de ATP y de radicales libres (ROS). Los radicales libres son compuestos que poseen un electrón no pareado y que actúan como moléculas altamente reactivas. Generan daños cuando reaccionan con biomoléculas de las cuales obtienen electrones para estabilizarse (Membrillo et al., 2003).

Una elevada carga de ROS genera estrés oxidativo, dañando la capa lipídica de la membrana, modificando su fluidez y permeabilidad, pudiendo causar fragmentación del ADN y muerte celular. Además se disminuye la capacidad fecundante de los espermatozoides viables principalmente por el daño acumulativo de los radicales libres (Membrillo et al., 2003).

Es importante mencionar que una producción controlada de ROS influye positivamente en procesos fisiológicos como la capacitación espermática, reacción del acrosoma, hiperactivación y fusión espermatozoide-ovocito (Morel, 1999).

Capítulo 3

Metodología

3.1. Área de estudio

Los machos donantes se obtuvieron de un centro de faenamiento comercial ubicado en el sector Isabela Católica, cantón Cuenca provincia del Azuay (2°52'41".855, 78°59'26".347). Los testículos fueron recolectados de 22 cobayos adultos entre 9 a 12 meses de edad y con un peso de 700 a 1000 gramos aproximadamente. Los procedimientos de recuperación, procesamiento, congelación, descongelación y análisis espermático se realizaron en el laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal de la Universidad de Cuenca ubicado en la Granja Irquis, cantón Cuenca, provincia del Azuay (3°04'48.1"S 79°04'31.0"W, altitud 2.648 metros sobre el nivel del mar).

3.2. Diseño experimental

Se utilizaron 44 muestras espermáticas epididimarias recuperadas de los testículos de 22 cobayos. Las muestras fueron recuperadas mediante flujo retrógrado de la cola de los epidídimos administrando 1 ml de TCG-YH. Se determinó la concentración y las muestras se incubaron con 1% de polivinilpirrolidona en TCG-YH por 10 minutos. Posteriormente se conformaron los pools de dos muestras epididimarias heterólogas de manera aleatoria. Cada pool (n=22) se dividió en dos alícuotas de igual volumen. Los dos grupos de muestras fueron refrigeradas por 60 minutos a 5 °C y luego diluidas en igual volumen de medio conteniendo 10% de glicerol. Se envasaron en pajuelas de 0,25 ml y se enviaron a refrigeración a 5°C por 60 minutos adicionales. Se aplicaron dos protocolos de congelación: 1) Protocolo 1: Congelación convencional (CC) mediante la exposición de las muestras a vapores de NL₂ usando una caja criogénica con doble rampa (24 y 10 cm), y 2) Protocolo 2: Congelación con velocidades de enfriamiento programada (CP) usando el biocongelador TK-4000® y velocidades de enfriamiento por aceleración (10 y 50°C/min). Luego de la congelación, las muestras se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. Cada grupo de material espermático se procesó por duplicado para determinar los parámetros de calidad post-descongelación.

3.3. Preparación de los diluyentes

Los diluyentes fueron preparados siguiendo los procedimientos descritos por Galarza et al. (2023) con algunas variaciones. El diluyente utilizado en esta investigación fue elaborado a base de tris, ácido cítrico (base – ácido) y glucosa (TCG). A continuación, se indica la composición del diluyente (**Tabla 1**).

Tabla 1. Diluyente sintético Tris, ácido cítrico y glucosa (TCG)

Reactivo	Cantidad
Tris	11,4 g
Ácido cítrico	6,6 g
Glucosa	1,8 g
Penicilina	240 mg
Estreptomina	300 mg
Agua milli-Q	300 ml

pH: 6,8 a 7,2. Osmolaridad: 310 a 340 mMol/kg

3.3.1. Adición de yema de huevo y glicerol al diluyente base (TCG) para la congelación

Al diluyente base se le agregó 20% de yema de huevo (20%YH) tal como se indica en la tabla a continuación. Luego a esta fracción se le añadió 10% de glicerol.

Tabla 2. Diluyente base más yema de huevo y glicerol para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cobayos

Reactivo o medio	Porcentaje
TCG-YH	
TCG	80%
Yema de Huevo	20%
Total	100%
TCG-YH-Gly	
TCG-YH	90%
Glicerol	10%
Total	100%

3.4. Obtención de testículos y transporte

Los testículos de los cobayos se obtuvieron de animales faenados. Se inspeccionaron los testículos para verificar que conservaran estructuras necesarias como epidídimos y conductos deferentes, para su posterior procesamiento en el laboratorio. Los testículos se transportaron en fundas ziploc con suero fisiológico y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta llegar al laboratorio.

3.5. Recuperación de espermatozoides epididimarios

3.5.1. Materiales

Para recuperar los espermatozoides epididimarios se utilizaron los materiales indicados en la Tabla 3.

Tabla 3. Materiales para la recuperación espermática

Físicos	Químicos
Suero fisiológico	Diluyente TCG-YH
Papel secante estéril	
Aguja fina 24x 1'	
Bisturí	
Caja Petri	
Tubo Eppendorf 1,5 ml	

3.5.2. Procedimiento

Los testículos se lavaron en el laboratorio con suero fisiológico y se secaron con papel secante. Se diseccionaron los epidídimos, tratando de mantener intacto la cola del epidídimo y su conducto deferente (1cm de longitud). La recuperación de los espermatozoides se la realizó mediante flujo retrógrado, que consistió en introducir a través del conducto deferente, una aguja de 24 x 1' con la punta recortada (sin bisel) y se administró 1 ml del diluyente TCG-YH en cada epidídimo. Posteriormente se realizaron tres cortes transversales a nivel de la cola del epidídimo y el líquido obtenido se colectó en una caja Petri. Por último, el líquido recuperado se colocó en tubos Eppendorf de 1,5 ml y se midió su volumen y la concentración. Esta última se determinó por conteo celular en una cámara de Neubauer.

3.6. Criopreservación espermática**3.6.1. Materiales**

La criopreservación de espermatozoides epididimarios implicó el uso de diversos materiales y equipos. Estos se enumeran en la Tabla 4.

Tabla 4. Materiales para la criopreservación espermática

Físicos	Químicos
Congelador TK Compacta 4000®	Nitrógeno líquido (NL ₂)
Caja de poliestireno (29 x 31 x 31 cm de largo, ancho y alto respectivamente)	
Rampa de dos niveles (24 y 10 cm del nivel de NL ₂)	

3.6.2. Procedimiento

A las muestras obtenidas con el diluyente TCG-YH con una concentración promedio de 37 ± 25 millones de espermatozoides, se las colocó en refrigeración durante 60 minutos a 5°C , y posteriormente se les agregó un volumen similar de TCG-YH-Gly, con lo cual se obtuvo una concentración final del 5% de glicerol. Las pajuelas de 0,25 ml fueron esterilizadas, enfriadas y rotuladas para posteriormente almacenar en ellas las muestras espermáticas. Una vez conformadas las pajuelas, fueron selladas con alcohol polivinílico y se colocaron en refrigeración a 5°C durante 60 minutos adicionales antes de ser congeladas.

En el protocolo 1 de congelación, se aplicó la curva de criopreservación usada por Galarza et al., (2023). Las pajuelas se sometieron a vapores de nitrógeno estático dentro de una caja de congelación de poliestireno con un volumen de 1,7 litros de nitrógeno líquido (NL_2). Inicialmente las muestras espermáticas se colocaron durante 3 minutos en una rampa a 24 cm sobre el nivel de NL_2 , y luego durante 2 minutos en una rampa inferior a 10 cm sobre el NL_2 . Inmediatamente se sumergieron en el NL_2 según lo indicado por Galarza et al., (2023). En la primera rampa (24 cm del nivel del NL_2) el descenso de la temperatura desde $+5$ a -118°C fue de aproximadamente $41^{\circ}\text{C}/\text{min}$. En la segunda rampa (10 cm del nivel del NL_2) la temperatura descendió desde -118 a -148°C a una velocidad aproximada de $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Por otro lado, para el protocolo 2 de congelación, las muestras espermáticas se colocaron en el congelador automático programado para enfriar las muestras de la siguiente forma: de 5 a -10°C la temperatura descendió a una velocidad de $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$; de -10 a -140°C la tasa de enfriamiento fue de $50^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (programa P1.S6). Luego de alcanzar los -140°C las muestras se sumergieron en NL_2 . Para ambos protocolos de congelación las pajuelas se almacenaron a -196°C hasta su descongelación y análisis. La descongelación se realizó en un baño María a 37°C durante 30 segundos.

3.7. Análisis de los parámetros cinéticos

3.7.1. Materiales

Tabla 5. Materiales para el análisis de los parámetros cinéticos

Biológicos		Físicos
Muestras	espermáticas	Sistema computarizado CASA
congeladas y descongeladas		Microscopio
		Porta y cubre objetos
		Micropipetas y sus puntas

3.7.2. Procedimiento

Los parámetros cinéticos espermáticos de las muestras frescas diluidas y post-descongelación, fueron determinados mediante el análisis espermático asistido por computadora (CASA; Sperm Class Analyzer, SCA® 2018, v6.0.4 software, Microptic S.1., Barcelona, España) acoplado a un microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse Ci-L, Nikon Instruments Inc., New York, USA). Se evaluó un mínimo de tres campos y 200 trayectos de espermatozoides a 10X de magnificación (velocidad de adquisición de imagen 25 cuadros/segundo). Con la ayuda de la micro pipeta se tomaron 5 μ L de la muestra a analizar y se colocaron en un portaobjetos y luego se colocó un cubreobjetos.

Las variables cinéticas que se evaluaron fueron: porcentaje de motilidad total (MT), porcentaje de motilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL, μ m/s), velocidad rectilínea (VSL, μ m/s), velocidad promedio (VAP, μ m/s), rectitud (STR, %), linealidad (LIN, %), oscilación (WOB, %), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μ m), y frecuencia de batido de flagelo (BCF, Hz).

3.8. Análisis de la integridad de las membranas plasmática y acrosomal.

3.8.1. Materiales

Tabla 6. Materiales para el análisis de la integridad de membranas espermáticas

Físicos		Químicos
Microscopio	de	Ioduro de Propidio (PI)
epifluorescencia		PNA-FICT (Aglutinina)
Porta y cubreobjetos		Medio HEPES
Micropipetas		

3.8.2. Procedimiento

Para la evaluación de la integridad de las membranas plasmática y acrosomal post-descongelación se usó una tinción de doble fluorescencia, compuesta por ioduro de propidio (PI) e isotiocianato de fluoresceína conjugado con aglutinina de maní (*Arachis hypogaea*) (PNA-FITC). Para ello se siguió el procedimiento indicado por Galarza et al., (2023). El estado de las membranas espermáticas se determinó utilizando un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse; E200 epifluorescencia D-FL; Nikon Instruments Inc., New York, USA).

Según el estado de las membranas plasmática y acrosomal la prueba de fluorescencia permitió evaluar simultáneamente cuatro subpoblaciones de espermatozoides:

- a) Espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA, %).
- b) Espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma dañado (IPDA, %).
- c) Espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma intacto (DPIA, %).
- d) Espermatozoides con membrana plasmática dañada y acrosoma dañado (DPDA, %).

3.9. Análisis de la integridad del ADN

3.9.1. Materiales

Tabla 7. Materiales para el análisis de la integridad del ADN espermático

Físicos		Químicos
Microscopio	de	Naranja de acridina
fluorescencia		Solución salina fosfatada (PBS)

3.9.2. Procedimiento

Este procedimiento se realizó con la tinción fluorescente naranja de acridina, de acuerdo al protocolo indicado por Martins et al. (2007) con algunas modificaciones. Se hicieron frotis con 10 μ L de las muestras descongeladas en portaobjetos rotulados, y se colocaron durante 12 horas en solución fijadora (metanol y ácido acético en proporción 3:1). Los frotis se incubaron en solución tampón (80 mMol/L de ácido cítrico y 15 mMol/L de Na_2HPO_4 , pH 2,5) a 75 °C durante 5 min para probar la estabilidad de la cromatina. Posteriormente, fueron teñidos con el fluorocromo naranja de acridina (0,2 mg/mL). Luego de lavar los frotis con agua bidestilada (1 o 2 veces por 2 segundos) para remover el fluorocromo, y estando aún húmedos, se colocaron los cubreobjetos y se evaluaron con el microscopio de epifluorescencia (490/530 nm). Los espermatozoides con ADN normal se identificaron con fluorescencia verde, mientras que los que tenían el ADN alterado se observaron con fluorescencia en un rango entre el amarillo verdoso al rojo naranja. En cada frotis se contaron 100 espermatozoides y los resultados se expresaron en porcentaje.

3.10. Análisis estadístico

Los datos fueron sujetos a la prueba de Shapiro Wilk con la finalidad de comprobar el cumplimiento del supuesto de normalidad. Al no cumplirse, las variables porcentuales (proporción de espermatozoides con alteración o no de las membranas espermáticas; proporción de espermatozoides con el ADN íntegro) fueron transformadas al arcoseno y las numéricas (variables cinéticas) al logaritmo 10. Las variables continuas se analizaron

mediante análisis de varianza y las diferencias entre medias comparadas con la prueba de Tukey. Las proporciones se analizaron mediante ANOVA unidireccional. En ambos tratamientos se consideró como variable independiente la curva de congelación. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico SAS. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Cinética espermática

Los valores promedios de las variables cinéticas fueron significativamente mayores en las muestras diluidas-frescas que en las congeladas y descongeladas ($P < 0,01$), independientemente del método de congelación (Tabla 8). Con excepción de MOT-T, MOT-P, STR, LIN y WOB, los demás parámetros cinéticos fueron significativamente mayores en el protocolo de congelación convencional que en el protocolo de congelación programable; sin embargo, la VCL-R, fue significativamente mayor en el protocolo de criopreservación programable que en el protocolo convencional de congelación.

Tabla 8. Parámetros cinéticos (promedio \pm error estándar de la media) de espermatozoides epididimarios de cobayos frescos y diluidos con TCG-20YH, y congelados - descongelados en vapores de NL2 estático.

Variables cinéticas	Muestras frescas-diluidas	Congelación convencional	Congelación programable
MOT-T	50,5 \pm 0,8 ^a	4,4 \pm 0,8 ^b	4,0 \pm 0,8 ^b
MOT-P	25,3 \pm 0,5 ^a	1,2 \pm 0,7 ^b	1,7 \pm 0,7 ^b
VCL	59,7 \pm 1,9 ^a	44,6 \pm 1,9 ^b	34,9 \pm 2,0 ^c
VCL-R	88,1 \pm 1,9 ^{a, c}	75,9 \pm 3,3 ^{b, c}	80,8 \pm 4,1 ^c
VAP	31,3 \pm 1,3 ^a	23,7 \pm 1,3 ^b	17,8 \pm 1,3 ^c
VSL	20,9 \pm 0,8 ^a	12,9 \pm 0,7 ^b	9,6 \pm 0,8 ^c
VSL-R	42,7 \pm 1,7 ^{a, d}	31,7 \pm 1,9 ^b	39,7 \pm 2,5 ^d
STR	61,1 \pm 1,3 ^a	53,5 \pm 1,2 ^b	54,0 \pm 1,3 ^b
LIN	36,2 \pm 1,2 ^a	28,1 \pm 1,1 ^b	27,3 \pm 1,2 ^b
WOB	57,0 \pm 1,1 ^a	50,8 \pm 1,1 ^b	48,0 \pm 1,2 ^b
ALH	2,9 \pm 0,08 ^a	2,3 \pm 0,08 ^b	1,8 \pm 0,05 ^c
BCF	5,5 \pm 1,2 ^a	3,2 \pm 0,2 ^b	2,7 \pm 0,2 ^c

Mot-T: motilidad total; **Mot-P:** motilidad progresiva; **VCL:** velocidad curvilínea; **VCL-R:** velocidad curvilínea progresiva; **VAP:** velocidad media; **VSL:** velocidad lineal; **VSL-R:** velocidad lineal progresiva; **STR:** rectitud; **LIN:** linealidad; **WOB:** oscilación; **ALH:** amplitud lateral de la cabeza; **BCF:** frecuencia de batida de flagelo. Letras diferentes en la misma línea difieren: ^{a-b-c} $P < 0,01$; ^{b-d} $P < 0,05$

4.2. Integridad de las membranas espermáticas

Diferencias significativas ($P < 0,05$) entre el protocolo de congelación convencional y programable fueron obtenidas en las muestras post-descongelación en diferentes subpoblaciones de espermatozoides (Tabla 9). Como se observó en la cinética espermática,

las muestras de espermatozoides epididimarios tuvieron mejores promedios de integridad de la membrana acrosomal y plasmática en el protocolo convencional.

Tabla 9. Integridad de membranas en espermatozoides epididimarios de cobayos luego de la descongelación en las distintas subpoblaciones en muestras congeladas con un protocolo convencional y programable en vapores de NL_2 estático.

Subpoblación de espermatozoides (%)	Congelación convencional	Congelación programable	Significancia (Valor P)
IPIA	6,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	0,0030
IPDA	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,5514
DPIA	18,9 ± 0,5	17,7 ± 0,5	0,0165
DPDA	74,4 ± 0,7	76,57 ± 0,7	0,0385
IMP	6,7 ± 0,3	5,8 ± 0,3	0,0151
IMA	24,9 ± 0,6	22,7 ± 0,6	0,0056

IPIA: membrana plasmática intacta, acrosoma intacto; **IPDA:** membrana plasmática intacta, acrosoma dañado; **DPIA:** membrana plasmática dañada, acrosoma intacto; **DPDA:** membrana plasmática dañada, acrosoma dañado; **IMP:** integridad membrana plasmática; **IMA:** integridad membrana acrosomal.

El porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática intacta y acrosoma intacto (IPIA) fue mayor ($P < 0,05$) en muestras congeladas con el protocolo convencional en comparación con las que se congelaron con el protocolo programable. Para el porcentaje de IPDA no hubo diferencia significativa entre los dos métodos de congelación, aunque sus valores fueron realmente bajos en ambos grupos. En tanto que para el porcentaje de DPIA las muestras congeladas mediante el protocolo convencional tuvieron un porcentaje mayor que las congeladas con el protocolo programable.

Por el contrario, el análisis del DPDA indicó un mayor porcentaje ($P < 0,05$) en las muestras congeladas con el método programable que con el convencional. Este porcentaje de DPDA comprobó el efecto del congelador automático sobre las muestras espermáticas ya que hubo mayor daño de ambas membranas espermáticas.

De la misma manera, al usar la congelación programable se observó un menor porcentaje de integridad de las membranas plasmática y acrosomal al compararlos con los porcentajes del protocolo convencional (Tabla 9).

4.3. Fragmentación del ADN espermático

En la Figura 5 se presentan los porcentajes obtenidos de la evaluación de fragmentación del ADN espermático epididimario mediante fluorescencia con naranja de acridina.

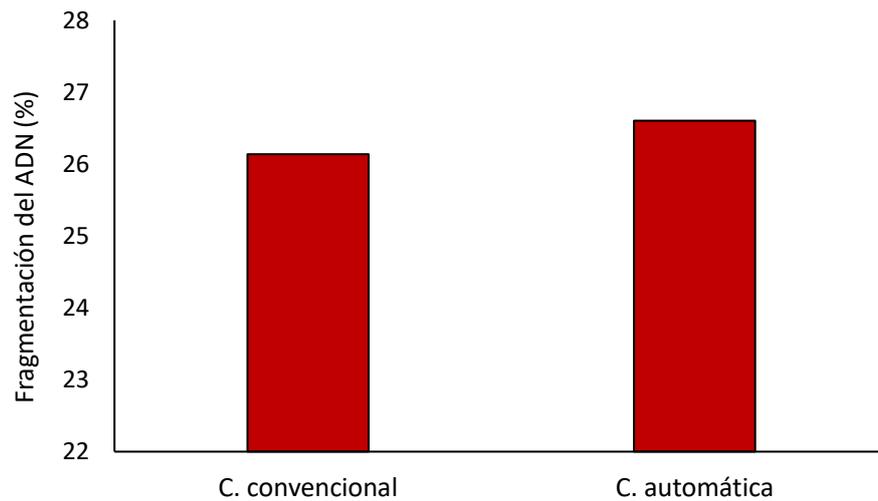


Figura 5. Porcentajes de espermatozoides con ADN fragmentado en muestras epididimarias de cobayo congeladas mediante un protocolo convencional y programable.

Discusión

El presente trabajo de investigación evaluó el efecto de dos protocolos de congelación con diferentes velocidades de enfriamiento sobre las características espermáticas post-descongelación de espermatozoides epididimarios de cobayos. Los resultados evidenciaron que luego de la descongelación, con excepción de ambas motilidades y los parámetros de progresión, las variables cinéticas de los espermatozoides disminuyeron drásticamente. Los resultados obtenidos en nuestro estudio son consistentes a los obtenidos por Galarza et al., (2023) en cobayos, en el que también la cinemática se redujo significativamente después del procesos de congelación, independientemente del tipo de diluyente evaluado.

La criopreservación implica, en primer lugar, exponer a los espermatozoides a una sustancia crioprotectora, que en nuestro caso fue el glicerol, un crioprotector penetrante que causa deshidratación celular desde el interior de los espermatozoides, y que tiene efecto citotóxico (Paal et al., 2016; Silva et al., 2018). En segundo lugar, las muestras espermáticas son sometidas a enfriamiento, y durante el proceso se producen cristales que causan daños celulares irreversibles, y alteran la composición de las membranas plasmática y acrosomal, como se hizo evidente en este estudio, lo cual compromete la cinética espermática y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Grötter et al., 2019). Probablemente, esto causó alteraciones estructurales y funcionales en los espermatozoides que afectaron seriamente la motilidad total y progresiva y demás variables cinéticas, así como también, la integridad de las membranas plasmática y acrosomal.

La motilidad es un parámetro importante a tomar en cuenta, pues los espermatozoides inmóviles difícilmente pueden fecundar. El porcentaje de motilidad total en las muestras frescas epididimarias en esta investigación fue alrededor de 51%, aproximadamente 20 puntos porcentuales por debajo al observado en un estudio previo en cobayos, usando el mismo diluyente (Galarza et al., 2023). Otros autores como Aragon Cruz (2019) y Cabeza et al., (2020) reportaron un 72,15% y 69,40% de motilidad total en muestras de semen colectadas por electroeyaculación, mientras que Tapia & Tello (2016), Chango (2014) y Yucra (2013) obtuvieron 46, 73 y 26,6% respectivamente de motilidad en espermatozoides epididimarios de cobayos.

En cuanto a la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, en nuestra investigación se obtuvieron mejores resultados en las muestras criopreservadas con el protocolo de congelación convencional, con un porcentaje de 6,7 y de 24,9% respectivamente, en comparación con la congelación programable en la cual se obtuvieron porcentajes de 5,8% para integridad de membrana plasmática y de 22,8% para la membrana acrosomal. Galarza

et al. (2023), usando la misma solución crioprotectora (TCG-YH + 6% de glicerol) y similar curva de congelación convencional logró una integridad de membrana plasmática y acrosomal de 15,2 y 63,8% % respectivamente. Similarmente, Elder et al. (2013), lograron una motilidad de 10% y una integridad de membrana de 50%, utilizando un medio de congelación a base de yema de huevo, glicerol (15%), Ficoll PM70 (10%) y urea (2%), resultados que también superaron a los obtenidos en la presente investigación. Luego de una revisión bibliográfica exhaustiva, no se encontraron estudios adicionales sobre la criopreservación de muestras espermáticas en cobayos domésticos.

En relación a la integridad del ADN espermático, se evidenció que no hubo diferencias estadísticas entre ambos protocolos de congelación. Actualmente es bien conocido que la criopreservación de espermatozoides incrementa la producción de ROS, causa estrés oxidativo y disminuye la integridad del ADN (Baumber et al, 2003; Fraser y Strzeżek, 2007; Galarza et al., 2019; Thomson et al., 2009).

El elevado porcentaje de fragmentación del ADN es consistente con los hallazgos de la cinética y la integridad de membranas espermáticas post-congelación observados en este estudio, y mostraron claramente un efecto nocivo de los dos protocolos de congelación sobre la calidad espermática. No obstante, dados los resultados de este estudio la congelación lenta produjo menor criodañó que la congelación programable. En base a los hallazgos de Galarza et al. (2023), cuya investigación se realizó en nuestro laboratorio, se hipotetizó que una velocidad inicial de enfriamiento más lenta podría mejorar la calidad espermática. En este estudio se utilizó el mismo protocolo de congelación con dos rampas usado por Galarza et al. (2023), en el que la velocidad inicial de enfriamiento (de 5 a -118 °C) fue de 41°C/min (rampa 1; 24 cm del nivel del NL₂) y se redujo a 15 °C/min (de -118 a -148°C) en la rampa 2 (10 cm del nivel del NL₂). El uso del congelador automático permitió programar una curva de congelación con una velocidad de enfriamiento inicial más lenta (de 5 a -10°C; 10°C/min), que luego se incrementó a 50°C/min (de -10 a 140°C). No obstante, los resultados fueron contrarios a nuestra hipótesis y la congelación programable resultó en una calidad espermática menor que el protocolo de congelación convencional. De este hallazgo surge la pregunta de si la segunda etapa de enfriamiento en la congelación programable, que alcanzó 50°C/min, fue muy rápida y causó mayor criodañó celular que la velocidad inicial, de 41°C/min, en la congelación convencional.

En conjunto, estos resultados hacen evidente que criopreservar espermatozoides de cobayo es una tarea compleja, y la ausencia de estudios publicados en esta especie es una prueba

de ello. Con la excepción de los estudios de Elder et al. (2013) y Galarza et al., (2023), no hay reportes sobre criopreservación de espermatozoides de cobayo.

La cabeza del espermatozoide de los mamíferos está conformada por el núcleo, la membrana plasmática circundante y el acrosoma (Yániz et al., 2015). Entre estas especies, los cobayos se distinguen por tener espermatozoides con una cabeza de gran tamaño (41,7 y 46,5 μm^2 según Cabeza et al., (2020) y Galarza et al. (2023), respectivamente), cuya forma no está definida por la configuración del núcleo, sino más bien, por la presencia de un acrosoma inusualmente grande (Morris, 1975).

Otra particularidad de los espermatozoides epididimarios de cobayos que podría explicar su reducida criotolerancia, es que se unen unos a otros por medio de su cabeza. Durante su desplazamiento por el segmento distal del epidídimo, los espermatozoides del cobayo y otras especies de animales (Monclus & Fornes, 2016), se apilan unos a otro con la superficie superior convexa de una cabeza espermática encajando en la superficie inferior cóncava de la siguiente, formando grupos de 4 a 14 células (Fawcett, 1968). Este agrupamiento (rouleaux) en los espermatozoides del cobayo, que persiste en el oviducto y útero luego de la eyaculación (Martan & Shepherd, 1972), es causado por una proteína de adhesión en la superficie de la membrana espermática (Flaherty, Swann, Primakoff, & Myles, 1993). Evidencias en otras especies indican que la adhesión de espermatozoides afecta la funcionalidad espermática (Bollwein, Petschow, Weber, Leiding, & Stolla, 2004) y podría comprometer la criopreservación de las muestras (Anel et al., 2008), aunque no se demostró efecto en la fertilidad (Bollwein et al., 2004).

En nuestro estudio, el apilamiento de espermatozoides fue una característica observada en mayor o menor proporción en todas las muestras epididimarias. La membrana plasmática es la estructura espermática que sufre mayor daño durante el proceso de criopreservación debido al estrés osmótico y mecánico al que las células son sometidas (Sharafi, Borghei, Hezavehei, Shahverdi, & Benson, 2022). Para sobrevivir a la criopreservación los espermatozoides deben deshidratarse (Yeste, 2015) para evitar la formación de cristales de hielo letales. Asimismo, durante el enfriamiento los lípidos de la membrana plasmática cambian de un estado natural fluido a un estado de gel más rígido (Grötter et al., 2019). En este contexto, se puede especular que el apilamiento de espermatozoides de cobayo podría interferir con los cambios que, aunque perjudiciales, las células normalmente deben experimentar para sobrevivir al proceso de criopreservación.

Conclusiones

Los parámetros cinéticos disminuyeron drásticamente luego de la congelación, independientemente del método de criopreservación utilizado.

El protocolo de congelación convencional de espermatozoides epididimarios de cobayo resultó en mejores características cinéticas post-descongelación.

Los porcentajes de la integridad de membrana plasmática y acrosomal fueron mayores en las muestras criopreservadas mediante el protocolo convencional que con el programable.

La fragmentación del ADN fue similar entre ambos métodos de criopreservación.

Referencias

- Abaigar, T., Holt, W., Harrison, R., & Del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of Reproduction*, 60(1), 32–41. Retrieved from <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.1.32>
- Almeda, H. (2001). *Anatomía y Fisiología del macho. Producción Pecuaria* (Terranova, Ed.). Colombia.
- Almeida Herdoíza, A. (2016). *Influencia de las espículas peneanas del cobayo sobre el comportamiento sexual, valoración espermática y fertilidad del macho* (Universidad de Cuenca). Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/24954/1/tesis.pdf>
- Amaral, A., & Ramalho-Santos, J. (2010). Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *Int J Androl*, 33, 180–186.
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thotin, C., Gérard, O., Courtens, J., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl® a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61, 895–907.
- Andrade-Yucailla, V., Fuentes, I., Vargas-Burgos, J., Lima-Orozco, R., & Jácome, A. (2016). Alimentación de cuyes en crecimiento-ceba a base de gramíneas tropicales adaptadas a la Región Amazónica. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 17(1), 1–7.
- Anel, L., Álvarez, M., Martínez, F., Gomes, S., Nicolás, M., Mata, M., ... Paz, P. (2008). Sperm cryopreservation in brown bear (*Ursus arctos*): Preliminary aspects. *Reprod. Dom. Anim*, 43(4), 9–17. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01248.x>
- Aragon Cruz, S. (2019). *Características macroscópicas, microscópicas, estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas es semen de cuy (Cavia porcellus)*. 103.
- Aucapiña, C., & Marín, A. (2016). *Efecto de la extirpación de las espículas del glande del cuy como técnica de esterilización reproductiva y su influencia en agresividad y ganancia de peso en comparación con un método químico alcohol yodado al 2%*. Retrieved from <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/24782>
- Bacha, W., & Bacha, L. (2012). *Color Atlas of Veterinary Histology* (Third edit; W.-B. Publication, Ed.). United Kingdom.
- Barros, C., Bedford, J., Franklin, L., & Austin, C. (1967). Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. *J Cell Biol*, 34, 1–5.
- Baumber, J., Ball, B., Linfor, J., & Meyers, S. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of*

Andrology, 24(4), 621–628.

- Bollwein, H., Petschow, K., Weber, F., Leiding, C., & Stolla, R. (2004). The incidence of agglutination and its influence on sperm quality and fertility of boar semen. *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 117(7–8), 327–333.
- Bonaura, M., Nuñez, R., García, C., Tittarelli, C., & Stornelli, M. (2013). Efecto de la adición de dimetilformamida al diluyente Tris Base sobre la supervivencia de espermatozoides felinos congelados/descongelados. *Analecta Vet*, 33(2), 14–19. Retrieved from http://www.fcv.unlp.edu.ar/images/stories/analecta/vol_33_n2/252_Bonaura_esperm%0Aatozoides.pdf
- Cabeza, U. (2019). Caracterización morfológica y morfométrica del espermatozoide de cuy (*Cavia porcellus*) colectado por electroeyaculación. *Repositorio Institucional - UNSAAC*, 19–20.
- Cabeza, U., Ordoñez, C., Meza, A., & Cucho, H. (2020). Caracterización morfológica y morfométrica del espermatozoide de cuy (*Cavia porcellus*). *Spermova*, 10(2), 94–101. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.18548/aspect/0008.14>
- Caguano Cevallos, M., & Corrales, Trávez, L. (2012). *Alimentación con dos tipos de balanceado: peletizado de pronaca y en polvo en cuyes reproductores en el criadero producuy cantón salcedo -provincia de Cotopaxi* (Universidad Técnica de Cotopaxi). Retrieved from <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/668/1/T-UTC-0530.pdf>
- Calvopiña, A. (2018). *Estudio de factibilidad para la construcción de una sala de faenamiento para cuyes en la empresa Urkuagro Uasak SA. (Cuyera Andina)*. Universidad Central del Ecuador.
- Carra, E., Sangiorgi, D., Gattuccio, F., & Rinaldi, A. (2004). Male infertility and mitochondrial DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 322, 333–339.
- Chango, M. (2014). Evaluación de la crioconservación del semen de Cobayo (*Cavia Porcellus*) en el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi. *Repositorio Digital Universidad Técnica de Cotopaxi*, 88.
- Cortés-Gutierrez, E., Davila-Rodríguez, M., López-Fernández, C., Fernández, J., & Gosálvez, J. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urología Española*, 31, 98–109.
- Cseh, S., Polichronopoulos, T., & Solti, L. (2004). Prediction of bull fertility by computer assisted semen analysis. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(2), 128. Retrieved from <https://doi.org/10.1071/rdv16n1ab12>
- Dellmann, D. (1994). *Histología Veterinaria* (Segunda Ed; E. Acribia, Ed.). Zaragoza - España.
- Durrant, B. (1984). Semen collection, evaluation, and cryopreservation in exotic animal

- species : Maximizing Reproductive Potential. *ILAR NEWS*.
- Eggert-Kruse, W., Rohrl, H., Kerbel, H., Schwalbach, V., Demirakca, T., Klinga, K., ... Runnebaum, B. (1996). The Acridine orange test: a clinically relevant screening method for sperm quality during infertility investigation? *Human Reprod*, 11, 784–789.
- Elder, S., Muller, K., Jewgenow, K., Hribal, R., & Schumann, K. (2013). Cryopreservation of guinea pig spermatozoa – Challenges and first success. *Reproductive Biology*, 13(2), 24. <https://doi.org/doi: 10.1016/j.repbio.2013.01.014>.
- Estrada, E. (2014). *Efectos del glutatión reducido y la procaína en la resistencia a la criopreservación de semen porcino. Acciones a nivel De La Estabilidad Nuclear Y Su Efecto En La Fertilidad “in Vivo.”* Retrieved from papers3://publication/uuid/00013F02-DF36-4AAA-B5DB-EFFFC2E65558
- Fawcett, D. (1965). The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the Guinea pig. *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 67(3), 279–296. <https://doi.org/http://doi.org/10.1007/BF00339376>
- Fawcett, D. (1968). The topographical relationship between the plane of the central pair of flagellar fibrils and the transverse axis of the head in guinea-pig spermatozoa. *J. Cell Sci*, 3(187–198).
- Ferrian, S. (2007). *Influencia de las características seminales del eyaculado de conejo sobre la calidad espermática post-descongelación* (Universidad Politécnica de Valencia). Retrieved from <http://riunet.upv.es/handle/10251/12203>
- Flaherty, S., Swann, N., Primakoff, P., & Myles, D. (1993). A role for the WH-30 protein in sperm-sperm adhesion during Rouleaux formation in the Guinea pig. *Developmental Biology*, 156, 243–252.
- Florin, S. (2015). Anatomical particularities of male reproductive system of guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Bulletin University of Agricultural Sciences*, 72(2), 288–295. <https://doi.org/https://doi.org/10.15835/buasvmcn-vm:11410>
- Franco, J. (2007). Criopreservación de semen tomado del epidídimo. Retrieved from Engormix website: <http://www.engormix.com/MAGanaderiacarne/genetica/articulos/criopreservacion-semen-tomado-epididimot1876/p0.htm>
- Franco, J., & Uribe, L. (2012). Hormonas reproductivas de importancia veterinaria en hembras domésticas rumiantes. *Biosalud*, 11(1), 41–56.
- Fraser, L., & Strzeżek, J. (2007). Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing–thawing?. *Theriogenology*, 38(2), 248–257.
- Galarza, D., León Machuca, W., Samaniego, J., Carrera, R., Perea, F., & Santiago Moreno,

- J. (2023). Egg yolk-supplemented tris-citric acid extender improves the post-thaw membranes integrity of guinea pig (*Cavia porcellus*) epididymal spermatozoa. *Biopreservation & Biobanking*.
- Galarza, D., López-Sebastián, A., Woelders, H., Blesbois, E., & Santiago-Moreno, J. (2019). Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology*, *91*, 84–89.
- García Vera, W. (2014). *Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa* (Universidad Autónoma de Barcelona). Retrieved from <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/284242/wcgv1de1.pdf?sequence=1>
- Gilbert, S. (2005). *Biología del desarrollo* (Ed Médica).
- Gonzalez, H., & Cornejo, D. (2009). Bases celulares y moleculares de la capacitación espermática. *Scientia*.
- Gonzalez, R. (2004). *Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotectores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana dos espermatozoides bovino*. Universidade de São Paulo.
- Grötter, L., Cattaneo, L., Marini, P., Kjelland, M., & Ferré, L. (2019). Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*, *54*(4), 655–665.
- Hafez, E. (1989). *Reproduccion e Inseminacion en animales*. (Internacional, Ed.). Mexico.
- Hajihoseini, M., Vahdati, A., Hosseini, S. E., Mehrabani, D., & Tamadon, A. (2017). Induction of spermatogenesis after stem cell therapy of azoospermic guinea pigs. *Veterinarski Arhiv*, *87*(3), 333–350. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.151209>
- Henricks, D. (1991). Biochemistry and Physiology of the Gonadal Hormones. In A. Press (Ed.), *Reproduction in Domestic animals* (4th ed., p. 670). San Diego.
- Hidalgo, V., & Montes, T. (1995). *Crianza de cuyes*. Lima-Perú.
- Lahnsteiner, F., Patzner, R., & Weismann, T. (1993). Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Reprod. Nutr.*, *33*, 349-360.
- Lammers, P., Carlson, S., Zdorkowski, G., & Honeyman, M. (2009). Reducing food insecurity in developing countries through meat production: The potential of the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Renewable Agriculture and Food Systems*, *24*(2), 155–162.
- Lee, N., & Cheng, C. (2008). Nitric oxide and cyclic nucleotides: Their roles in junction dynamics and spermatogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *11*, 25–32.
- Liesa, M., Palacin, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev*, *39*, 799–845.

- Logan, D. (2007). The mitochondrial compartment. *J Exp Bot*, 58, 1225–1243.
- López García, M., Urbano Felices, A., & Cárdenas Povedano, M. (2012). *Manual de laboratorio para el análisis del semen*. <https://doi.org/https://doi.org/10.3926/oss.5>
- Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., & Marchetti, P. (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod*, 17, 1257–1265.
- Márquez, F., Valencia, L., Chauca, F., & Verde, Z. (2019). Estudio anatómico del glándula del cuy (*Cavia porcellus*) de la raza Perú. *Revista De Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 20(3). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16722>
- Martan, J., & Shepherd, B. (1972). Spermatozoa in rouleaux in the female Guinea pig genital tract. *Anat. Rec.*, 175, 625–630.
- Martin, R. (2004). *Atlas de Anatomía de Animales exóticos* (Masson, Ed.). Barcelona-España.
- Martins, C., Dode, M., Báó, S., & Rumpf, R. (2007). The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. *Research, Genetics and Molecular*, 94–104.
- Membrillo, A., Córdova, A., Hicks, J., Olivares, I., Martínez, V., & Valencia, J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *J Cell Sci*, 131, 224–238.
- MINAGRI. (2019). Potencial del mercado internacional para la carne de cuy 2019. *Ministerio de Agricultura y Riego*, 14. https://doi.org/http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/lciencia/101/mercado_interno_carne_cuy.pdf
- Monclus, M., & Fornes, M. (2016). Sperm Conjugation in Mammal Reproductive Function: Different Names for the Same Phenomenon? *Molecular Reproduction & Development*, 83, 884–896. <https://doi.org/10.1002/mrd.22636>
- Moore, A., Squires, E., Bruemmer, J., & Graham, J. (2006). Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *Journal Equine Vet Science*, 26, 215–218.
- Moreira, S., da Silva, A., Souza, A., Praxedes, E., de Souza, J., Pereira, A., & Silva, A. (2021). Cryopreservation of Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm using Tris-and coconut water-based extenders supplemented with egg yolk or Aloe vera. *Cryobiology*, 99, 40–45.
- Morel, M. (1999). *Equine artificial insemination* (7th ed). New York: CABI Publishing, New York.
- Morris, T. (1975). *A comparison of acrosomal proteinase activity in the male and female reproductive tracts of the Guinea pig*. Virginia Commonwealth University.

- Muiño, R., Josa, A., Costa, A., Izquierdo, M., Cuesta, A., Montoro, A., ... Hoyos, P. (2005). Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de inseminación artificial. *ITEA*, 101, 175–191.
- Ngoula, F., Tekam, M., Kenfack, A., Tchingo, C., Nouboudem, S Ngoumtsop, H., Tsafack, B., ... Galeotti, M. (2017). Effects of heat stress on some reproductive parameters of male cavie (*Cavia porcellus*) and mitigation strategies using guava (*Psidium guajava*) leaves essential oil. *Journal of Thermal Biology*, 64, 67–72.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426–436. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000400008&lng=en&tlng=es.
- Ormachea, E., Calsin, B., & Zegarra, E. (2019). Kinetics and sperm morphometry in sexed and conventional frozen semen of Brown Swiss bulls. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(1), 500–506. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.14696>
- Ortega-Ferrusola, C., Sotillo-Galán, Y., Varela-Fernández, E., & Gallardo-Bolaños, J. (2008). Detection of “apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm. *J Androl*, 29, 213–221.
- Ortiz, N. (2000). *Estudio de las características espermáticas y de la criopreservación en espermatozoides epididimarios de ciervo ibérico obtenidos postmortem*. (Universidad de Castilla). Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=S1YjmV1nkmEC&printsec=frontcover%0A&hl=es#v=onepage&q&f=false%0A>
- Paal, D., Strejcek, F., Slanina, T., Kovacova, R., Lukac, N., Qoja, A., & Massanyi, P. (2016). Crude glycerol negatively affects rabbit spermatozoa motility in vitro. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 67(4), 223–230.
- Palacios, C. (2005). Técnicas para la evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides. *V Reunión de Reproducción Bovina*.
- Palma, G. (2001). Producción in vitro de embriones. *Biotec Reprod*, 1, 24–37.
- Pinduisaca, F. (2018). *Colecta y evaluación de semen de cuyes (Cavia porcellus), extraído por la técnica de electroeyaculación en el Centro Experimental Uyumbicho*. Universidad Central del Ecuador.
- Pino, T. (2014). *Descripción histológica de ovarios y testículos de cuyes (Cavia porcellus) a los dos meses de edad, suplementados con nucleótidos*. Universidad Católica de Santa María.
- Posado, R., Hernández, M., García, J., Bartolomé, D., López-Fernández, C., & Gosálvez, J.

- (2011). Evolución de la fragmentación del ADN en semen criopreservado de toros Lydia. *Archivos de Cría de Animales*, 60(231), 441–444. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922011000300031>
- Qing, W., Elizabeth, I., Tang, Y., Tito, T., Darren, S., Chu, W., ... Yan, C. (2018). Signaling pathways regulating blood-tissue barriers-lesson from the testis. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-Biomembranes*, 18, 141–153.
- Quispe, H. (2022). *La radiación solar en el desarrollo somático, calidad seminal y fertilidad de Cavia porcellus* (Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas). Retrieved from [https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/2914/Quispe Ccasa Hurley Abel.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.untrm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14077/2914/Quispe%20Ccasa%20Hurley%20Abel.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Quispe, W. (2018). Características espermáticas y calidad del semen de dos razas de cuyes (*Cavia porcellus*), en el Valle de Cajamarca. *Universidad Nacional de Cajamarca*, 124.
- Ramírez-Navarro, W., & Cárdenas, C. (2019). *Evaluación de parámetros productivos de cuyes mejorados en tres densidades de crianza en el distrito de Tocache*.
- Ribeiro-Peres, A., Munita-Barbosa, L., Yumi-Kanazawa, M., Mello-Martins, M., & Ferreira De Souza, F. (2014). Criopreservación de espermatozoides bovinos extraídos de la cola del epidídimo utilizando los métodos convencional y automatizado. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(1), 31–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.4067/S0301-732X2014000100005>
- Rodríguez, J., Madrid, N., Urdaneta, A., Aranguren, J., & Quintero, A. (2000). Análisis morfométrico del epidídimo en toros jóvenes mestizos 5/8 Holstein y 5/8 Pardo Suizo con testículos pequeños. *Revista Científica*, 10(6), 458–467.
- Schimming, B., & Domeniconi, R. (2013). *Morfología do epidídimo de cobaio (Cavia porcellus) em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal*. Retrieved from <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v49i4p307-317>
- Serres, C. (2012). Métodos tradicionales y alternativos de extracción de semen. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 131–132.
- Shamsi, M., Kumar, R., & Dada, R. (2008). Evaluation of nuclear DNA damage in human spermatozoa in men opting for assisted reproduction. *Indian J Med Res*, 127, 115–123.
- Sharafi, M., Borghei, S., Hezavehei, M., Shahverdi, A., & Benson, J. (2022). Cryopreservation of semen in domestic animals: A review of current challenges, applications, and prospective strategies. *Animals*, 12, 3271. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ani12233271>
- Sharma, R., Said, T., & Agarwal, A. (2004). Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J. Andrology*, 6, 139–148.

- Silva, A., Praxedes, E., Campos, L., Bezerra, L., Moreira, S., Maia, K., & Silva, A. (2018). Epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies sperm successfully cryopreserved in Tris extender with 6% glycerol and 20% egg yolk. *Animal Reproduction Science*, *191*, 64–69.
- Silva, P., & Gadella, B. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, *65*(5), 958–978. <https://doi.org/http://www.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Simões, L. S., Rici, R. E. G., Favaron, P. O., Sasahara, T. H. de C., Barreto, R. S. N., Borghesi, J., & Miglino, M. A. (2016). Ultrastructural analysis of the spermatogenesis in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, *36*, 89–94. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016001300013>
- Soengas, J., Sanmartin, B., Barciella, P., Aldegunde, M., & Rozas, G. (1993). Changes in carbohydrate metabolism in domesticated rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* related to spermatogenesis. *Biochem. Physiol*, *105*, 665–671.
- Solís, R., & Chávez, P. (2015). *Evaluación de producción in vitro de embriones en cuyes (Cavia Porcellus) en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad Técnica de Cotopaxi* (Universidad Técnica de Cotopaxi). Retrieved from <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/2895/1/T-UTC00419.pdf>
- Stornelli, M., Tittarelli, C., Savignone, C., & Stornelli, A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, *25*(2), 28–35. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11180/Documento_completo.pdf?se%0Aquence=1&isAllowed=y
- Suen, D., Norris, K., & Youle, R. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *J Genes Dev*, *22*, 1577–1590.
- Tait, S., & Green, D. (2012). Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci*, *125*, 807–815.
- Tapia, D., & Tello, D. (2016). *Evaluación cuali-cuantitativa de espermatozoides de la cola del epidídimo de cuyes (Cavia porcellus) criollos y mejorados en dos edades reproductivas*. (Universidad de Cuenca). Retrieved from [http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25404/1/TESIS TapiaTello.pdf](http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25404/1/TESIS%20TapiaTello.pdf)
- Thomson, L., Fleming, S., Aitken, R., De Iuliis, G., Zieschang, J., & Clark, A. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, *24*(9), 2061–2070.
- Tulsiani, D., & Abou-Haila, A. (2012). Biological processes that prepare mammalian spermatozoa to interact with an egg and fertilize it. *Scientifica*, *1*(12).

- Turner, R., & McDonnell, S. (2003). Alkaline phosphatase in stallion semen: Characterization and clinical applications. *Theriogenology*, 60(1), 1-10.
- Vasconcelos-Filho, W. (2010). *Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino*. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Woelders, H., & Chaveiro, A. (2004). Theoretical prediction of 'optimal' freezing programmes. *Cryobiology*, 49(3), 258–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.09.001>
- Yániz, J., Soler, C., & Santolaria, P. (2015). Computer assisted sperm morphometry in mammals: a review. *Animal Reproduction Science*, 156, 1–12.
- Yeste, M. (2015). Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>.
- Yucra, A. (2013). *Características microscópicas del semen y morfometría del espermatozoide del cuy doméstico (Cavia porcellus) y silvestre (Cavia tschudii)*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Zaldívar, L., & FAO. (1997). *Producción de Cuyes (Cavia Porcellus)*.
- Zamiri, M., & Khodaei, H. (2005). Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams. *Animal Reproduction Science*, 88(3), 245-255.
- Zuñiga, D., & Quisiyupanqui, L. (1995). *Manejo de cuy* (1 ed; ALPHA, Ed.). Cusco, Perú.

Anexos



Anexo A. Diluyente TCG-YH



Anexo B. Limpieza de los testículos



Anexo C. Epidídimos para la recuperación espermática



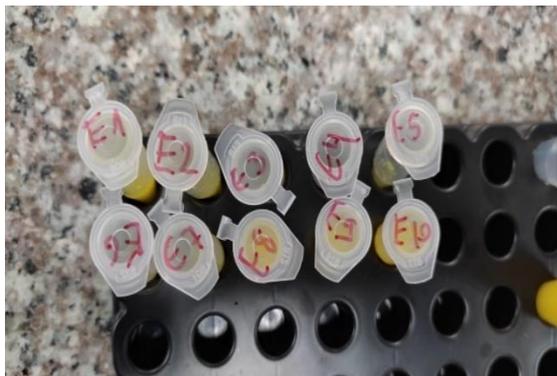
Anexo D. Flujo retrógrado en epidídimos de cobayo



Anexo E. Slicing o corte de los epidídimos



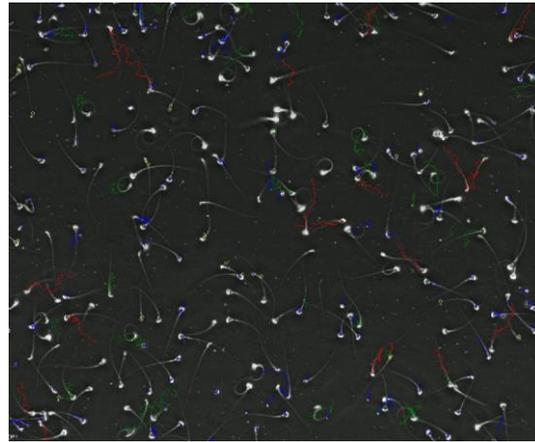
Anexo F. Material recuperado mediante flujo retrógrado



Anexo G. Muestras espermáticas en tubos Eppendorf rotulados



Anexo H. Evaluación en Sistema CASA de las muestras frescas



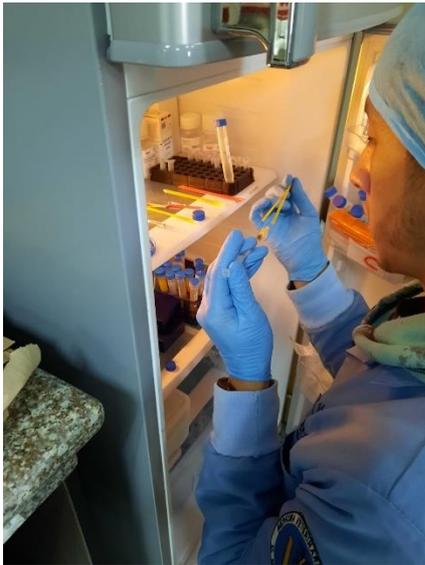
Anexo I. Espermatozoides de cobayo evaluados en el Sistema CASA pre congelación



Anexo J. Rotulado de las pajuelas de 0,25ml



Anexo K. Esterilización de las pajuelas



Anexo L. Empajuelado de las muestras espermáticas



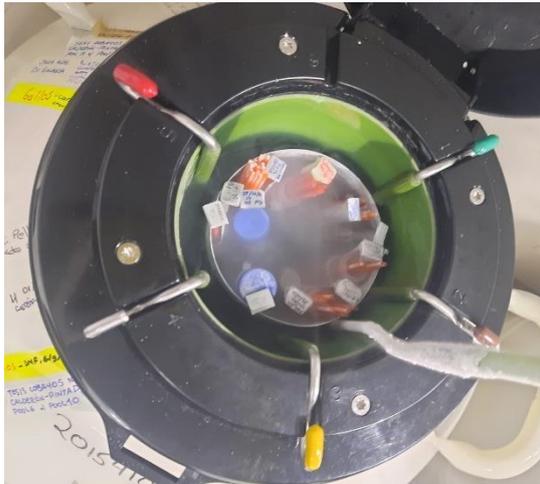
Anexo M. Pajuelas en el cryobox del protocolo de congelación convencional



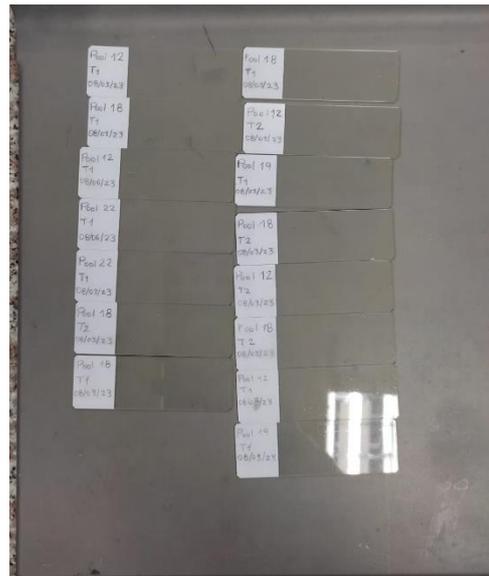
Anexo N. Congelador automático y tanque de NL₂



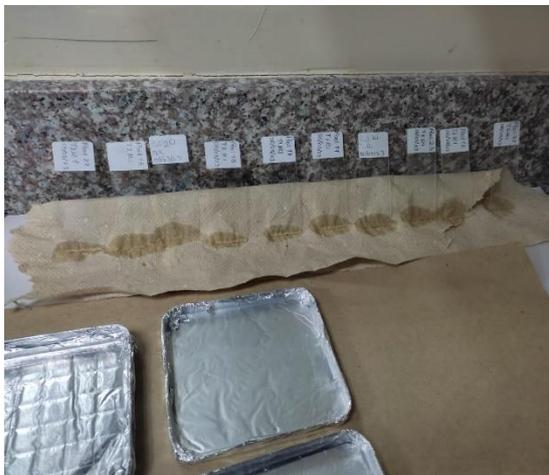
Anexo O. Pajuelas para congelación programable



Anexo P. Pajuelas almacenadas en el tanque de NL_2



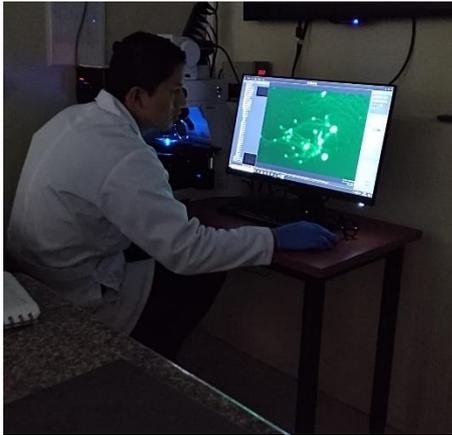
Anexo Q. Láminas para la tinción naranja de acridina



Anexo R. Tinción naranja de acridina



Anexo S. Incubación de las láminas a 75°C durante 5 minutos



Anexo T. Evaluación de las láminas mediante microscopio de fluorescencia



Anexo U. Espermatozoides epididimarios de cobayo teñidos con naranja de acridina