



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina Veterinaria**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

**Determinación de la activación de caspasas 3 y 7  
durante el proceso de criopreservación de  
espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna  
pacos*) como marcadores de apoptosis tardía**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

**AUTOR**

José Miguel LA ROSA AGAPITO

**ASESOR**

Dr. Alexei Vicent SANTIANI ACOSTA

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

La Rosa J. Determinación de la activación de caspasas 3 y 7 durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*) como marcadores de apoptosis tardía [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2022.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	José Miguel La Rosa Agapito
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	74218323
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0003-2956-6334">https://orcid.org/0000-0003-2956-6334</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Alexei Vicent Santiani Acosta
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	10650758
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0001-9740-5490">https://orcid.org/0000-0001-9740-5490</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Wilfredo Huanca López
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10036341
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Mariella Ramos Gonzalez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43068125
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Sofía López Guerra
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	40060409
<b>Datos de investigación</b>	

Línea de investigación	B.4.2.3. Reproducción animal
Grupo de investigación	No aplica.
Agencia de financiamiento	Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (Fondecyt). Contrato 135–2020–FONDECYT y Proyecto PCONFIG2020 A20080381
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Laboratorio de Reproducción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Avenida Circunvalación Cdra. 28 Latitud: -12.0817070 Longitud: -76.9877142
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2021 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencia veterinaria, Ciencia veterinaria <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01</a>  Biología, Biología reproductiva <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08</a>



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL  
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MEDICO VETERINARIA  
Autorizado por R.D N° 304-D-FMV-2020**

**1. FECHA DE LA SUSTENTACIÓN 22/08/2022**

HORA INICIO: 11:00 horas

HORA TÉRMINO: 12:20

**2. MIEMBROS DEL JURADO**

PRESIDENTE: **MV. Mg. Huanca López, Wilfredo**  
MIEMBRO: **MV. Dra. Ramos Gonzalez, Mariella**  
MIEMBRO: **Blga. Mg. López Guerra, Sofía**  
ASESOR: **MV. Dr. Santiani Acosta, Alexei Vicent**

**3. DATOS DEL TESISISTA**

APELLIDOS Y NOMBRES: **LA ROSA AGAPITO, JOSÉ MIGUEL**

CÓDIGO: **14080048**

R.R. DE GRADO DE TESISISTA NÚMERO: **N° 007155-2022-R-UNMSM**

TÍTULO: **"DETERMINACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CASPASAS 3 Y 7 DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE ALPACA (*Vicugna pacos*) COMO MARCADORES DE APOPTOSIS TARDÍA"**

**4. RECOMENDACIONES**

---

**Datos de la plataforma virtual institucional del acto de sustentación:**

<https://drive.google.com/file/d/1rjKlkn4MlFSif7Mx7Z9WHEXSgCpsh5g4/view?usp=sharing>

ID:

Grabación archivada en:

**5. NOTA OBTENIDA: 17, DIECISIETE.**

**6. PÚBLICO ASISTENTE:** (Nombre, apellido y DNI)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
**Facultad de Medicina Veterinaria**  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0145-EPMV/FMV-2022.

**PRESIDENTE:**

 **UNMSM** Firmado digitalmente por HUANCA  
LOPEZ Wilfredo FAU 20148092282  
soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 17.10.2022 11:13:27 -05:00

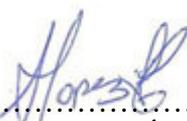
.....  
**HUANCA LÓPEZ, WILFREDO**

**MIEMBROS :**

 **UNMSM** Firmado digitalmente por SANTIANI  
ACOSTA Alexei Vicent FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 14.10.2022 15:33:03 -05:00

.....  
**SANTIANI ACOSTA, ALEXEI VICENT**  
**ASESOR DE LA TESIS**

:   
.....  
**RAMOS GONZALEZ, MARIELLA**

:   
.....  
**LÓPEZ GUERRA, SOFÍA**

San Borja, 12 de octubre de 2022

**V° B°**

 **UNMSM** Firmado digitalmente por DELGADO  
CASTRO Alfredo FAU 20148092282  
hard  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 17.10.2022 11:48:08 -05:00

.....  
**MV. Mg. Delgado Castro, Alfredo**  
**Director(e) EPMV**  
**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria**

## INDICE DE CONTENIDO

### Contenido

LISTA DE TABLAS .....	4
LISTA DE FIGURAS .....	5
LISTA DE ANEXOS .....	6
RESUMEN .....	7
ABSTRACT .....	8
I. INTRODUCCIÓN .....	9
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	11
2.1. Aspectos reproductivos de la alpaca macho .....	11
2.2. Características seminales en alpaca .....	12
2.3. Criopreservación .....	13
2.3.1. Fundamentos de la criopreservación.....	14
2.3.2. Criopreservación en espermatozoides de alpaca.....	15
2.3.3. Daños que se producen en los espermatozoides de alpaca durante el proceso de criopreservación .....	16
2.4. Tipos de muerte celular .....	17
2.5. Apoptosis.....	17
2.5.1. Apoptosis fisiológica en espermatozoides.....	18
2.5.2. Apoptosis en espermatozoides criopreservadas .....	19
2.5.3. Marcadores apoptóticos .....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1. Lugar de estudio.....	22
3.2. Tamaño muestral .....	23
3.3. Procesamiento de testículos y recuperación de espermatozoides 23	
3.4. Diseño experimental.....	24
3.5. Criopreservación .....	26
3.6. Evaluación de apoptosis tardía: Caspasas 3/7.....	27
3.7. Citometría de flujo .....	27
3.8. Análisis de datos .....	30
IV. RESULTADOS.....	31

V. DISCUSIÓN.....	33
VI. CONCLUSIONES.....	38
VII. BIBLIOGRAFIA.....	38
VIII ANEXOS.....	45

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Valores iniciales de los parámetros testiculares y seminales de las muestras seleccionadas y totales .....	31
Tabla 2: Efecto de la criopreservación en la proporción de espermatozoides de alpacas vivos, muertos y apoptóticos (n=23). .....	32
Tabla 3: Promedio y D.S de los porcentajes de vivos, muertos y apoptóticos de las muestras donde aumenta y disminuye el porcentaje de apoptosis antes y después del congelamiento. ....	32

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proceso apoptótico que finaliza en la fagocitosis de la célula. .	18
Figura 2: Diseño experimental de muestras pareadas, antes y después de la criopreservación .....	25
Figura 3. Programa #7 de congelamiento automático Cryobath (Cryologic®) .....	26
Figura 4. Muestra en la que la apoptosis representa el 72% de la población total de espermatozoides de alpaca.....	29
Figura 5. Muestra en la que la necrosis representa el 72.9% de la población total de espermatozoides de alpaca.....	30
Figura 6. Dot plots donde se muestra la ubicación de las células espermáticas viables y las apoptóticas. ....	36

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Datos donde se muestran los datos iniciales de peso, longitud, alto, volumen, concentración y motilidad espermática de las 23 muestras analizadas. ....	45
Anexo 2: Datos de las 23 poblaciones de vivos, muertos y caspasa 3 y 7 activas, antes y después del congelamiento. ....	46
Anexo 3: Datos de las muestras donde incrementa la apoptosis.....	47
Anexo 4: Dot-Plot de una de las muestras donde se evidencia un incremento de la apoptosis.....	47
Anexo 5: Datos de las muestras donde disminuye la apoptosis .....	48
Anexo 6: Dot-Plot de una de las muestras donde se evidencia una disminución de la apoptosis. ....	49
Anexo 7: Análisis estadístico utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov para ver si se sigue una distribución normal .....	50
Anexo 8: Experimento control con semen de toro para establecer las poblaciones. ....	51

## RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar mediante citometría de flujo, la proporción de espermatozoides de alpaca con caspasas 3 y 7 activadas (apoptóticos) durante el proceso de criopreservación. Para esto se obtuvieron 23 muestras de epidídimo, en donde se evaluó la activación de las caspasas 3 y 7 utilizando CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent utilizando ensayos basados en citometría de flujo, antes y después del congelamiento. La prueba de t- Student pareada fue utilizada para comparar la proporción de espermatozoides apoptóticos antes y después de la criopreservación. Los porcentajes de espermatozoides de alpaca apoptóticos antes y después de la criopreservación fueron similares ( $36,2 \pm 11,2\%$  vs  $36,7 \pm 33,7\%$ ). Según nuestros resultados, la criopreservación no induciría apoptosis en los espermatozoides de alpaca; sin embargo, la alta desviación estándar encontrada después de la criopreservación se explica porque encontramos 2 maneras de afectar la calidad espermática, aquellas donde la apoptosis disminuyó aparentemente como resultado de la criopreservación (de  $36,6 \pm 9,1\%$  a  $1,5 \pm 2,2\%$ ), y el grupo donde la apoptosis aumentó aparentemente después de la criopreservación (de  $37,7 \pm 13,0\%$  a  $64,0 \pm 16,7\%$ ). Ambos grupos mostraron un porcentaje similar de espermatozoides viables y necróticos antes de la criopreservación; pero después de la criopreservación, mientras la viabilidad fue similar, encontramos  $74,9 \pm 14,5\%$  (grupo con disminución de apoptosis) frente a  $7,7 \pm 5,0\%$  (grupo con aumento de la apoptosis) de espermatozoides necróticos. Nuestros resultados indicarían que, en algunas muestras, los espermatozoides apoptóticos pasarían a ser necróticos debido a la criopreservación y por ello encontraríamos una relativa disminución de apoptosis, mientras que, en otro grupo de muestras, la criopreservación llevaría a aumentar la proporción de espermatozoides apoptóticos sin llegar a causar necrosis en elevada proporción. Se concluye que la criopreservación afecta la apoptosis en las muestras de espermatozoides de alpaca de diferentes maneras.

**Palabras clave:** alpaca, espermatozoides, apoptosis, citometría de flujo, caspasas 3 y 7.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to determine, by means of flow cytometry, the proportion of alpaca spermatozoa with activated caspases 3 and 7 (apoptotic) during the cryopreservation process. For this, 23 samples of epididymis were obtained, where the activation of caspases 3 and 7 was evaluated using CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent using assays based on flow cytometry, before and after freezing. The paired t-Student test was used to compare the proportion of apoptotic sperm spermatozoa before and after cryopreservation. The percentages of apoptotic alpaca spermatozoa before and after cryopreservation were similar ( $36.2 \pm 11.2\%$  vs  $36.7 \pm 33.7\%$ ). According to our results, cryopreservation would not induce apoptosis in alpaca sperm, however, the high standard deviation found after cryopreservation is explained because we found two ways to affect sperm quality, those where apoptosis apparently decreased as a result of cryopreservation (From  $36.6 \pm 9.1\%$  to  $1.5 \pm 2.2\%$ ), and the group where apoptosis apparently increased after cryopreservation (From  $37.7 \pm 13\%$  to  $64 \pm 16.7\%$ ). Both groups showed a similar percentage of viable and necrotic sperm before cryopreservation, but after cryopreservation, while viability was similar, we found  $74.9 \pm 14.5\%$  (group with decreased apoptosis) vs  $7.7 \pm 5\%$  (group with increased apoptosis) of necrotic spermatozoa. Our results would indicate that in some samples, apoptotic sperm would become necrotic due to cryopreservation and therefore we would find a relative decrease in apoptosis; while in another group of samples, cryopreservation would lead to an increase in the proportion of apoptotic spermatozoa, without causing necrosis in a high proportion. It is concluded that cryopreservation affects apoptosis in alpaca sperm samples in different ways.

**Key words:** alpaca, sperm, apoptosis, flow cytometry, caspases 3 and 7.

## I. INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un camélido sudamericano (CSA) domesticado de importancia económica en nuestro país, valorado por su fibra y carne principalmente (Fernández-Baca, 1971; Wheeler, 1995). En ese sentido, en la reproducción de alpacas se tiene como objetivo lograr animales genéticamente superiores y tener la distribución del material genético de machos con buena calidad espermática a diferentes zonas del país (Brown, 2000; Miragaya *et al.*, 2006; Huanca y Adams, 2007).

Durante los últimos años, la alpaca viene despertando un gran interés en muchos países, que buscan un mayor desarrollo de la biotecnología reproductiva en esta especie. En el caso de la inseminación artificial (IA), presenta dificultades encontradas durante el proceso de criopreservación; hasta la fecha no hay un protocolo adecuado que asegure el éxito después de la IA con semen congelado (Santiani *et al.*, 2005; Miragaya *et al.*, 2006; Morton *et al.*, 2007); lo que ha conllevado a desarrollar diferentes metodologías para que los efectos negativos se reduzcan durante este proceso.

La criopreservación tiene un efecto negativo en los espermatozoides debido al estrés oxidativo o aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante el proceso (Chatterjee *et al.*, 2001; Evangelista-Vargas y Santiani, 2017) causando alteraciones en los espermatozoides de alpaca como la disminución de la motilidad, viabilidad espermática y fragmentación del ADN espermático (Bravo *et al.*, 1997; Santiani *et al.*, 2013). En espermatozoides de bovinos también inducen la apoptosis celular (Martin *et al.*, 2004). Estos cambios estarían interrelacionados y constituyen un proceso patogénico unificado (Agarwal y Said, 2004).

La apoptosis es una forma de muerte celular que induce alteraciones morfológicas y bioquímicas que llevan a una muerte programada de la célula (Said *et al.*, 2004). Durante la espermatogénesis, producto de la proliferación celular excesiva, se ha identificado que existen mecanismos apoptóticos en células espermáticas para regular los niveles normales de proliferación (Agarwal

y Said, 2004; Said *et al.*, 2004). Adicionalmente se ha descrito que los niveles de apoptosis también aumentan durante el proceso de criopreservación espermática en algunas especies como bovinos (Martin *et al.*, 2004), equinos (Martin-Muñoz *et al.*, 2016) y humanos (D´Arcy, 2019).

Las cisteín-aspártico proteasas (caspasas) son proteínas con actividad catalítica enzimática implicadas en el proceso de apoptosis, piroptosis e inflamación; se clasifican en 2 categorías basadas en la similitud de sus secuencias y según su función biológica, entre ellas, las caspasas implicadas en la apoptosis muestran dos categorías, caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 9), y las caspasas ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) que son activadas por las caspasas iniciadoras, las caspasas ejecutoras se activan en una etapa tardía de la apoptosis (D´Arcy, 2019). En estudios realizados en espermatozoides humanos se ha demostrado que la criopreservación activa caspasas, evidenciando un aumento en los niveles de caspasas 3 y 8 (Said *et al.*, 2004).

Un estudio en equinos demostró que la criopreservación puede reducir drásticamente el porcentaje de espermatozoides vivos debido a un aumento significativo en la expresión de caspasas 3 y 7 luego de la criopreservación (Martin-Muñoz *et al.*, 2015), Las caspasas 3 y 7 no solo comparten homología de secuencia, sino también especificidad del sustrato, son considerados incluso redundantes, solo a través de un análisis bioquímico se encuentra diferencias en la especificidad, afinidad y selectividad del sustrato (Renema *et al.*, 2020). En el caso de alpacas, no existen estudios sobre el efecto de la criopreservación en la apoptosis espermática.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la proporción de la activación de las caspasas 3 y 7 como marcadores de apoptosis tardía durante el proceso de criopreservación en espermatozoides epididimarios de alpaca.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Aspectos reproductivos de la alpaca macho

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un camélido sudamericano (CSA) domesticado, de importancia económica en nuestro país, siendo valorada por su fibra y carne principalmente (Fernández-Baca, 1971; Wheeler, 1995). En ese sentido, en la reproducción de alpacas se tiene como objetivo lograr animales genéticamente superiores y tener la distribución del material genético de machos con buena calidad espermática en diferentes zonas del país (Brown, 2000; Miragaya *et al.*, 2006; Huanca y Adams, 2007).

En el caso de la alpaca hembra, es una especie de ovulación inducida, esto puede permitir que las hembras no gestantes se puedan aparear con los machos en cualquier época del año, y demanda que los machos no tengan diferencias significativas en cuanto a su calidad seminal (San Martín *et al.*, 1968; Urquieta *et al.*, 2005; Huanca y Adams, 2007); La alpaca macho tiene un intenso inicio del periodo reproductivo, pero son incapaces de aparearse porque el pene se adhiere al prepucio, lo que genera un retraso en el inicio de la reproducción en esta especie (Fernández-Baca, 1993; Brown, 2000; Abraham *et al.*, 2015).

Además, se deben tener en cuenta las dificultades de lograr muestras de buena calidad espermática en la recolección de semen, estas dificultades se deben a la posición del apareamiento, la larga duración de la cópula, el depósito intrauterino y la frecuencia de la monta (Bravo *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 2000). A esto también se le suma que periodos de descanso largos de la actividad sexual del macho resulta ser negativo en la viabilidad espermática, lo que sugiere un mayor número de apareamientos a lo largo de un ciclo anual (Urquieta *et al.*, 2005).

Durante los últimos años, la alpaca viene despertando un gran interés en muchos países, que buscan un mayor desarrollo de la biotecnología reproductiva en esta especie. En el caso de la IA como alternativa, presenta dificultades, no solo las ya mencionadas; sino también las encontradas durante y después del

proceso de criopreservación, hasta la fecha no hay un protocolo adecuado que asegure el éxito después de la IA con semen congelado (Santiani *et al.*, 2005; Miragaya *et al.*, 2006; Morton *et al.*, 2007); lo que ha conllevado a desarrollar diferentes metodologías para conocer los efectos negativos que ocurren durante este proceso.

## **2.2. Características seminales en alpaca**

El semen de la alpaca presenta características ya conocidas; en cuanto al color del semen predomina el blanco opalescente, también se han reportado muestras con color blanco, blanco amarillento y translúcido incoloro (Garnica *et al.*, 1993; Flores *et al.*, 2002; Urquieta *et al.*, 2005); el volumen del eyaculado varía entre 0.8 a 3.1 ml, el pH es de 7.2, la concentración espermática del semen es de 82,000 a 250,000 espermatozoides/ml y la motilidad de los espermatozoides es oscilatoria, con espermatozoides individuales moviéndose en su lugar pero sin mostrar motilidad progresiva, causado por la viscosidad del semen (Bravo *et al.*, 1997; Bravo *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2002).

La viscosidad del semen en esta especie es alta, siendo esta característica una de las más negativas y por el cual es mejor optar por otra metodología para la obtención de muestras de espermatozoides (Garnica *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 2000); esta viscosidad, producto de la presencia de la proteína Mucina 5B, impide la evaluación del semen ya que atrapa los espermatozoides, haciéndolos moverse de manera oscilatoria, también limita el contacto con los crioprotectores durante la criopreservación (Abraham *et al.*, 2017).

El recuento de espermatozoides en los eyaculados es menor en comparación con otras especies; el sitio de depósito del semen durante el apareamiento es intrauterina, esto reduce la necesidad de un mayor volumen de eyaculación y concentración de espermatozoides (Urquieta *et al.*, 2005). La proporción de espermatozoides vivos del semen es del 50%, en espermatozoides epididimarios la viabilidad espermática estuvo alrededor del 48%; morfológicamente los estudios sugieren que el 50% de los espermatozoides vivos son normales, y estudios con método digital no

automatizado brindan un porcentaje de espermatozoides con cabeza normal de 48% (Bravo *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2002; Evangelista-Vargas *et al.*, 2016; Juárez y Santiani, 2019).

Las anomalías morfológicas en el semen de alpaca incluyen anormalidades de la cola; como colas torcidas y dobles, cabezas sin cola, cabezas dobles y presencia de gotas citoplasmáticas (Bravo *et al.*, 2000); pero también se evidencian muestras azoospermicas en un 20%, siendo este hallazgo causado por largos periodos de reposo sexual que generan un agotamiento de las reservas de espermatozoides en el epidídimo, perdiendo su viabilidad (Flores *et al.*, 2002; Urquieta *et al.*, 2005).

Es importante mencionar que no hay diferencia entre los parámetros al congelar espermatozoides epididimarios de alpaca con y sin plasma seminal, concluyendo que este no tiene efecto protector, en consecuencia, los espermatozoides epididimarios constituyen buenos modelos de estudio en criopreservación de alpaca (Banda *et al.*, 2010). Los espermatozoides epididimarios se han utilizado para recuperar el germoplasma de individuos de especies en peligro de extinción que hayan muerto, pero también podrían ser utilizados como fuente de espermatozoides para desarrollar nuevas técnicas de criopreservación e IA en la alpaca; como ya se vienen investigando en otras especies (Abraham *et al.*, 2017).

### **2.3. Criopreservación**

Los espermatozoides de mamíferos estuvieron entre las primeras células en ser criopreservadas con éxito, el uso de semen congelado-descongelado para la IA ha llegado a desempeñar un papel importante en una gran variedad de especies (Woelders, 1997; Curry, 2007); sin embargo, el daño celular debido a la criopreservación parece ser más severo en los espermatozoides de camélidos que en otras especies domésticas (Fumuso *et al.*, 2021).

### 2.3.1. Fundamentos de la criopreservación

La criopreservación es una técnica que puede mantener los espermatozoides vivos indefinidamente; este procedimiento implica el enfriamiento de muestras de semen y su almacenamiento a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. A esta temperatura se detienen todos los procesos metabólicos (Paoli *et al.*, 2019). Durante el proceso de enfriamiento, congelación y descongelación; los espermatozoides están sujetos a una serie de cambios drásticos en su entorno físico y químico, así como daños en su estructura y función (Woelders, 1997; Chatterjee *et al.*, 2001).

Aún se necesita profundizar más sobre los cambios fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante y después de la criopreservación (Amor *et al.*, 2018; Paoli *et al.*, 2019). Los cambios fisiológicos son generados por el desequilibrio osmótico, estrés oxidativo y formación de cristales de hielo; como consecuencia, hay un deterioro en la calidad espermática que se manifiesta en una reducción de la motilidad y la viabilidad, aumento del porcentaje de anomalías morfológicas, desprendimiento de las colas de los espermatozoides y una reorganización de los componentes de la membrana, especialmente los lípidos, o una eventual ruptura de la membrana espermática (Woelders, 1997; Silva *et al.*, 2003; Ugur *et al.*, 2019).

Algunos de los cambios bioquímicos que ocurren durante este proceso es el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS). La disminución de la temperatura altera el patrón de distribución de las proteínas que contienen sulfhidrilo en la membrana y la disposición de los componentes de la membrana espermática (Chatterjee *et al.*, 2001), lo que permite la activación de algunos elementos como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) en el plasma, es un complejo multiproteico encargado de producir ROS, finalmente las ROS están asociados a la pérdida de la viabilidad y la motilidad espermática (Santiani *et al.*, 2012; Bravo *et al.*, 2013).

A pesar de los avances en los métodos de criopreservación, la tasa de recuperación de espermatozoides después de sufrir el proceso de congelación y descongelación sigue siendo insatisfactoria (Agarwal y Said, 2004), para ello se

vienen empleando una variedad de protocolos, utilizando diferentes dilutores y crioprotectores, estandarización del método de congelamiento, entre otras técnicas que han mejorado los resultados obtenidos (Santiani *et al.*, 2012; Ugur *et al.*, 2019). La mejora de los protocolos de criopreservación actuales depende del conocimiento adecuado de las lesiones moleculares que ocurren durante este proceso (Ortega Ferrusola *et al.*, 2017).

La congelación de espermatozoides epididimarios tiene resultados similares a las muestras de semen en cuanto a los daños que se producen durante y después del proceso de criopreservación; se pueden obtener espermatozoides epididimarios viables a partir de castraciones o post mortem (Agca y Critser, 2002; Curry, 2007; Bravo *et al.*, 2013). El uso de espermatozoides del epidídimo se está volviendo una práctica común para desarrollar nuevos protocolos de criopreservación, evita el problema de cómo tratar la eyaculación viscosa en CSA (Morton *et al.*, 2007; Al-Essawe *et al.*, 2020).

### 2.3.2. Criopreservación en espermatozoides de alpaca

Cuando mencionamos criopreservación del material genético de la alpaca, se han reportado estudios utilizando semen de alpaca, logrando resultados poco satisfactorios; sin embargo, el uso de espermatozoides epididimarios constituye una mejor alternativa, ante muchos factores negativos, entre los cuales podemos mencionar, las dificultades en la colección de semen, alta viscosidad lo que dificulta su dilución y criopreservación, empleo de dilutores apropiados, un alto porcentaje de anomalías, volumen que contiene baja concentración de espermatozoides y porcentaje de motilidad muy baja (Bravo *et al.*, 1997; Banda *et al.*, 2010; Evangelista-Vargas *et al.*, 2016).

Los estudios referentes a la criopreservación de alpaca demuestran la factibilidad de recolectar y criopreservar espermatozoides epididimarios, además vienen brindando información más detallada sobre los cambios se generan durante este proceso (Morton *et al.*, 2007; Santiani *et al.*, 2012; Bravo *et al.*,

2013). Tales como la viabilidad y la motilidad espermática; los cuales disminuyen significativamente; la integridad acrosomal, integridad de la membrana, entre otros parámetros, también disminuyen, lo que genera una disminución de la calidad espermática (Santiani *et al.*, 2013; Juárez y Santiani, 2019).

### 2.3.3. Daños que se producen en los espermatozoides de alpaca durante el proceso de criopreservación

Actualmente existen nuevas variables que nos ayudarían a determinar de manera indirecta la capacidad fecundante de los espermatozoides de alpaca, los cambios que se producirían en estas variables, antes y después de la criopreservación; nos brindarían datos más precisos de cuales de estas variables cambian y poder cuantificarlas. Estas variables son: El potencial de membrana mitocondrial (PMM), integridad del acrosoma, porcentaje de apoptosis, daño en el ADN y la peroxidación lipídica de la membrana plasmática (Santiani *et al.*, 2012; Santiani *et al.*, 2016; Ugarelli *et al.*, 2017; Allauca *et al.*, 2019).

Los mecanismos moleculares asociados con el daño de los espermatozoides durante la criopreservación se entienden mucho mejor que antes (Martin-Muñoz *et al.*, 2015). El choque osmótico durante la criopreservación daña las mitocondrias, lo que genera una mayor cantidad de ROS, los cuales se han demostrado que en niveles elevados pueden causar efectos nocivos en los espermatozoides; el desequilibrio de los niveles de ROS conduce a la producción de aldehídos tóxicos, como 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) causando peroxidación de los lípidos y desfosforilación de AKT, que desencadena trastornos en la membrana, estrés oxidativo, induce la apoptosis y afecta la integridad del ADN espermático; acelerando la senescencia y muerte de los espermatozoides (Chatterjee *et al.*, 2001; Martin-Muñoz *et al.*, 2016; Evangelista-Vargas y Santiani, 2017; Paoli *et al.*, 2019).

La técnica a través de citometría de flujo para la evaluación multiparamétrica de los espermatozoides, resulta ser mucho más objetivo, preciso y eficiente, proporcionando datos estadísticamente más sólidos,

pudiendo conducir en un futuro, la selección de los mejores machos de alta calidad espermática para programas de reproducción (Silva y Gadella, 2006). Permite analizar un mayor número de eventos (8000 a 20000 espermatozoides) en comparación con la cantidad de espermatozoides que se observa en microscopía, debido a que es un conteo automatizado de un flujo celular mediante la detección de intensidades de fluoresceína, permitiendo una mejor investigación sobre los cambios moleculares y bioquímicos de la apoptosis, alteración de interés para este estudio (Darzynkiewicz *et al.*, 1992; Martínez-Pastor *et al.*, 2010; Santiani *et al.*, 2016).

#### **2.4. Tipos de muerte celular**

En los espermatozoides se han evidenciado dos tipos de muerte celular, por necrosis y apoptosis, siendo estos procesos diferentes entre sí. La necrosis es una forma de muerte celular incontrolada, ocasionado por un daño celular o tisular que no es dependiente de energía, no se da durante el desarrollo y la principal característica es que hay derrame de contenido, mientras que en la apoptosis o muerte celular programada, es un proceso regulado, con estímulos externos e internos, dependiente de energía, se da durante el desarrollo y no hay derrame del contenido celular al entorno ya que los cuerpos apoptóticos que se forman durante este proceso son fagocitados (D'Arcy, 2019).

#### **2.5. Apoptosis**

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada, vital para muchos organismos eucariotas, ya que regula el recuento celular y elimina las células innecesarias que comprometen la supervivencia (Anglada *et al.*, 2005; Said *et al.*, 2010); desempeñando un papel clave en el desarrollo de tejidos y órganos durante la embriogénesis, y en la regulación de la muerte natural de células diferenciadas al final de su vida útil; diferente a las formas de muerte

celular por necrosis o autofagia (Darzynkiewicz *et al.*, 1992; Martin-Muñoz *et al.*, 2015).

El proceso de apoptosis se inicia, ya sea por una vía intrínseca o extrínseca, para luego activar las denominadas caspasas, esta activación inicia una cascada de eventos que resultan en la fragmentación del ADN por activación de endonucleasas, destrucción de las proteínas nucleares y citoesqueleto, entrecruzamiento de proteínas, la expresión de ligandos para las células fagocíticas y la formación de cuerpos apoptóticos como se muestra en la figura 1 (Agarwal y Said, 2004; D'Arcy, 2019); las células apoptóticas se caracterizan por un patrón muy específico de características metabólicas, bioquímicas y moleculares que se pueden probar mediante citometría de flujo (Darzynkiewicz *et al.*, 1992).

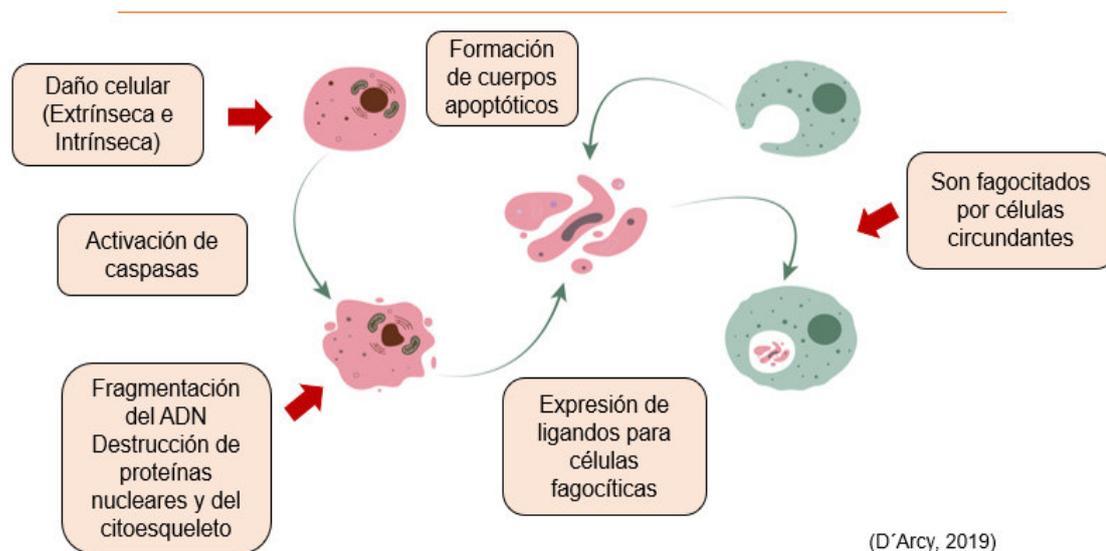


Figura 1: Proceso apoptótico que finaliza en la fagocitosis de la célula.

### 2.5.1. Apoptosis fisiológica en espermatozoides

La apoptosis es necesaria para la espermatogénesis normal en mamíferos; en condiciones fisiológicas asegura la homeostasis celular y mantiene el buen equilibrio entre las células germinales y las células de Sertoli (Caselles *et al.*, 2014; Said *et al.*, 2004); en los testículos de los mamíferos, las células germinales se dividen a través de la mitosis hasta experimentar el proceso de

diferenciación que dan como resultado espermatozoides maduros, esta división es excesiva y, por lo tanto, requiere de un mecanismo como la apoptosis para regular los niveles normales de proliferación (Chaveiro *et al.*, 2007; Said *et al.*, 2010).

La citoquina TNF- $\alpha$  es secretada por las células germinales testiculares; la expresión de la proteína receptora de TNF en el epitelio seminífero se encuentra en las células de Sertoli, lo que significa que el efecto anti apoptótico del TNF- $\alpha$  este mediado por las células somáticas; por lo tanto, el ligando Fas, un inductor conocido de apoptosis testicular está regulada negativamente por TNF- $\alpha$  en los túbulos seminíferos, controlando de esta manera la apoptosis fisiológica (Said *et al.*, 2004); alteraciones en esta vía ocasiona la producción de espermatozoides inmaduros de forma excesiva (Agarwal y Said, 2004). Concluyendo que existe una proporción de apoptosis inicial; por ende, es importante conocer, en que tanto incrementan esos niveles de apoptosis inicial, posterior al proceso de criopreservación.

### 2.5.2. Apoptosis en espermatozoides criopreservadas

Como ya se mencionó, la criopreservación genera la producción de ROS; estos dañan directamente los espermatozoides induciendo la peroxidación lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide, disminuyendo su integridad; también modifica la motilidad, dañando la estructura axonemal y lo más importante es que se detectaron caspasas en niveles altos de espermatozoides con motilidad baja, lo cual nos indica que la apoptosis estaría involucrado, siendo un factor contribuyente, ya que las caspasas son marcadores de apoptosis tardía (Agarwal y Said, 2004; Aitken y Baker, 2013; Caselles *et al.*, 2014).

En estudios realizados en esperma humano se ha demostrado que la criopreservación activa caspasas de diferentes vías apoptóticas, después de la criopreservación y descongelación se evidenció un aumento en los niveles de caspasa 3 y 8 (Said *et al.*, 2004; Chaveiro *et al.*, 2007); entonces, los espermatozoides tendrían una vida útil normal con un umbral de apoptosis, pero

si se pierde el equilibrio, se produce un incremento y una senescencia espermática acelerada (Martin-Muñoz *et al.*, 2016).

### 2.5.3. Marcadores apoptóticos

La activación de las caspasas, la externalización de la fosfatidilserina, la alteración del potencial de membrana mitocondrial y la fragmentación del ADN, son los marcadores apoptóticos que se vienen investigando hoy en día en estudios relacionados a la criopreservación de espermatozoides; estos estudios demuestran cambios luego de la criopreservación y descongelación, siendo la activación de las caspasas, el principal regulador de la apoptosis (Martin *et al.*, 2004; Said *et al.*, 2010).

Las caspasas son proteasas específicas de cisteinil aspartato, cumplen un papel fundamental en el inicio y ejecución de la apoptosis; lo cual provoca cambios morfológicos y bioquímicos que finalizan en la muerte celular apoptótica (Earnshaw *et al.*, 1999); Se han evidenciado 14 caspasas en la cascada de la vía apoptótica en mamíferos, estas caspasas actúan en distintos tejidos y en respuesta a diferentes estímulos, todas las caspasas se expresan como pro enzimas inactivas que al entrar en apoptosis se procesan posteriormente a formas activas (Said *et al.*, 2004).

La cascada se puede originar por una vía extrínseca, también llamada vía mediada por receptores de muerte; que se inicia cuando el ligando se une con el receptor CD95 o Fas, estos receptores se caracterizan por una región intracelular, denominado dominio de muerte. Posteriormente ocurre un cambio conformacional en el receptor, se forma un complejo de señalización intracelular inductor de muerte (DISC) mediante el reclutamiento de moléculas adaptadoras, como FADD (proteína de dominio de muerte asociada a Fas) (Said *et al.*, 2004); que a su vez recluta la pro caspasa-8, posteriormente se escinde en caspasa 8 iniciadora, la caspasa 8 activa escinde a las caspasas 3 y 7, las cuales escinden múltiples dianas celulares como los componentes del citoesqueleto, generando

la pérdida de la estructura celular, contrayendo y provocando la muerte de la célula (Renema *et al.*, 2020).

También tenemos una vía intrínseca o mediada por mitocondrias; el cual libera activadores de caspasa como el citocromo c, el citocromo c reside en el espacio entre las membranas externa e interna de las mitocondrias (Said *et al.*, 2004); las señales de peligro intracelular se inician a partir de una vía positiva (ROS) o negativa (ausencia de citoquinas, hormonas y factores de crecimiento que activan moléculas proapoptóticas dentro de la célula como noxa, puma y bax) (D'Arcy, 2019), lo que da como resultado la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c, una vez liberado se une a la proteína adaptadora factor activador de proteasa apoptótica 1 (Apaf-1), posteriormente se forma un apoptosoma que recluta la pro caspasa 9, esta se escinde proteolíticamente a caspasa 9 activa, que escinde a su vez a las caspasas ejecutoras 3 y 7, dando lugar a la muerte celular (Renema *et al.*, 2020).

Las caspasas se dividen en 2 categorías, las iniciadoras y ejecutoras; siendo las iniciadoras, las caspasas 2, 8, 9 y 10; y las segundas que son activadas por las primeras, las caspasas 3, 6 y 7; que conducen a la escisión de varios sustratos y la finalización del proceso de apoptosis (apoptosis tardía). La activación de la caspasa 3, principal caspasa efectora, resulta de mucha importancia ya que decide el destino de la célula en la cascada apoptótica, su activación marca el punto de no retorno en la apoptosis (Earnshaw *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2008); También sabemos que las caspasas 3 y 7 están más estrechamente relacionadas entre sí, ambas se activan independientemente de la vía que los active, muestran especificidad superpuestas de sustrato, comparten homología de secuencia en un 73%, el análisis proteómico ha revelado que ambas caspasas se dirigen a la secuencia de 4 aminoácidos DEVD, lo que respalda la afirmación de que ambos son incluso redundantes (Said *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2008; Martin-Muñoz *et al.*, 2016; Renema *et al.*, 2020).

En el epitelio seminífero humano y de otras especies, las caspasas cumplen un papel central en la regulación adecuada de la apoptosis; por eso es importante conocer que no solo cumplen un rol importante en la diferenciación

de los espermatozoides y la madurez testicular; sino también en múltiples patologías afectando la calidad espermática de forma irreversible (Said *et al.*, 2004); entonces podemos concluir en base a otros estudios que los niveles de caspasas se mantienen en equilibrio para no perjudicar la calidad espermática en diferentes especies, siempre y cuando no exista un estímulo que aumente los niveles normales (Martin-Muñoz *et al.*, 2016).

La criopreservación provoca la muerte de los espermatozoides y activa las caspasas de ambas vías apoptóticas (Said *et al.*, 2004), el porcentaje de espermatozoides positivos a caspasa 3 y 7 en especies como el equino evidencia un incremento, siendo los espermatozoides vivos caspasa 3 y 7 positivos, un 20% en muestras frescas, y en muestras descongeladas cerca del 60% (Martin-Muñoz *et al.*, 2015); en humanos fue de un 21% en muestras frescas e incrementó en un 47% en muestras criopreservadas (Said *et al.*, 2010); en bovinos demuestran un incremento de 2% en muestras frescas, y en muestras criopreservadas un 12% (Martin *et al.*, 2004).

Actualmente no existen estudios que determinen la activación de caspasas en espermatozoides epididimarios de alpacas sometido a un proceso de criopreservación, se han realizado estudios en equinos, bovinos y humanos; de la cuales se puede extrapolar los datos para realizar esta investigación.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de estudio

Las muestras se obtuvieron del Camal Municipal de Huancavelica, provincia de Huancavelica y fueron procesadas en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, durante el año 2021-2022.

### 3.2. Tamaño muestral

Para determinar el tamaño muestral se calculó mediante la fórmula de comparación de 2 medias:

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

Donde:

n: Muestras necesarias.

Z $\alpha$ : Valor de Z correspondiente al riesgo deseado (Considerando una significancia de 0.05 y un test unilateral, el Z $\alpha$  es 1.645).

Z $\beta$ : Valor de Z correspondiente al riesgo deseado (Considerando una Potencia de 0.90, el valor de Z es 1.282).

S<sup>2</sup>: Varianza de la variable. (En donde de acuerdo a Martin-Muñoz *et al.*, (2015) la D.S. del porcentaje de espermatozoides con apoptosis tardía es de 42%).

d: Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar. Se proyecta un aumento de la activación de las caspasas 3 y 7 en un 38%.

$$\text{Calculando: } n = 2 \times (1.645 + 1.282)^2 \times (42)^2 / 38^2 = 20.93 \text{ testículos}$$

Por lo tanto, en este estudio se decidió utilizar 23 testículos.

### 3.3. Procesamiento de testículos y recuperación de espermatozoides

Las muestras se obtuvieron de alpacas beneficiadas en el camal de Huancavelica; posterior al beneficio, los testículos se lavaron con solución de suero fisiológico (NaCl 0.9%) y fueron colocados en bolsas herméticas individuales junto con una solución fisiológica debido a la lejanía al laboratorio; se almacenaron en cajas transportadoras, utilizando gel refrigerante

manteniendo una temperatura de 5°C para su traslado durante 20 horas en promedio hasta llegar a Lima y posteriormente al laboratorio de Reproducción Animal en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde fueron seleccionados en base al peso (> 10 g) y longitud testicular (> 3 cm) (Allauca *et al.*, 2019).

Para la preparación del dilutor se utilizaron 19 mL de leche descremada, 1 mL de yema de huevo y 0.97 g de fructosa (Banda *et al.*, 2010), a esta mezcla se le añadió 1840 µL de dimetilacetamida (DMA) equivalente a una concentración final 1M. La mezcla final se mantuvo a una temperatura de 37.5°C. (Martin-Muñoz *et al.*, 2015).

Una vez seleccionados los testículos, se procedió a recuperar los espermatozoides epididimarios. Mediante el uso de bisturí y pinzas se procedió a retirar la túnica vaginal de cada testículo, se divulsionó para separar el epidídimo y se aisló la cola del epidídimo, usando una tijera y pinza se retiró el tejido conectivo adyacente y con el bisel no cortante de una hoja de bisturí se discurrió el contenido de los vasos sanguíneos con el fin de evitar la contaminación de la muestra (Abraham *et al.*, 2015; Allauca *et al.*, 2019).

Para aislar la cola del epidídimo se realizó un lavado en PBS y luego se colocó la cola del epidídimo en una placa Petri temperada a 37.5°C, se añadió 1ml del dilutor y se procede a la liberación de espermatozoides mediante cortes seriados. Finalmente se recuperó los espermatozoides en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se mantuvo temperado a 37.5 °C (Banda *et al.*, 2010).

### **3.4. Diseño experimental**

En total fueron procesadas 44 muestras de testículos de alpaca, se analizó el peso y la longitud testicular; también se aprovechó en medir el ancho y alto testicular, con el fin de obtener el volumen testicular. De esas 44 muestras, 23 fueron seleccionadas por su peso (> 10 g) y longitud testicular (> 3 cm). En las muestras seleccionadas, se evaluó posteriormente la motilidad y concentración espermática. Para determinar la motilidad se retiró 10 µL de la muestra en

suspensión y fueron colocados sobre una lámina porta objeto temperada a 37.5 °C, se cubrió con una lámina cubre objeto y se observó en el microscopio con un objetivo de 40X. Para evaluar la concentración de la suspensión de espermatozoides recuperados de cada testículo, se diluyó una proporción 1:2 con agua, se recuperó 10  $\mu$ L de la dilución y se leyó en la cámara de Neubauer a 40X (Allauca *et al.*, 2019).

Se realizó un diseño experimental de muestras pareadas, en donde las 23 muestras seleccionadas fueron evaluadas para determinar la activación de caspasas 3 y 7, tanto en fresco como post descongelamiento como lo muestra la Fig. 2.

### Determinación de la activación de las caspasas 3 y 7

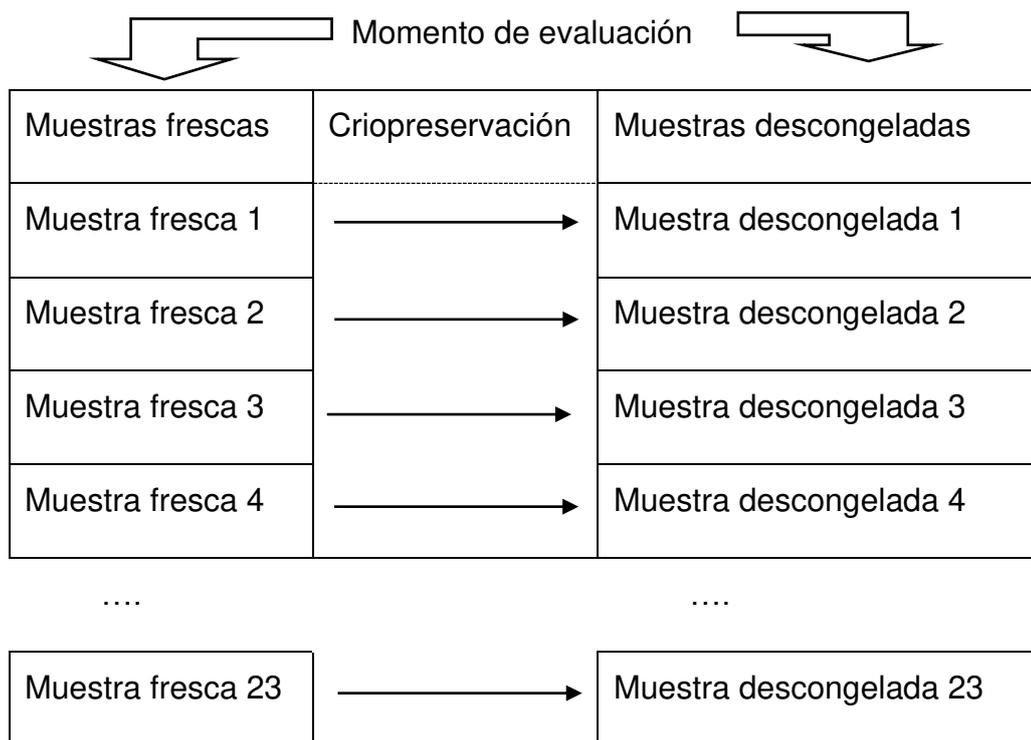


Figura 2: Diseño experimental de muestras pareadas, antes y después de la criopreservación

### 3.5. Criopreservación

Para la criopreservación de las muestras, se utilizó nitrógeno líquido dentro de un sistema de congelamiento automático Cryobath (Cryologic). Las muestras se envasaron en pajillas para posteriormente someterlas en el Cryobath. Para el congelamiento, se utilizó el programa # 7 (Figura 3), el cual inicia a una temperatura de 18 °C por 5 minutos, disminuyendo hasta los 2 °C dentro de un periodo de 90 minutos y seguido a esto mantenerse en esas condiciones por 30 minutos. Posterior a este periodo disminuye en 2 minutos hasta -8 °C, se mantiene por unos 5 minutos para finalmente descender su temperatura hasta congelarse. Una vez congeladas las pajillas fueron retiradas y se colocaron inmediatamente en el nitrógeno líquido y se mantuvieron ahí hasta el día de su evaluación (Martin-Muñoz *et al.*, 2015).

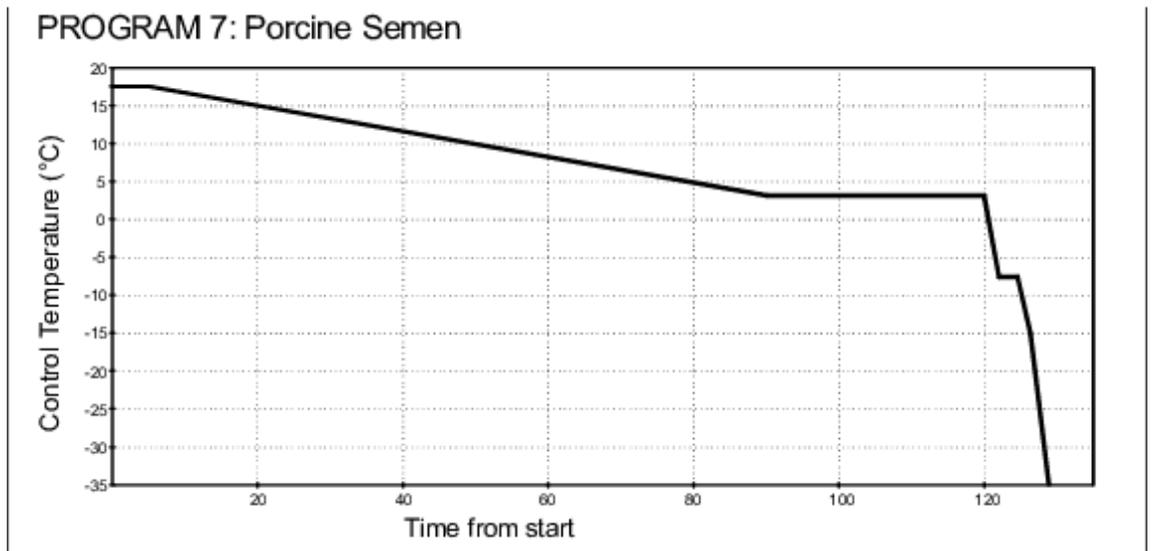


Figura 3. Programa #7 de congelamiento automático Cryobath (Cryologic®)

Las pajillas fueron descongeladas en baño María a 37 °C durante un minuto, luego se secaron y el contenido de cada pajilla se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 mL para su evaluación (Allauca *et al.*, 2019).

### **3.6. Evaluación de apoptosis tardía: Caspasas 3/7**

Para la detección de apoptosis se utilizó el reactivo CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermofisher) de acuerdo a lo descrito por Ortega *et al.*, (2017), este reactivo es un sustrato fluorogénico para caspasas 3 y 7. El reactivo consta de un péptido de 4 aminoácidos (DEVD) conjugado a un colorante de unión de ácido nucleico, este sustrato permeable a las células es intrínsecamente no fluorescente porque el péptido DEVD inhibe la capacidad del colorante para unirse al ADN. Después de la activación de las caspasas 3 y 7 en células apoptóticas, el péptido DEVD se escinde, lo que permite que el colorante se una al ADN y produzca una respuesta fluorogénica brillante (Martin-Muñoz *et al.*, 2016).

La solución de trabajo de caspasa 3/7 consistió en agregar 6.25 mL de Buffer fosfato salino (PBS) a la solución Stock de caspasa 3/7 (25  $\mu$ L) que tiene una concentración de 2 mM, para tener una concentración final de 8  $\mu$ M, luego se prepararon alícuotas de 600  $\mu$ L para luego añadir a los pellets.

Las muestras frescas y posterior a la criopreservación fueron lavadas 2 veces con 1000  $\mu$ L de PBS a 600 G por 8 minutos, al terminar se eliminó el sobrenadante; y se reconstituyó la muestra en 100  $\mu$ L de solución de trabajo de caspasa 3/7 (8  $\mu$ M). Finalmente, la muestra se incubó a 37°C por 30 minutos; a los 20 minutos de incubación se agregó 0.5  $\mu$ L de Yoduro de propidio (PI), se llevó a la estufa los 10 minutos restantes y posteriormente se analizó en el citómetro de flujo.

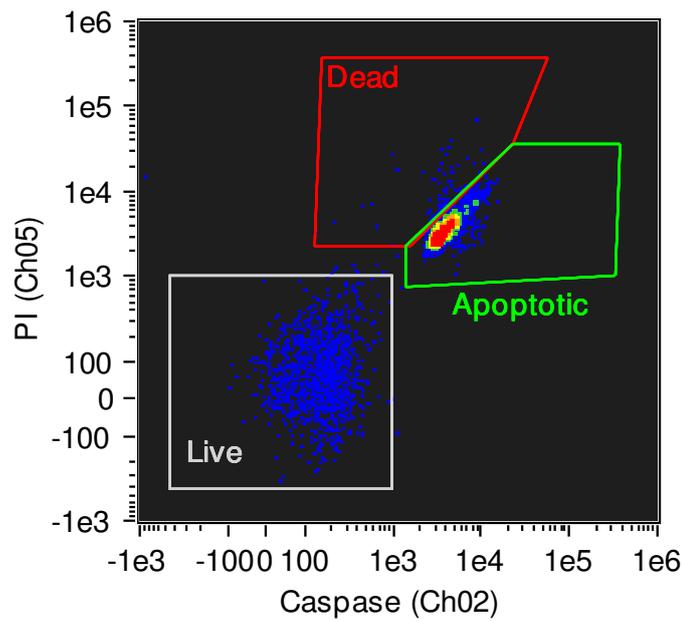
### **3.7. Citometría de flujo**

Se utilizó el citómetro de flujo FlowSight (Amnis, Seattle, EEUU), equipado con un sistema analizador de imágenes. El software de adquisición usado fue INSPIRE® v.100.3.218.0 (Amnis, Seattle, EEUU) y el software para analizar los datos fue IDEAS® v.6.2 (Amnis, Seattle, EEUU). Se utilizó el láser de 488 nm para excitar ambos marcadores, y la lectura se realizó utilizando los canales de

emisión Ch02 (longitud de onda: 505-560 nm) para caspasas 3/7 (Marcador de apoptosis) y Ch05 (longitud de onda: 642-745 nm) para Yoduro de Propidio (PI) (Marcador de muerte celular). Los espermatozoides positivos a caspasas y negativos a PI, fueron considerados apoptóticos; los espermatozoides positivos a PI y negativos a caspasas 3/7 fueron considerados muertos o necróticos y finalmente, los espermatozoides negativos a ambos marcadores fueron considerados vivos.

Para los controles se utilizaron muestras de semen de bovino criopreservado, como lo muestra el anexo 8, los cuales fueron divididos en 3 grupos: Control de vivos, control de apoptosis inducida y control de necrosis inducida, los cuales nos ayudó a definir las poblaciones en el citómetro de flujo. Para el control de vivos se descongeló la muestra como lo indica nuestro protocolo antes descrito, para este primer grupo la mayor población espermática es negativa a Caspasa y PI (53%), la población positiva a PI fue del 31% y la población positiva a caspasa fue de un 16%. Para el control de apoptosis se utilizó camptotecina, como inductor de la apoptosis, la población negativa a ambos marcadores bajo hasta un 14%, la población con mayor intensidad para PI fue del 52%, y la población positiva a caspasa fue del 34%. Por último, el control de necrosis inducida, se le añadió a la muestra agua y sin pasar por proceso de congelación, fue directamente llevado al tanque de nitrógeno, con el fin de matar a los espermatozoides por necrosis, sin que tenga tiempo de seguir pasando por un proceso apoptótico, la población negativa a ambos fue de 3%, el porcentaje de población positiva a PI fue del 94% y la población positiva a caspasa 3/7 fue de un 3%, con estos resultados pudimos definir las poblaciones para las muestras de espermatozoides epididimarios de alpaca.

De las muestras que se analizaron, la población de células espermáticas apoptóticas se ubicaba en el extremo superior derecho, pero debajo de la población necrótica, tal como nos muestra el anexo 8. Estudios anteriores respaldan la ubicación de las células apoptóticas usando el marcador de caspasas 3 y 7 tal como se muestra en la figura 4.

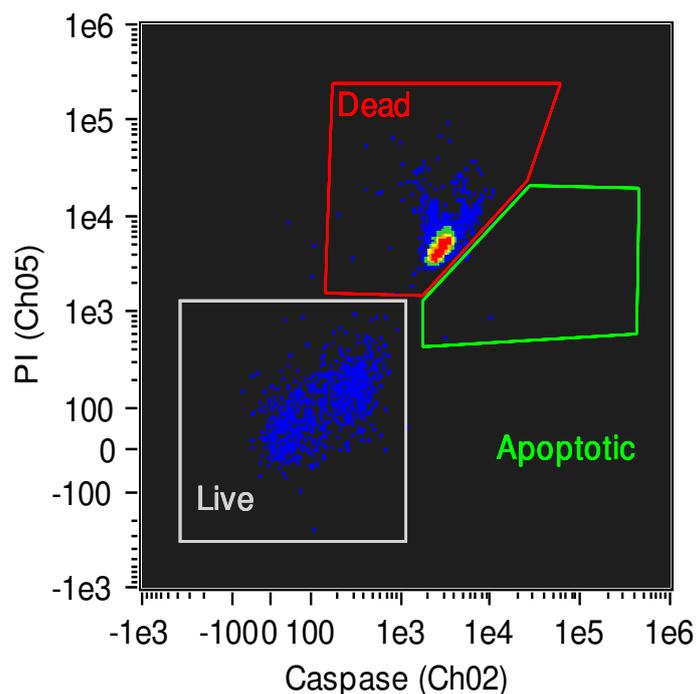


Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	4820	100
Live & Sperm & R1	1231	25.5
Dead & Sperm & R1	155	3.22
Apoptotic & Sperm & R1	3494	72.5

Figura 4. Muestra en la que la apoptosis representa el 72% de la población total de espermatozoides de alpaca.

De la misma manera, algunas de las muestras que se analizaron, la población de células espermáticas necróticas se ubicaba en el extremo superior derecho, por encima de la población apoptótica. De artículos previos, aunque se usen diferentes marcadores de muerte celular y en diferentes especies se ha observado que se sigue el mismo patrón de ubicación, tal como se muestra en la figura 5.



Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	3503	100
Live & Sperm & R1	937	26.7
Dead & Sperm & R1	2554	72.9
Apoptotic & Sperm & R1	4	0.11

Figura 5. Muestra en la que la necrosis representa el 72.9% de la población total de espermatozoides de alpaca.

### 3.8. Análisis de datos

Se realizó una prueba de t- Student pareada de muestras para comparar la proporción de espermatozoides apoptóticos antes y después de la criopreservación. Asimismo, también se realizó el mismo análisis para las poblaciones consideradas células vivas y necróticas.

#### IV. RESULTADOS

Los valores iniciales de características testiculares y parámetros seminales iniciales son presentados en la Tabla 1. En total se procesaron 44 muestras para obtener 23 que cumplan con los criterios de inclusión definidos. Las 23 muestras seleccionadas presentaron un peso de  $17.12 \pm 3.39$  g y una longitud de  $3.90 \pm 0.44$  cm. La motilidad espermática en las muestras procesadas fue  $35.65 \pm 22.38\%$ , mientras que la concentración fue  $123.83 \pm 101.79 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

Tabla 1: Valores iniciales de los parámetros testiculares y seminales de las muestras seleccionadas y totales

	Muestras seleccionadas (n=23)	Muestras totales (n=44)
Peso (g)	$17.12 \pm 3.39$	$13.65 \pm 4.68$
Longitud (cm)	$3.90 \pm 0.44$	$3.54 \pm 0.56$
Ancho (cm)	$2.34 \pm 0.20$	$2.14 \pm 0.28$
Alto (cm)	$2.43 \pm 0.27$	$2.24 \pm 0.31$
Volumen (cm <sup>3</sup> )	$22.58 \pm 6.11$	$17.39 \pm 7.52$
Motilidad (%)	$35.65 \pm 22.38$	No fue evaluado
Concentración ( $\times 10^6$ espermatozoides/mL)	$123.83 \pm 101.79$	No fue evaluado

Valores son promedios  $\pm$  D.S

Los porcentajes de espermatozoides de alpaca con caspasa 3/7 activada antes y después de la criopreservación fueron similares como se muestra en la Tabla 2. El porcentaje de apoptosis en Pre-congelamiento fue de un  $36.21 \pm 11.25\%$  y de Post-congelamiento fue  $36.58 \pm 33.73\%$ . Con respecto a la viabilidad hubo una disminución de espermatozoides vivos de  $59.96 \pm 12.09\%$  a

27.26 ± 14.62%; mientras que los espermatozoides muertos o necróticos aumentaron de 2.66 ± 4.13% a 36.65 ± 35.75%.

Tabla 2: Efecto de la criopreservación en la proporción de espermatozoides de alpacas vivos, muertos y apoptóticos (n=23).

	Pre-congelamiento	Post-congelamiento
Vivos (%)	59.96 ± 12.09 <sup>a</sup>	27.26 ± 14.62 <sup>b</sup>
Muertos (%)	2.66 ± 4.13 <sup>a</sup>	36.65 ± 35.75 <sup>b</sup>
Apoptóticos (%)	36.21 ± 11.25 <sup>a</sup>	36.58 ± 33.73 <sup>a</sup>

Valores son promedios ± D.S

Letras diferentes (a y b) en filas indican diferencias (p<0.05)

La alta desviación estándar encontrada después de la congelación en espermatozoides apoptóticos y muertos nos llevó a analizar los datos en forma individual y encontramos que, en algunas muestras, los cambios en la proporción de espermatozoides apoptóticos eran totalmente diferente. En ese sentido, decidimos formar 2 sub grupos en función a cómo varió la apoptosis por efecto de la criopreservación: Aquellas muestras donde la apoptosis disminuyó como resultado de la criopreservación (de 36,6 ± 9,1% a 1,5 ± 2.2%), y el grupo donde la apoptosis aumentó después de la criopreservación (de 37,7 ± 13,0% a 64,0 ± 16,7%) (Tabla 3).

Tabla 3: Promedio y D.S de los porcentajes de vivos, muertos y apoptóticos de las muestras donde aumenta y disminuye el porcentaje de apoptosis antes y después del congelamiento.

	Pre-congelamiento	Post-congelamiento
Muestras donde aumenta el porcentaje de apoptosis (n=13)		
Vivos (%)	60.82 ± 13.64	30.11 ± 15.25
Muertos (%)	1.52 ± 1.61	7.23 ± 5.28
Apoptóticos (%)	35.92 ± 13.01	63.53 ± 16.47

Muestras donde disminuye el porcentaje de apoptosis (n=10)		
Vivos (%)	58.83 ± 10.34	23.55 ± 13.60
Muertos (%)	4.15 ± 5.83	74.90 ± 14.55
Apoptóticos (%)	36.59 ± 9.13	1.54 ± 2.19

Valores son promedios ± D.S

Si bien no se realizó un análisis estadístico, al comparar los valores de ambos sub grupos, se observan similares porcentajes de viabilidad, necrosis y apoptosis antes de la criopreservación. Del mismo modo, en ambos sub grupos, la viabilidad posterior a la descongelación fue similar.

Sin embargo, después de la criopreservación, encontramos que en el sub grupo con disminución de apoptosis se produjo un gran aumento de células muertas; mientras que en el sub grupo con aumento de la apoptosis se produce una notoria disminución en los espermatozoides necróticos.

## V. DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo demuestran por primera vez como la criopreservación afecta el porcentaje de apoptosis en espermatozoides de alpaca. Para lograrlo se empleó un marcador de apoptosis tardía, la caspasa 3/7, analizada antes y después del proceso de criopreservación mediante la técnica de citometría de flujo. En otras especies se sabe que, tras la producción de ROS mitocondriales y la supresión de la motilidad, causados por el proceso de criopreservación (Said *et al.*, 2014), los espermatozoides exhiben un cuadro de apoptosis. Una apoptosis temprana expresada en la externalización de la fosfatidilserina (PS) (Anzar *et al.*, 2002 Talarczyk-Desole *et al.*, 2016); y últimamente se ha demostrado una apoptosis tardía, expresada en la activación de caspasas (Aitken y Baker, 2013; Paasch *et al.*, 2014). Las caspasas son iniciadoras o ejecutoras en la cascada de las vías apoptóticas; en este estudio

nos centramos en las caspasas ejecutoras, específicamente la 3 y 7 (Earnshaw *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2008). La caspasa 3 decide el destino de la célula en la cascada apoptótica, donde la célula no se puede revertir a su estado normal, por lo que a la caspasa 3 se considera la más importante, su activación marca el punto de no retorno de la apoptosis (Said *et al.*, 2010; Ortega-Ferrusola *et al.*, 2016).

En nuestro estudio se llegó a obtener valores previos a la criopreservación de  $36.21 \pm 11.25\%$  y después de la criopreservación de  $36.58 \pm 33.73\%$ , lo cual indicaría que la criopreservación aparentemente no afecta los niveles de apoptosis. Basándonos en otras especies, se sabe que la criopreservación incrementa la actividad de las caspasas; en semen de bovinos se sabe que existe un incremento de  $2.2 \pm 1\%$  a  $12 \pm 6.3\%$  de actividad de caspasas (Martin *et al.*, 2004), en semen de humano, hay un incremento de  $21 \pm 2.6\%$  a  $47 \pm 5.8\%$  de pan-caspasas activadas y otro estudio señala que la activación de caspasas 3 aumenta de  $39.6 \pm 3.7$  a  $55.4 \pm 3.2\%$  (Paasch *et al.*, 2004; Grunewald *et al.*, 2005), y en semen de equino incrementa de  $20.9 \pm 3\%$  a  $63 \pm 3.4\%$  la activación de caspasas 3 y 7 (Martin-Muñoz *et al.*, 2015). En las especies mencionadas, es importante señalar que, si inician con una apoptosis inicial o fisiológica bajo, tras someterse a un proceso de congelamiento, la proporción de espermatozoides apoptóticos no varía mucho luego de la criopreservación; sin embargo, en especies como el humano y el equino, empiezan con una apoptosis inicial alta, lo que hace que la apoptosis luego de la criopreservación incremente mucho más (Said *et al.*, 2010; Martin-Muñoz *et al.*, 2016).

Las especies con una mejor calidad espermática (pacientes fértiles en humanos) presentan una menor actividad de caspasas 3 en semen fresco, al someterse al proceso de criopreservación, presentan un menor incremento de activación de caspasa 3 (Amor *et al.*, 2018); sin embargo, en el equino como ya se mencionó, presenta una apoptosis inicial alta, esto se debe a que los espermatozoides de mejor calidad espermática son altos productores de ROS (Martín-Muñoz *et al.*, 2016), por eso tomó como referencia para determinar el tamaño muestral; otro aspecto a considerar es la alta variabilidad observadas, no solo en la cantidad de cuerpos apoptóticos, sino también en la actividad de

caspasa 3 observado entre individuos, la tasa de apoptosis parece ser diferente entre sementales (Paasch *et al.*, 2004).

Es interesante destacar que, en nuestro estudio, la desviación estándar (D.S) del porcentaje de espermatozoides apoptóticos post-congelamiento es alta, diferente a las otras especies mencionadas, es por ello que, al revisar individualmente cada muestra, encontramos que existen 2 tipos de muestras, en función a cómo varió la apoptosis por efecto de la criopreservación; en ese sentido tenemos muestras donde la apoptosis disminuye como resultado de la criopreservación; y el grupo donde la apoptosis aumentó después de la criopreservación. En el grupo donde incrementó el porcentaje de apoptosis podemos decir que es lo mismo que ocurre con las otras especies, con la diferencia de que parten con una apoptosis inicial más alta, lo cual activa ambas vías apoptóticas, principalmente la vía mitocondrial, ya que se encontró una mayor proporción de caspasa 9 luego de la criopreservación, lo que respalda dicha afirmación (Martín *et al.*, 2006; Martín-Muñoz *et al.*, 2016). En el grupo donde aumenta la necrosis y disminuye la apoptosis se debe a que los cuerpos apoptóticos que no son fagocitados sufren una necrosis secundaria, caracterizadas por una mayor permeabilidad de la membrana y distensión de la estructura de la membrana citoplasmática (Anzar *et al.*, 2002), a este fenómeno se le conoce como “Cross talk”, relación entre la cascada apoptótica y necrótica (D’Arcy, 2019).

Esto también puede deberse a que las poblaciones de espermatozoides apoptóticos y muertos, se encuentran en una región similar, opuesto a la población de vivos; según Martín *et al.*, (2004), la población que se encuentra en un extremo inferior izquierdo son espermatozoides viables, es una población negativa a marcadores de apoptosis y necrosis (FIT C-VAD-FMK<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), mientras que opuesto a esta población y cercanas entre sí, se encuentra la población positiva a necrosis (PI<sup>+</sup>) y positiva a apoptosis (FIT C-VAD-FMK<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>); de la misma manera Ortega-Ferrusola *et al.* (2016) y Martín-Muñoz *et al.* (2016), utilizando como marcador apoptótico las caspasas 3/7, observaron el mismo comportamiento, la población negativa a ambos marcadores de apoptosis y necrosis, se ubica en un extremo inferior izquierda y opuesto se ubican las

poblaciones de espermatozoides apoptóticos y necróticos como lo muestra la (figura 6).

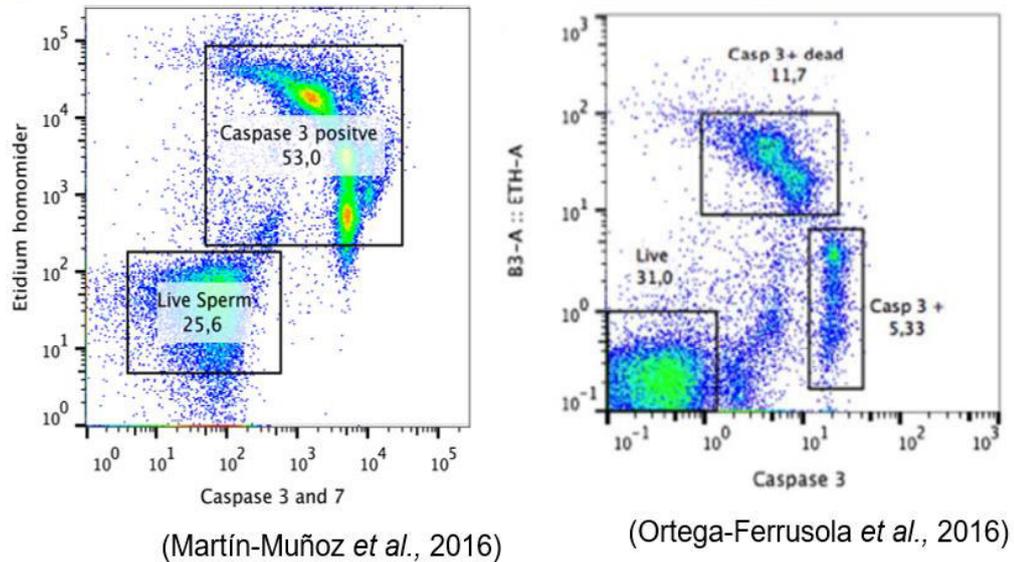


Figura 6. Dot plots donde se muestra la ubicación de las células espermáticas viables y las apoptóticas.

Si analizamos el porcentaje de viabilidad, observamos que hay una disminución, pero eso ya es conocido por otros estudios, donde nos muestran que la criopreservación tiende a disminuir el porcentaje de viabilidad; por ejemplo, en semen de humanos se ha reportado que disminuye de 43 a 22% (Amor *et al.*, 2018), en semen de equinos la viabilidad baja de 80 a 50% (Martín-Muñoz *et al.*, 2015), en semen de bovinos de igual manera, de 72 a 50% (Martín *et al.*, 2004) y en alpacas de 48 a 32% (Santiani *et al.*, 2013), este último, usando muestras de espermatozoides epididimarios; es importante señalar que a diferencia de los estudios mencionados, todos ellos usaron marcadores de viabilidad espermática, en este estudio nos enfocamos en el porcentaje de apoptóticos y necróticos, siendo la población negativa a ambos marcadores, espermatozoides viables. Con respecto al aumento del porcentaje de espermatozoides necróticos o muertos, es interesante también la alta D.S después del proceso de criopreservación. Lo cual indicaría en base a nuestros resultados, que las poblaciones de espermatozoides apoptóticos y muertos son bastante similares y al congelar los espermatozoides de alpaca disminuyen la

población de vivos, pero aumentan una de las poblaciones, ya sea los necróticos o los apoptóticos.

Las caspasas inician y aceleran el proceso de apoptosis durante la criopreservación (Wundrich *et al.*, 2004; Amor *et al.*, 2018); pero también están implicadas en el proceso fisiológico de la espermatogénesis, manteniendo la homeostasis en los testículos mediante la eliminación de células germinales excedentes y anormales; teniendo una apoptosis inicial o umbral en todos los mamíferos (Said *et al.*, 2004; Caselles *et al.*, 2014). En este estudio obtuvimos una apoptosis fisiológica elevada de espermatozoides epididimarios de alpaca, en comparación a otras especies, a excepción del equino; esta proporción inicial alta nos indica que existe una alta producción de especies reactiva de oxígeno en los espermatozoides de alpaca que activa ambas vías apoptóticas (Renema *et al.*, 2020); siendo la criopreservación un proceso que activa más aún la apoptosis, tener en cuenta que la calidad espermática también influye en la activación de caspasas, los espermatozoides necróticos generan un incremento de poblaciones de espermatozoides muertos, concluyendo que la alpaca es una especie que los espermatozoides son más susceptibles que otras especies, de morir por necrosis o apoptosis (Chatterjee *et al.*, 2001; Martin-Muñoz *et al.*, 2016).

Los métodos de criopreservación de los espermatozoides necesitan de muchas investigaciones para conocer mejor los cambios bioquímicos y fisiológicos que ocurren en los espermatozoides durante la exposición a la congelación y descongelación, ya sean muestras de semen o espermatozoides epididimarios (Paasch *et al.*, 2014; Amor *et al.*, 2018). En los últimos años los mecanismos moleculares asociados con la senescencia espermática acelerada o espermptosis, como recientemente se ha denominado, han comenzado a entenderse mejor (Martin-Muñoz *et al.*, 2016).

Es muy importante considerar diferentes marcadores de estrés oxidativo, para predecir todos los efectos negativos de la criopreservación; y en un futuro nos ayude en la selección de muestras de espermatozoides para congelar (Martin-Muñoz *et al.*, 2016).

## VI. CONCLUSIONES

- Se concluye que la criopreservación afecta el porcentaje de apoptosis en las muestras de espermatozoides epididimarios de alpaca.
- En este estudio se demuestra que hay 2 maneras diferentes de afectar el porcentaje de apoptosis, ya sea incrementando o disminuyendo la proporción de espermatozoides apoptóticos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. **Abraham M, Puhakka J, Ruete A, Al-Essawe E, De Verdier K, Morrell J, Båge R. 2015.** Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Ac. Vet. Scandinavica*, 58(1). doi:10.1186/s13028-016-0191-x
2. **Abraham M, De Verdier K, Båge R, Morrell J. 2017.** Semen collection methods in alpacas. *Vet. Re*, 180(25), 613-614. doi:10.1136/vr.104074
3. **Agarwal A, Said T. 2004.** Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int.* 2005 Mar; 95(4): 503-7. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05328.x.
4. **Agca Y, Critser J. 2002.** Cryopreservation of Spermatozoa in Assisted Reproduction. *Sem. Reprod. Med.* 20(1), 015-024. doi:10.1055/s-2002-23516
5. **Aitken R y Baker M. 2013.** Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int. J. Dev. Biol.* 57(2-3-4), 265-272. doi:10.1387/ijdb.130146ja
6. **Al-Essawe E, Abraham C, Kunkitti P, Axné E, De Verdier K, Båge R, Morrell J. 2020.** Extenders for alpaca epidymal spermatozoa: Comparison of INRA96 and andromed. *Anim. Reprod. Sci.* 223, 106629. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106629

- 7. Allauca P, Ugarelli A, Santiani A. 2019.** Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 30(1), 288–298. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15677>.
- 8. Amor H, Zeyad A, Alkhaled Y, Laqqan M, Saad A, Ben Ali H, Hammadeh M. 2018.** Relationship between nuclear DNA fragmentation, mitochondrial DNA damage and standard sperm parameters in spermatozoa of fertile and sub-fertile men before and after freeze-thawing procedure. *Andrologia*, 50(5), e12998. doi:10.1111/and.12998
- 9. Anglada T, Terradas M, Hernández L, Genesca A, Martin-Muñoz M. 2015.** Analysis of residual DSBs in Ataxia-Telangiectasia Lymphoblast cells initiating apoptosis. Hindawi Publishing Corporation. *Bio. Med. Res. Int.* Volume 2016, Article ID 8279560, 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8279560>.
- 10. Banda J, Evangelista-Vargas S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, Santiani A. 2010.** Efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 21(2), 145-153. <https://doi.org/10.15381/rivep.v21i2.129>
- 11. Bravo P, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47(3), 619-626. doi:10.1016/s0093-691x (97)00020-4
- 12. Bravo P, Skidmore J, Zhao X. 2000.** Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3), 173-193. doi:10.1016/s0378-4320(00)00158-5
- 13. Bravo P, Alarcón V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, Tito F. 2013.** Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 136(3), 157-163. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.005

14. **Brown B. 2000.** A review on reproduction in South American camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 58(3-4), 169-195.doi:10.1016/s0378-4320(99)00081-0
15. **Caselles A, Miro-Moran A, Morillo A, Gallardo J, Ortega-Ferrusola C, Salido G, Aparicio I. 2014.** Identification of apoptotic bodies in equine semen. *Reprod. Dom. Anim.* 49(2), 254-262.doi:10.1111/rda.12264
16. **Chatterjee S, Lamirande E, Gagnon C. 2001.** Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev.* 60(4), 498-506.doi:10.1002/mrd.1115
17. **Chaveiro A, Santos P, Da Silva F. 2007.** Assessment of Sperm Apoptosis in Cryopreserved Bull Semen After Swim-up treatment: A Flow Cytometric Study. *Reprod. Dom. Anim.* 42(1), 17-21.doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00712.x
18. **Curry M. 2007.** Cryopreservation of Mammalian Semen. *Met. Mol. Biol.* 303-311.doi:10.1007/978-1-59745-362-2-21
19. **D´Arcy M. 2019.** Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 43(6): 582-592.doi: 10.1002/cbin.11137.
20. **Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz M, Lassota P, Traganos F. 1992.** Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, 13(8), 795-808.doi:10.1002/cyto.990130802
21. **Earnshaw W, Martins L, Kaufmann S. 1999.** Mammalian Caspases: Structure, Activation, Substrates, and Functions During Apoptosis. *An. Rev. Bioch.* 68(1), 383-424.doi: 10.1146/annurev.biochem.68.1.383
22. **Evangelista-Vargas D, Evangelista-Vargas S, Valdivia M, Santiani A. 2016.** Assessment of spermatozoa in fertile alpaca (*Vicugna pacos*) males: Study of sperm head morphometry using a nonautomated digital method and sperm morphology based on strict criteria. *Reprod. Dom. Anim.* 52 (2), 312-318.doi: 10.1111/rda.12907

- 23. Evangelista-Vargas S y Santiani A. 2017.** Detection of intracellular reactive oxygen species (superoxide anion and hydrogen peroxide) and lipid peroxidation During cryopreservation of alpaca spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 52(5), 819-824.doi:10.1111/rda.12984
- 24. Fernández-Baca, S. 1971.** La alpaca, reproducción y crianza. Lima. Ministerio de Agricultura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura. Boletín de Divulgación N° 7, 43 pp.
- 25. Fernández-Baca S. 1993.** Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 307-323.doi: 10.1016/ 0378-4320(93)90121-7.
- 26. Flores P, García-Huidobro J, Muñoz C, Bustos-Obregón E, Urquieta B. 2002.** Alpaca semen characteristics previous to a mating period. *Anim. Reprod. Sci.* 72(3-4), 259-266.doi:10.1016/s0378-4320(02)00095-7
- 27. Fumuso F, Bertuzzi M, Velásquez N, Miragaya M, Carretero M. 2021.** Cryopreservation of llama semen using a combination of permeable cryoprotectants. *Reprod. Dom. Anim.* 56(7), 958-964.doi:10.1111/rda.13937
- 28. Garnica J, Achata R, Bravo P. 1993.** Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim. Reprod. Sci.* 32(1-2), 85-90.doi:10.1016/0378-4320(93)90059-z
- 29. Grunewald S, Paasch U, Wuendrich K, Glander H. 2005.** Sperm caspases become more activated in infertility patients than healthy donors during cryopreservation. *Arch. Androl.* 51(6), 449-460.doi:10.1080/014850190947813
- 30. Huanca W, Adams G. 2007.** Semen Collection and Artificial Insemination in Llamas and Alpacas. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, Youngquist R and Threlfall W. 2° Edition Saunders. Elsevier Inc. 869-873.
- 31. Juárez J, Santiani A. 2019.** Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos del epidídimo de

alpaca. Rev. Inv. Vet. Perú. 30(3), 1175-1183. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16608>

- 32. Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. 2004.** Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. Biol. Reprod. 71(1), 28-37. doi:10.1095/biolreprod.103.024281
- 33. Martin-Muñoz P, Ortega C, Vizúete G, Plaza M, Rodríguez H, Peña F. 2015.** Depletion of Intracellular Thiols and Increased Production of 4-Hydroxynonenal that Occur During Cryopreservation of Stallion Spermatozoa Lead to Caspase Activation, Loss of Motility, and Cell Death. Biol. Reprod. (2015) 93:143, 1–11. doi: 10.1095/biolreprod.115.132878.
- 34. Martin-Muñoz P, Ortega C, Anel L, Del Petre C, Álvarez M, De Paz P, Anel L, Peña F. 2016.** Caspase 3 activity and lipoperoxidative status in raw semen predict the outcome of cryopreservation of stallion spermatozoa. Biol. Reprod, 95 (3), 53-53. doi:10.1095/biolreprod.116.139444.
- 35. Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel L, De Paz P. 2010.** Probes and techniques for sperm Evaluation by Flow Cytometry. Reprod. Dom. Anim. 45, 67-78. doi:10.1111/j.1439-0531.2010. 01622.x
- 36. Miragaya M, Chaves M, Agüero A. 2006.** Reproductive biotechnology in South American camelids. S. Rum. Res.,61(2-3), 299-310. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.07.017
- 37. Morton M, Bathgate R, Evans G, Maxwell M. 2007.** Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. Reprod. Fe. Devel. 19(7), 792. doi:10.1071/rd07049
- 38. Ortega-Ferrusola C, Anel-López L, Martin-Muñoz P, Ortiz Rodríguez J, Gil M, Álvarez M, Peña F. 2016.** Computational flow cytometry reveals that cryopreservation induces spermatosis but subpopulations of spermatozoa may experience capacitation-like changes. Reproduction, 153(3), 293-304. doi:10.1530/rep-16-0539

- 39. Ortega-Ferrusola C, Anel-López L, Ortiz-Rodríguez M, Martín-Muñoz P, Álvarez M, De Paz P, Peña J. 2017.** Stallion spermatozoa surviving freezing and thawing experience membrane depolarization and increased intracellular Na<sup>+</sup>. *Andrology*, 5, 1174–1182. doi.org/10.1111/andr.12419.
- 40. Paasch U, Sharma R, Gupta A, Grunewald S, Mascha E, Thomas A, Glander H, Agarwal A. 2004.** Cryopreservation and thawing Is Associated with Varying Extent of Activation of Apoptotic Machinery in Subsets of Ejaculated Human Spermatozoa<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* 71(6), 1828-1837. doi:10.1095/biolreprod.103.025627
- 41. Paoli D, Pelloni M, Lenzi A, Lombardo F. 2019.** Cryopreservation of sperm: Effects on Chromatin and Strategies to Prevent Them. *Adv. In Exp. Biol.* 149-167. doi:10.1007/978-3-030-21664-1-9
- 42. Renema P, Kozhukhar N, Pastukh V, Spadafora D, Subedi S, Tambe D, Alexeyev M, Frank D, Stevens T. 2020.** Exoenzyme Y induces extracellular active caspases-7 accumulation independent from apoptosis: Modulation of transmissible cytotoxicity. *Amer. J. Phy. Lung Cel. Mol. Phy.* 319(2): L380-L390. Doi: 10.1152/ajplung.00508.2019
- 43. Said T, Paasch U, Juergen H, Agarwal A. 2004.** Role of caspases in male infertility. *Human. Reprod. Up*, 10(1), 39-51. doi:10.1093/humupd/dmh003
- 44. Said T, Gaglani A, Agarwal A. 2010.** Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reprod. Bio. Med. On*, 21(4), 456-462. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.05.011
- 45. San Martin M, Copaira M, Zuñiga J, Rodreguez R, Bustinza G, Acosta L. 1968.** Aspects of Reproduction in the alpaca. *Reproduction*, 16(3), 395-399. doi:10.1530/jrf.0.0160395
- 46. Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepulveda N, Sanchez R. 2005.** Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and

extenders. *Asian J. Androl.* 7(3), 303-309.doi:10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x

- 47. Santiani A, Evangelista S, Cheuquemán A, Von Baer A, Risopatrón J, Sánchez R. 2012.** Evaluación de la integridad de ADN, mediante citometría de flujo en espermatozoides de alpaca criopreservadas con análogos de superóxido dismutasa. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 23(2),182-191.<https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.898>
- 48. Santiani A, Evangelista-Vargas S, Valdivia M, Risopatrón J, Sánchez R. 2013.** Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology*, 79(5), 842-846.doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.12.012
- 49. Santiani A, Ugarelli A, Evangelista-Vargas S. 2016.** Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 173, 49-55.doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.010
- 50. Silva A, Cardoso R, Uchoa D, Silva L. 2003.** Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 59: 821-829.doi.org/10.1016/S0093-691X.01130-5
- 51. Silva P y Gadella B. 2006.** Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958-978.doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.010
- 52. Ugarelli A, Evangelista-Vargas S, Santiani A. 2017.** Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 28(1),130-140.<https://doi.org/10.15381/rivep.v28il.12947>
- 53. Ugur M, Saber Abdelrahman A, Evans H, Gilmore A, Hitit A, Arifiantini M, Memili E. 2019.** Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Front. Vet. Sci.* 6.doi:10.3389/fvets.2019.00268
- 54. Urquieta B, Flores P, Muñoz C, Bustos-Obregón E, García-Huidobro J. 2005.** Alpaca semen characteristics under free and

directed mounts during a mating period. Anim. Reprod. Sci. 903(3-4), 329-339.doi: 10.1016/j.anireprosci.2005.01.019

**55. Walsh J, Cullen S, Sheridan C, Luthi A, Gerner C, Martin S. 2008.**

Executioner caspasa-3 and caspasa 7 are functionally distinct proteases. Proc. Nat. Acad. Sci. 105(35), 12815-12819.doi:10.1073/pnas.0707715105

**56. Wheeler J. 1995.** Evolution and present situation of the South

American Camelidae. Biolog. J. Lin. Soc. 54(3), 271-295. doi:10.1111/j.1095-8312.1995.tb01037.x

**57. Woelders H. 1997.** Fundamentals and recent development in

cryopreservation of bull and boar semen. Vet. Quarterly, 19(3), 135-138.doi:10.1080/01652176.1997.9694758

**58. Wundrich K, Paasch U, Leicht M, Glander H. 2006.** Activation of

Caspases in Human Spermatozoa during Cryopreservation-An Immunoblot Study. Cel. Tis. Bank, 7(2), 81-90.doi:10.1007/s10561-005-0276-7

## VIII ANEXOS

Anexo 1: Datos donde se muestran los datos iniciales de peso, longitud, alto, volumen, concentración y motilidad espermática de las 23 muestras analizadas.

Datos iniciales								
Id	Fecha	Peso	Longitud	Ancho	Alto	Volumen	Concent	Mot
1A	24/11/2021	14.98	4.2	2.1	2	17.64	31	10
2B	24/11/2021	13.35	3.6	2	2.1	15.12	9	0
3A	24/11/2021	13.19	3.5	2.1	2.3	16.91	6	20
3B	24/11/2021	18.82	5	2.3	2.4	27.60	211	55
4A	1/12/2021	24.38	4.6	2.6	3	35.88	272	50
4B	1/12/2021	24.03	4.7	2.7	3	38.07	352	60
5A	1/12/2021	14.64	3.2	2.2	2.6	18.30	298	20
5B	1/12/2021	16.26	3.6	2.3	2.4	19.87	66	10
6A	1/12/2021	10.39	3.4	2	2	13.60	145	50
9A	1/12/2021	15.45	3.9	2.4	2.3	21.53	178	65
9B	1/12/2021	15.90	3.4	2.3	2.4	18.77	68	10

10A	1/12/2021	12.48	3.7	2.2	2.1	17.09	24	30
12A	15/12/2021	19.78	4.1	2.4	2.5	24.60	88	20
12B	15/12/2021	17.64	3.9	2.4	2.4	22.46	85	15
13A	15/12/2021	19.67	4	2.5	2.6	26.00	12	75
13B	15/12/2021	17.21	4	2.6	2.6	27.04	105	50
14A	15/12/2021	16.64	3.9	2.1	2.2	18.02	6	40
18A	22/12/2021	19.97	3.6	2.6	2.7	25.27	151	40
18B	22/12/2021	18.33	4	2.4	2.5	24.00	253	25
19B	22/12/2021	18.97	3.9	2.5	2.6	25.35	99	10
20A	22/12/2021	15.72	3.6	2.2	2.4	19.01	133	35
20B	22/12/2021	19.76	4.2	2.5	2.6	27.30	208	60
21A	22/12/2021	16.10	3.6	2.4	2.3	19.87	48	70
<b>Promedio</b>		17.12	3.90	2.34	2.43	22.58	123.83	35.65
<b>D.S.</b>		3.39	0.44	0.20	0.27	6.11	101.79	22.38

Anexo 2: Datos de las 23 poblaciones de vivos, muertos y caspasa 3 y 7 activas, antes y después del congelamiento.

	Pre-congelamiento			Post-congelamiento		
	Vivos	Muertos	Caspasas+	Vivos	Muertos	Caspasas+
1A	48.70	13.60	37.90	25.3	73.4	2.27
2B	56.10	16.30	30.30	56.6	39.9	7.33
3A	96.00	0.99	2.93	72.9	13.2	14.9
3B	51.90	5.87	36.60	35.9	8.77	56.1
4A	60.3	2.75	36.7	23.7	9.26	62.5
4B	63.7	0.72	34.4	31.4	3.86	64
5A	52.9	0.07	46.5	32.5	2.37	63.7
5B	42.3	4.12	53.3	26.7	72.9	0.11
6A	57.6	0.17	41.6	39.9	0.49	59.5
9A	53.5	1.16	44.6	21.1	76.9	1.25
9B	73.5	0.64	24.9	32.6	1.5	64.2
10A	75.8	0.4	23.5	27.4	71.9	0.25
12A	55.1	1.93	41.7	11.7	87.9	0.28
12B	71.1	0.71	27.2	14.6	84.7	0.56
13A	57.8	0.69	39.8	14.5	84.7	0.54
13B	68.7	1.57	28.6	28.6	66.6	2.33
14A	59.2	0.97	39	9.01	90.1	0.43
18A	39.9	2.49	56.7	9	17.2	83
18B	62.1	2.82	33.1	27.9	11.7	63.1
19B	69.2	0.84	28.1	25.5	3.22	72.5
20A	58	1.25	39	20.4	11.8	71.2
20B	56.5	0.61	37.8	19.4	2.58	77.7

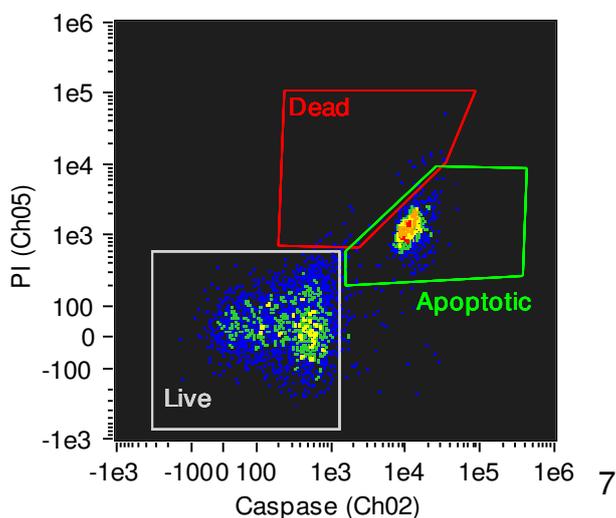
21A	49.1	0.51	48.6	20.3	8.01	73.5
Promedio	59.96	2.66	36.21	27.26	36.65	36.58
D.S	12.09	4.13	11.25	14.62	35.75	33.73

Anexo 3: Datos de las muestras donde incrementa la apoptosis (n=13)

n=13	Pre-congelamiento			Post-congelamiento		
	Vivos	Muertos	Caspasas+	Vivos	Muertos	Caspasas+
3 A	96.00	0.99	2.93	72.9	13.2	14.9
3 B	51.90	5.87	36.60	35.9	8.77	56.1
4 A	60.3	2.75	36.7	23.7	9.26	62.5
4 B	63.7	0.72	34.4	31.4	3.86	64
5 A	52.9	0.07	46.5	32.5	2.37	63.7
6 A	57.6	0.17	41.6	39.9	0.49	59.5
9 B	73.5	0.64	24.9	32.6	1.5	64.2
18 A	39.9	2.49	56.7	9	17.2	83
18 B	62.1	2.82	33.1	27.9	11.7	63.1
19 B	69.2	0.84	28.1	25.5	3.22	72.5
20 A	58	1.25	39	20.4	11.8	71.2
20 B	56.5	0.61	37.8	19.4	2.58	77.7
21 A	49.1	0.51	48.6	20.3	8.01	73.5
Promedio	60.82	1.52	35.92	30.11	7.23	63.53
D.S	13.64	1.61	13.01	15.25	5.28	16.47

Anexo 4: Dot-Plot de una de las muestras donde se evidencia un incremento de la apoptosis.

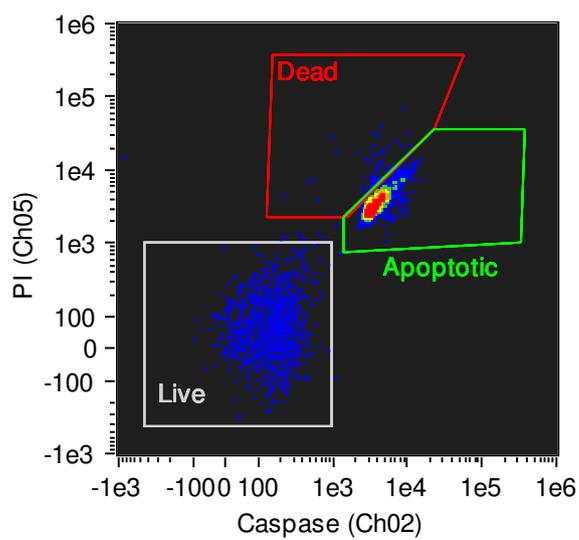
Sperm -19B Esp epid  
alpaca Caspasa PI MDR  
22.12.21\_9



Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	3554	100

Sperm -19B Esp epid  
alpaca criop Caspasa  
PI MDR 23.12.21\_9



Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	4820	100
Live & Sperm & R1	1231	25.5
Dead & Sperm & R1	155	3.22
Apoptotic & Sperm & R1	3494	72.5

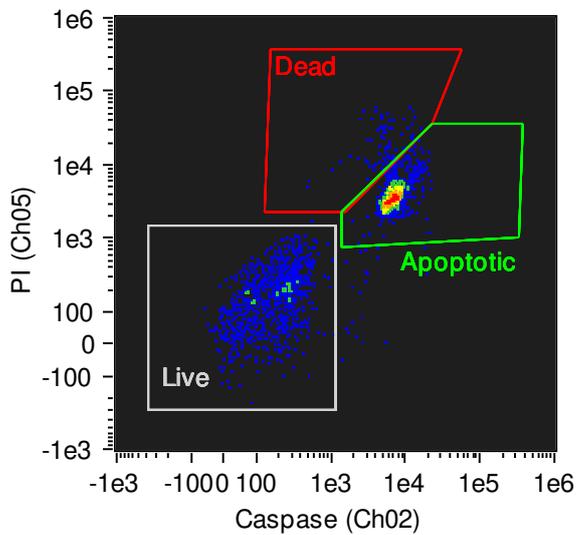
Anexo 5: Datos de las muestras donde disminuye la apoptosis (n=10)

n=10	Pre-congelamiento			Post-congelamiento		
	Vivos	Muertos	Caspasas+	Vivos	Muertos	Caspasas+
1 A	48.70	13.60	37.90	25.3	73.4	2.27

2 B	56.10	16.30	30.30	56.6	39.9	7.33
5 B	42.3	4.12	53.3	26.7	72.9	0.11
9 A	53.5	1.16	44.6	21.1	76.9	1.25
10 A	75.8	0.4	23.5	27.4	71.9	0.25
12 A	55.1	1.93	41.7	11.7	87.9	0.28
12 B	71.1	0.71	27.2	14.6	84.7	0.56
13 A	57.8	0.69	39.8	14.5	84.7	0.54
13 B	68.7	1.57	28.6	28.6	66.6	2.33
14 A	59.2	0.97	39	9.01	90.1	0.43
Promedio	58.83	4.15	36.59	23.55	74.90	1.54
D.S	10.34	5.83	9.13	13.60	14.55	2.19

Anexo 6: Dot-Plot de una de las muestras donde se evidencia una disminución de la apoptosis.

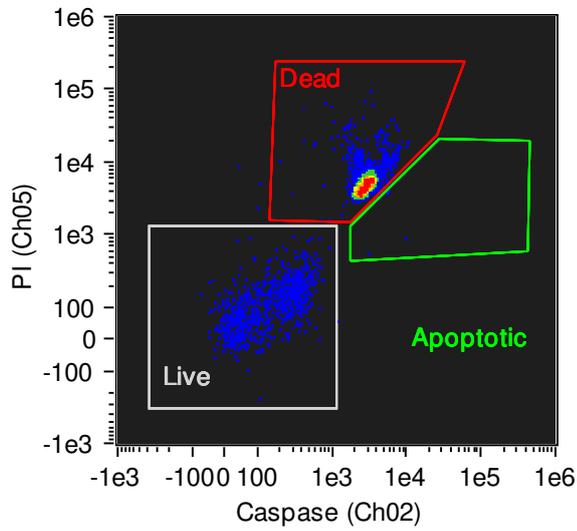
Sperm -5B Esp epid  
alpaca Caspasa PI MDR  
01.12.21\_12



Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	2232	100
Live & Sperm & R1	945	42.3
Dead & Sperm & R1	92	4.12
Apoptotic & Sperm & R1	1190	53.3

Sperm -5B Esp epid  
 alpaca criop Caspasa  
 PI MDR 02.12.21\_12



Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	3503	100
Live & Sperm & R1	937	26.7
Dead & Sperm & R1	2554	72.9
Apoptotic & Sperm & R1	4	0.11

Anexo 7: Análisis estadístico utilizando el test de Kolmogorov-Smirnov para ver si se sigue una distribución normal

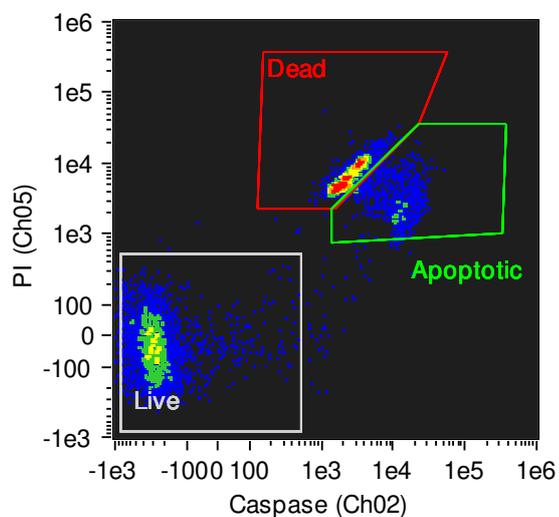
Análisis estadístico del antes y después de las 23 muestras	Before	After
Number of values	23	23
Minimum	2.930	0.110
Median	37.800	56.100
75% Percentile	43.150	67.700
Maximum	56.700	83.000
Mean	36.21	36.58
Std. Deviation	11.25	33.73
Std. Error	2.346	7.032

Lower 95% CI	31.34	21.99
Upper 95% CI	41.08	51.16
Normality Test		
KS distance	0.1225	0.2418
P value	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes
P value summary	ns	ns

Anexo 8: Experimento control con semen de toro para establecer las poblaciones.

A) Control

Sperm -Esp Toro Caspasa  
PI MDR\_2

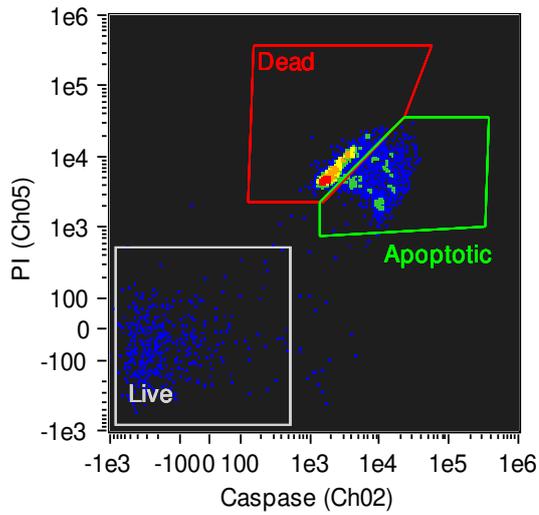


Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	6855	100
Live & Sperm & R1	3670	53.5
Dead & Sperm & R1	2161	31.5
Apoptotic & Sperm & R1	973	14.2

B) Inducido:

Sperm -Esp Toro Caspasa  
PI MDR (Inducido)\_6

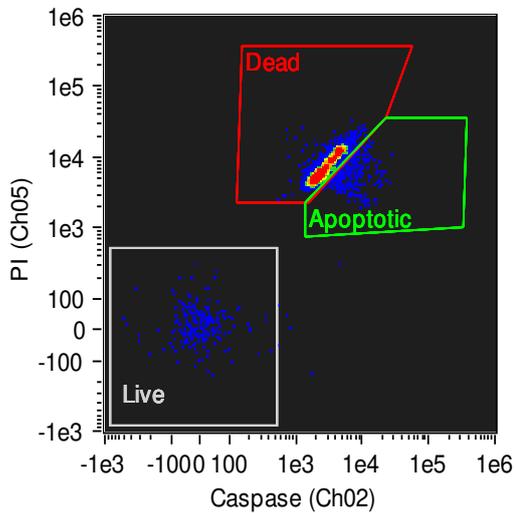


Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	2966	100
Live & Sperm & R1	408	13.8
Dead & Sperm & R1	1539	51.9
Apoptotic & Sperm & R1	1070	36.1

C) Necrosis:

Sperm -Esp Toro Caspasa  
PI MDR (Necrosis)\_4



Caspase (Ch02)

Population	Count	%Gated
Sperm & R1	7827	100
Live & Sperm & R1	213	2.72
Dead & Sperm & R1	7329	93.6
Apoptotic & Sperm & R1	443	5.66