

UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCABELICA

(Creada por ley N° 25265)

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS

**EFEECTO DE TRES CRIOPROTECTORES EN LA
CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES
EPIDIDIMARIOS DE CUY (*Cavia porcellus*)**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

REPRODUCCIÓN Y TECNOLOGÍA REPRODUCTIVA

PRESENTADO POR:

Bach. JOSE LUIS, MENDOZA MALLMA.

Bach. JOHANN EDER, HUAMANI VENTURA.

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

HUANCAVELICA, PERÚ

2022



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAMELICA
FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS



En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 08 días del mes de noviembre del año 2022, a horas 2:00 p.m., se reunieron los miembros del jurado calificador conformado de la siguiente manera:

PRESIDENTE : Mg. Blas REYMUNDO CONDOR
<https://orcid.org/0000-0003-4191-3554>
DNI N° 19916801

SECRETARIO : M.Sc. José Luis CONTRERAS PACO
<https://orcid.org/0000-0003-4591-3885>
DNI N° 23276626

VOCAL : M.Sc. Yola Victoria RAMOS ESPINOZA
<https://orcid.org/0000-0003-3552-3744>
DNI N° 20710205

Designados con Resolución de Decano N° 142-2019-FCI-UNH, de fecha 09 de agosto del 2019, a fin de proceder el acto académico de evaluación y calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "EFECTO DE TRES CRIOPROTECTORES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE CUY (*Cavia porcellus*)", presentado por los Bachilleres **José Luis MENDOZA MALLMA con DNI N° 42101044** y **Johann Eder HUAMANI VENTURA con DNI N° 42446998**; con presencia del Ing. Marino Artica Félix, <https://orcid.org/0000-0002-5035-8786> y **DNI N° 19858610**, Asesor de la presente tesis a fin de optar el **Título Profesional de Ingeniero Zootecnista**. Finalizada la sustentación a horas.....3:45 pm; se invitó al público presente y a los sustentantes abandonar el recinto. Luego de una amplia deliberación por parte de los jurados, se llegó al siguiente resultado:

Bach. José Luis MENDOZA MALLMA

APROBADO ☒ POR UNANIMIDAD

DESAPROBADO ☐ POR

Bach. Johann Eder HUAMANI VENTURA

APROBADO ☒ POR UNANIMIDAD

DESAPROBADO ☐ POR

En señal de conformidad, firmamos a continuación:

Presidente

Secretario

Vocal

Vº Bº Decano

TITULO

EFFECTO DE TRES CRIOPROTECTORES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE CUY (*Cavia porcellus*)

AUTORES

Bach. JOSE LUIS, MENDOZA MALLMA

Bach. JOHANN EDER, HUAMANI VENTURA

ASESOR

Ing. MARINO, ARTICA FÉLIX

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5035-8786>

DNI: 19858610

AGRADECIMIENTO

A vuestra familia, quienes apoyaron incondicionalmente desde el primer momento del proceso de formación, donde nos brindaron las oportunidades necesarias a fin de lograr nuestros objetivos de ser profesionales.

A la Escuela Profesional de Zootecnia y a la Universidad Nacional de Huancavelica, en donde encontramos el espacio indicado para el desarrollo cognitivo y la superación académica, de la misma manera a la plana de docentes quienes nos proporcionaron mayores conocimientos para alcanzar las metas trazadas, y a los compañeros con quienes compartimos momentos gratos e inolvidables.

Al Ing. Marino Artica Félix asesor de la tesis, quien nos guio en la investigación y la culminación del proyecto de tesis.

Al Ing. Miguel Saez Huamán, por su apoyo incondicional en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Universidad Nacional de Huancavelica.

Jose, Johann

Tabla de contenido

Tabla de contenido	vii
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Introducción	xv
CAPÍTULO I	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.1. Descripción del problema	16
1.2. Formulación del problema	17
1.2.1. Problema general	17
1.2.2. Problemas específicos	17
1.3. Objetivos	17
1.3.1. Objetivos generales	17
1.3.2. Objetivos específicos	17
1.4. Justificación	18
CAPÍTULO II	20
MARCO TEÓRICO	20
2.1. Antecedentes	20
2.2. Bases teóricas	23
2.2.1. Cuy	23
2.2.2. Aspectos reproductivos	24

2.2.3. Testículo	24
2.2.4. Epidídimo	25
2.2.5. Espermatozoide	25
2.2.6. Estructura del espermatozoide	25
2.2.7. Características organolépticas y microscópicas del semen	24
2.2.8. Concentración espermática	24
2.2.9. Crioprotector	30
2.2.10. Crioprotectores premiabiles	31
2.2.11. Crioprotectores no premiabiles	31
2.3. Definición de términos	31
2.4. Hipótesis	32
2.4.1. Hipótesis alterna	32
2.4.2. Hipótesis nula	32
2.5. Variables	32
2.6. Operacionalización de variables	33
CAPÍTULO III	34
MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Ámbito temporal y espacial	34
3.2. Tipo de investigación	34
3.3. Nivel de investigación	34
3.4. Método de investigación	34
3.5. Diseño de investigación	35
3.6. Población, muestra y muestreo	35

3.6.1. La población	35
3.6.2. Muestra y muestreo	35
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	35
3.7.1. Materiales y reactivos	35
3.7.2. Toma de muestra	37
3.7.3. Colección y evaluación del semen fresco	37
3.7.4. Motilidad espermática	37
3.7.5. Concentración espermática	38
3.7.6. Vitalidad espermática	38
3.7.7. Integridad de membrana plasmática del espermatozoide (HOST)	40
3.7.8. Congelación del semen	40
3.7.9. Descongelación del semen	40
3.7.10. Evaluación del semen descongelado	41
3.8. Técnicas y procesamiento de análisis de datos	41
3.8.1. Técnica y Procesamiento	41
CAPÍTULO IV	45
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
4.1. Análisis de información	45
4.2. Resultados	48
4.3. Discusión de resultados	50
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÉNDICE	57
PANEL FOTOGRÁFICO	65

Tabla de contenido de tablas

Tabla 1 Variables morfométricas de la cabeza, pieza intermedia y cola del espermatozoide de cuy.	28
Tabla 2 Operacionalización de Variables.	33
Tabla 3 Solución tris – base.	36
Tabla 4 Crioprotectores al 7%.	36
Tabla 5 Fracción A del dilutor sin crioprotector.	36
Tabla 6 Fracción B dilutor más crioprotector.	37
Tabla 7 Características seminales de espermatozoides de la cola del epidídimo de 42 testículos (promedios $\pm$ desviación estándar).	45
Tabla 8 Análisis de varianza para motilidad de espermatozoides epididimarios congelados de cuy.	46
Tabla 9 Efecto de los crioprotectores glicerol (GL), etilenglicol (EG) y dimetilsulfóxido (DMSO), sobre la motilidad post descongelado en espermatozoides epididimarios de cuy.	46
Tabla 10 Análisis de varianza para vitalidad de espermatozoides epididimarios congelados de cuy.	47
Tabla 11 Efecto de los crioprotectores glicerol (GL), etilenglicol (EG) y dimetilsulfóxido (DMSO), sobre la vitalidad post descongelado en espermatozoides de cuy.	48
Tabla 12 Análisis de varianza para integridad de la membrana de espermatozoides epididimarios congelados de cuy.	49
Tabla 13 Efecto de los crioprotectores glicerol (GL), etilenglicol (EG) y dimetilsulfóxido (DMSO), sobre la Host post descongelado en espermatozoides de cuy.	49
Tabla 14 Concentración espermática de espermatozoides epididimarios de cuy.	59
Tabla 15 Datos obtenidos en fresco y post congelado de la motilidad espermática en porcentaje.	60
Tabla 16 Datos obtenidos en fresco y post congelado de vitalidad espermática en porcentaje.	60

Tabla 17 Datos obtenidos en fresco y post congelado de la integridad de la membrana del espermática en porcentaje.	61
Tabla 18 Datos transformados a arcoseno en fresco y post congelado de motilidad espermática.	62
Tabla 19 Datos transformados a arcoseno en fresco y post congelado de vitalidad espermática.	63
Tabla 20 Datos transformados a arcoseno en fresco y post congelado de Host - test.	63

Tabla de contenido de figuras

Figura 1 Esquema de la estructura del espermatozoide.	26
Figura 2 Modelo de liberación de proteínas acrosomales del espermatozoide del cuy.	28
Figura 3 Método de frotis para la evaluación de vitalidad espermática.	39
Figura 4 Espermatozoide fijado en eosina al 2%.	39
Figura 5 Test de normalidad para evaluación espermática en fresco.	42
Figura 6 Test de normalidad para glicerol.	42
Figura 7 Test de normalidad para etilenglicol.	43
Figura 8 Test de normalidad para dimetilsulfóxido.	44
Figura 9 Efecto de los crioprotectores (GL, ET y DMSO) sobre la motilidad espermática.	47
Figura 10 Efecto de los crioprotectores (GL, ET y DMSO) sobre la vitalidad espermática.	48
Figura 11 Efecto de los crioprotectores (GL, ET y DMSO) sobre la membrana plasmática de los espermatozoides.	50
Figura 12 Control de peso de testículos de cuy.	65
Figura 13 Solución madre más crioprotectores.	65
Figura 14 Evaluación microscópica de espermatozoides epididimarios de cuy.	66
Figura 15 Concentración espermática con la cámara de Neubauer improved.	66
Figura 16 Empajillado de las muestras en cada tratamiento.	67
Figura 17 Proceso de congelación y almacenamiento de las muestras congeladas.	67

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cuy (*Cavia porcellus*). Se trabajó 42 testículos provenientes de 21 cuyes, mayores a 900 g de peso vivo de los cuales se extirpo los testículos con el peso promedio (3.84 ± 0.5 g), post mortem. Se determinó en muestra fresca, la concentración espermática ($65.01 \pm 16.0 \times 10^6/\text{ml}$), motilidad ($60.94 \pm 2.5\%$), vitalidad ($64.5 \pm 3.2\%$) e integridad de la membrana plasmática del espermatozoide ($59.4 \pm 4.5\%$), para los tratamientos de criopreservación de las muestras, se utilizó el glicerol (GL), etilenglicol (ET) y dimetilsulfóxido (DMSO) en porcentajes de 7%, para cada uno. Las muestras congeladas, se descongelaron 38°C por 18 segundos, después de 7 días. Los resultados para cada crioprotector fueron, GL, motilidad ($18.8 \pm 1.0\%$), vitalidad ($20.3 \pm 1.4\%$) y Host test ($17.6 \pm 1.3\%$); ET motilidad ($11.7 \pm 1.7\%$), vitalidad ($14.7 \pm 1.5\%$) y Host test ($8.2 \pm 4.5\%$) y DMSO la motilidad ($3.3 \pm 3.5\%$), vitalidad ($5.7 \pm 4.2\%$) y Host test ($2.6 \pm 2.7\%$). Existe diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos con los tres crioprotectores, en cada una de las variables en estudio, motilidad vitalidad e integridad de la membrana plasmática del espermatozoide. Se concluye que el crioprotector GL es el más efectivo para la tasa de sobrevivencia de los espermatozoides congelados, frente a ET y DMSO.

Palabras clave: Criopreservación, espermios (*Cavia purcellus*), crioprotectores.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of three cryoprotectants in the cryopreservation of epididymal spermatozoa from guinea pigs (*Cavia porcellus*). We worked 42 testicles from 21 guinea pigs, greater than 900 g of live weight, from which the testicles with the average weight (3.84 ± 0.5 g), post mortem, were removed. In a fresh sample, sperm concentration ($65.01 \pm 16.0 \times 10^6/\text{ml}$), motility ($60.94 \pm 2.5\%$), vitality ($64.5 \pm 3.2\%$) and integrity of the sperm plasma membrane ($59.4 \pm 4.5\%$) were determined, for For the cryopreservation treatments of the samples, glycerol (GL), ethylene glycol (ET) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were used in percentages of 7% for each one. Frozen samples were thawed at 38°C for 18 seconds after 7 days. The results for each cryoprotectant were GL, motility ($18.8 \pm 1.0\%$), vitality ($20.3 \pm 1.4\%$) and Host test ($17.6 \pm 1.3\%$); ET motility ($11.7 \pm 1.7\%$), vitality ($14.7 \pm 1.5\%$) and Host test ($8.2 \pm 4.5\%$) and DMSO motility ($3.3 \pm 3.5\%$), vitality ($5.7 \pm 4.2\%$) and Host test ($2.6 \pm 2.7\%$). There are significant differences ($P < 0.05$) between treatments with the three cryoprotectors, in each of the variables under study, motility, vitality and integrity of the sperm plasma membrane. It is concluded that the GL cryoprotectant is the most effective for the survival rate of frozen spermatozoa, compared to ET and DMSO.

Keywords: Cryopreservation, sperm (*Cavia purcellus*), cryoprotectants.

INTRODUCCIÓN

El cuy (*Cavia porcellus*), es una fuente importante del aporte de proteínas para la población rural y urbana (Cabeza et al., 2020; Chauca, 1997; Grégoire et al., 2010). La carne es magra de buena calidad con proteína 20.3%, con bajo contenido de colesterol (65mg/100g), esto hace que el cuy sea más competitivo en el mercado nacional y mundial (Santos, 2016).

La criopreservación de gametos del macho como de la hembra del cuy, ha despertado el interés de su estudio, en los diferentes países de Sudamérica, con fines de estudios biomédicos y en otros casos, en estudios zootécnicos. La importancia de la criopreservación de gametos es conservar y diseminar el material genético de los animales sobresalientes.

Los eyaculados de los cuyes machos presentan características peculiares, como producir tapones copulatorios para prevenir la fecundación de la hembra por otros machos (Cabeza et al., 2020), otra característica es la presencia de rouleaux, o el apilamiento de los espermatozoides, uno sobre otro, esta característica ocurre en el epidídimo (Cabeza et al., 2020; Freund, 1969). En caso de las hembras hay estudios desde sincronización de celo hasta transferencia embrionaria (Grégoire et al., 2010), hoy en día hay estudios en la criopreservación de gametos del machos en algunos casos con resultados satisfactorio y en otros casos sin resultados. Es por ello que el presente estudio ha realizado, la criopreservación de gametos del macho, con la finalidad de comparar que crioprotector es mejor, sobre la tasa de sobrevivencia de los espermatozoides epididimarios, post congelados.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.Descripción del problema

El cuy o cobayo, es un mamífero roedor originario de la zona andina de Perú, Bolivia, Colombia y Ecuador. El cuy constituye un producto alimenticio de alto valor nutricional que contribuye a la seguridad alimentaria de la población rural de escasos recursos (Chauca, 1997b).

En los países andinos existe una población más o menos de 35 millones de cuyes. En el Perú, país con mayor población y consumo de cuyes, se registra una producción anual de 16 500 toneladas de carne proveniente del beneficio de más de 65 millones de cuyes (Chauca, 1997). En la actualidad se estima, más de 80 mil familias empoderadas en la producción de cuyes en el Perú, además de generar fuentes de ingreso en el sector rural, se ha incrementado la participación de la mujer 84%, como líder de la cadena productiva (INIA, 2020).

La producción de cuyes es de suma importancia, por su valor proteico de su carne, y de la alta demanda de la población consumidor, estos factores, hacen que el cuy sea un producto prometedor dentro del mercado local y nacional.

El uso de las tecnologías reproductivas en esta especie recién está en sus primeras fases, hay estudios en la actualidad de las características seminales hasta cultivo celular de fibroblastos, pero hay escasos estudios en la criopreservación de gametos masculinos. Por lo tanto, es necesario desarrollar

protocolos de criopreservación de semen de cuy para contribuir a la difusión del germoplasma dentro y fuera del país.

Por el cual, se planteó el presente estudio con la finalidad de evaluar el efecto de tres crioprotectores (glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol) en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Cuy (*Cavia porcellus*)

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Cuál es el efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Cuy (*Cavia porcellus*)?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuál es el efecto del glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Cuy (*Cavia porcellus*)?
- ¿Cuál es el efecto del etilenglicol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Cuy (*Cavia porcellus*)?
- ¿Cuál es el efecto del dimetilsulfóxido en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Cuy (*Cavia porcellus*)?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivos generales

Evaluar el efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cuy (*Cavia porcellus*).

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la motilidad post descongelado de espermatozoides epididimarios de cuy (*Cavia porcellus*).
- Determinar la viabilidad post descongelado de espermatozoides epididimarios de cuy (*Cavia porcellus*).

- Determinar la integridad de la membrana post descongelado de espermatozoides epididimarios de cuy (*Cavia porcellus*).

1.4. Justificación

La importancia del cuy como animal emblemático de los andes (Grégoire et al., 2010; Wright, 1960) y como especie que tiene alto valor proteico por su carne desde el punto de vista nutricional además de sus propiedades saludables que se fundamentan en su calidad proteica (20.3%), su bajo contenido de colesterol (65mg/100g) y poca cantidad de grasa (10%), es una carne magra, y exótica en el mercado mundial (Santos, 2016).

Razón por la cual el Perú empezó a realizar los trabajos de investigación en los años 60, Colombia y Ecuador en los años 70, Bolivia en el 80 y Venezuela en el 90, este esfuerzo conjunto de los países andinos contribuye al desarrollo de la crianza de cuy para el beneficio de sus pobladores (Chauca, 2016).

El resultado de los trabajos de investigación, por ejemplo, es el avance en el mejoramiento genético, haciendo del cuy una especie eficiente en la conversión de alimentos, precoz y extraordinariamente prolífico; todo ello permite vislumbrar nuevas perspectivas de desarrollo competitivo de esta especie en los mercados regionales y el nacional (Santos, 2016). Pero muy poco se ha trabajado en la parte reproductiva y en la aplicación de las tecnologías reproductivas en esta especie.

Hoy en día la criopreservación se ha convertido en un pilar en el laboratorio de reproducción asistida, los primeros gametos usados fueron de animales beneficiados (Ruiz, 2018). Actualmente, la práctica está evolucionando desde métodos de congelación lenta hacia una mayor vitrificación, y es probable que la tecnología futura reduzca la dependencia de la habilidad del operador, lo que debería elevar las tasas de éxito a niveles más altos y uniformes (Gosden, 2011).

El éxito de la congelación de espermatozoides en diferentes especies está en la adición, de los diferentes crioprotectores permeables y no permeables a la membrana celular del espermatozoide. La técnica de semen congelado

permitiría la conservación del material genético sobresaliente, y multiplicar en diferentes ámbitos de nuestra región o fuera.

Por tal motivo el objetivo del estudio es evaluar los efectos post descongelado de los crioprotectores como glicerol, etilenglicol y dimetilsulfóxido, en la tasa de sobrevivencia de los espermatozoides, ya que hasta la fecha no existe protocolos establecidos de criopreservación de semen en esta especie.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1 Internacional

Montenegro, (2022) en su tesis presentada “Evaluación de tres crioprotectores para la crioconservación de semen de cuy (*Cavia porcellus*) extraído de la cola del epidídimo en el Centro Experimental Uyumbicho”, con la finalidad de obtener el título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista, en la Universidad Central de Ecuador, en la cual tenía por objetivo la investigación de evaluar la motilidad total y progresiva del semen en el medio crioprotector a las 0, 6, 24, 48, 72 horas de refrigeración con tres diluyentes comerciales (Triladyl, OptixCell y Andromed) utilizando el programa de evaluación seminal “AndroVision”, determino la viabilidad espermática en cada medio crioprotector e identificar la morfología de los espermatozoides de cuy. Los resultados obtenidos indicaron que el mejor medio crioprotector fue Optixcell ya que tuvo un mejor promedio estadístico en las variables medidas, alcanzó una motilidad total máxima de 47.80% en la hora 0 y mínima de 25.52% a las 72 horas de refrigeración, la motilidad progresiva máxima fue de 44.82% y mínima de 24.29%. El resultado de viabilidad arrojó que los tratamientos no tuvieron un comportamiento distinto entre sí, sin embargo, al realizar las comparaciones individuales con la prueba de Tukey se muestra que Optixcell y Andromed son estadísticamente similares

mientras que Triladyl no es estadísticamente comparable. El porcentaje obtenido de espermatozoides normales fue de 76.5% y el de espermatozoides anormales fue de 23.5%, dividiéndose en 6.42% de anormalidades primarias y 17.08 anormalidades secundarias.

Quishpe, (2021) en su trabajo de tesis “Evaluación de dos curvas de congelación programables para la crioconservación de semen de cuy (*Cavia porcellus*) en el Centro Experimental Uyumbicho”, con la finalidad de optar el título profesional de Médico Veterinario Zootecnista en la Universidad de Central de Ecuador, en la que tenía por objetivo general: Evaluar dos curvas de congelación programables para la crioconservación de espermatozoides de cuy (*Cavia porcellus*), Se realizó el estudio de tipo experimental, empleando la muestra de 10 cuyes machos del Centro Experimental Uyumbicho seleccionados aleatoriamente al azar. A las muestras se aplicó 2 curvas de congelación, que fueron evaluadas mediante el Sistema CASA (Computer Assisted Motility Analysis), en la que obtuvieron datos de motilidad y mortalidad de los reproductores. Para el análisis estadístico de cada parámetro se utilizó el Sistema de Análisis de Datos de Excel Office, se realizó la prueba F (análisis de varianza) para determinar la dispersión de las medidas en relación a las medias de los tratamientos; a continuación, se procedió a realizar la prueba T de dos colas entre el Tratamiento 1 y Tratamiento 2 para determinar si existe diferencia significativa entre las medias de los mismos. Post descongelación se obtuvo una motilidad espermática total de 15,08% con el T1 y de 14,42% para el T2; y mortalidad de 84,92% para T1 y 85,58% en el T2. Lo que demuestra que con las dos curvas de congelación programables se obtuvieron altos en los porcentajes de mortalidad y regular motilidad espermática, por lo tanto, se deduce que hay que continuar evaluando otras curvas programables de criocongelación de semen de cuy para llegar a obtener mejores resultados en el futuro que favorezcan la fecundación a través de esta biotecnología.

Tapia y Tello, (2016) en su trabajo de tesis “Evaluación cualitativa de espermatozoides de la cola del epidídimo de cuyes (*cavia porcellus*) criollos y mejorados en dos edades reproductivas”, con el fin de

optar el título profesional de Médico Veterinario Zootecnista, en la Universidad de Cuenca – Ecuador, en donde tuvo por objetivo general: de evaluar las características cuali-cuantitativas de espermatozoides extraídos de la cola del epidídimo de cuyes criollos y mejorados en dos edades reproductivas esta investigación se realizó en la granja Irquis de la Universidad de Cuenca en 20 reproductores identificados por sus características fenotípicas y dispuestos en cuatro grupos: 5 criollos jóvenes (CJ), 5 criollos adultos (CA), 5 mejorados jóvenes (MJ), y 5 mejorados adultos (MA). Los cuyes fueron hemicastrados y de los epidídimos fueron disectados la cola sobre una caja petri. Se recuperó los espermatozoides por Swim up, diluidos en 1ml de medio (18% rafinosa y 3% leche descremada), procesados con Triladyl®, refrigerados a 5°C/1 hora, y equilibrados por 0, 2, 24, 48, 96, 192, y 360 horas para su análisis de viabilidad espermática. Se congelaron únicamente los espermatozoides de 2 horas de equilibrio en vapores de nitrógeno. Se usó un DCA de 2x2: fenotipo y edad, y se usó un ANOVA para comprobar significancia. Se obtuvo interacción ($P<0,05$) entre factores con eficiencia atribuida a MJ a las 0 horas: en Concentración (C) y Anormalidades de cola (AC), a las 24 horas: en motilidad individual (MIP) y 48 horas: en Vitalidad (VE). En MIP no se encontró diferencias ($P>0,05$) en ningún tiempo de medición. En VE sólo encontró diferencias ($P<0,05$) a las 96 horas (CJ: 18, 0; MJ: 10, 2; MA: 8, 6; CA: 6,0%). En anormalidades totales (AT) sólo se encontró diferencias ($P<0,05$) a las 0 horas (MJ: 26, 3; CJ: 32, 6; MA: 36, 2; CA: 38, 5%); y en AC se encontró diferencias ($P<0,05$) a las 0 hs (MJ: 4, 6; CJ: 9, 5; CA: 11, 5; MA: 16, 4%), y a las 48 horas (CA: 5, 7; CJ: 7, 3; MJ: 16, 0; MA: 18, 1%). En Integridad de la membrana (HOS-Test) se obtuvo ($P<0,05$) diferencias a las 2 horas (MJ: 20, 0; MA: 13, 1; CA: 10, 7; CJ: 9, 0%) y a las 96 horas (CA: 25, 4; CJ: 15, 3; MJ: 9, 7; MA: 8, 8%). A la congelación no se obtuvo sobrevivencia de espermatozoides en ninguno de los tratamientos. En conclusión, la cantidad y calidad de espermatozoides epididimarios de cuyes identificados fenotípicamente varía según su edad; sin embargo, no se pudo comprobar su variación en la criopreservación, mostrándose absolutamente inviable.

2.1.1 Nacional

Cabeza et al., (2020), en su trabajo de investigación “Caracterización morfológica y morfométrica del espermatozoide de cuy (*Cavia porcellus*)”, el objetivo del estudio fue determinar las características morfológicas y morfométricas del espermatozoide de cuy (*Cavia porcellus*), utilizando un sistema de análisis de imágenes. Se colectó semen de cinco cuyes del tipo 1, de cuatro meses de edad (1.19 ± 0.15 kg) por el método de electroeyaculación, entre 3 y 5 veces por cada animal, realizándose un total de 22 colectas adecuadas. Se determinó el volumen (0.38 ml), pH (7.05), concentración espermática ($47.33 \times 10^6/\text{ml}$), movilidad total (69.40%) y porcentaje de espermatozoides vivos (72.65%). Las muestras para el análisis de la morfología y morfometría espermática fueron teñidas con Spermac®, y analizadas utilizando el software Motic Image Plus®.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. El Cuy

El cuy (*Cavia porcellus*) es una especie herbívora nativa, originaria de los andes de Sudamérica. Su crianza está muy difundida en nuestro medio (INIA, 2007), en los últimos tiempos se ha convertido en un rubro de exportación debido a su alto valor nutricional (Taípe et al., 2021), en la actualidad la producción de cuy en el Perú está en manos de 800 mil familias en todo el territorio nacional (MINAGRI, 2020), el Perú es el mayor exportador de carne de cuy, viene participando con el 71,3% en el mercado exterior con un volumen de 9 958 kilogramos; y un valor FOB de 128 mil dólares americanos (US\$ 12,78 /kg); mostrando un crecimiento a una tasa anual de 3,9% y 6,5% para el volumen y valor FOB respectivamente. seguido de nuestro único competidor el país vecino de Ecuador con el 28,7% (MINAGRI, 2019).

Clasificación taxonómica

Reino:	Animal
Subreino:	Metazoos
Tipo:	Vertebrados
Clase:	Mamíferos
Subclase:	Placentarios
Orden:	Roedores
Suborden:	Hystricomorfos
Familia:	Cavidae
Género:	Cavia
Especie:	Cavia porcellus.

Fuente (Imba y Tallana, 2011).

2.2.2. Aspectos reproductivos

El cuy macho al nacimiento apenas pesa el promedio de 137 g (Navarro, 2016), y a los 3 a 4 meses de edad ya alcanza buen desarrollo corporal y la madurez sexual, esto hace que el cuy sea una especie de ciclo reproductivo bastante corto. El peso con el que llega a esta etapa es superior a 1.1 kg, lo que le permite dominar el grupo y mantener la relación de empadre (Chauca, 1997b).

2.2.3. Testículo

Los testículos de los cuyes se desarrollan en el interior del abdomen y según (Navarro, 2016) el cuy a los cuatro semanas de edad tiene el peso promedio de (2.41 ± 0.30) g por cada uno.

Dentro del testículo se encuentran las células intersticiales de Leydig, que descansan entre los túbulos seminíferos estas, secretan hormonas masculinas en las venas testiculares y los vasos linfáticos. Las células espermatoogénicas del túbulo se dividen y diferencian para formar

espermatozoides. Las células sustentaculares contribuyen a la producción de líquido por los túbulos, y es posible que produzcan el factor inhibidor de los conductos de Müller presente en el líquido de la red de Haller en los machos adultos. La producción de los espermatozoides aumenta con la edad del animal (Hafez, 2002).

2.2.4. Epidídimo

Se reconocen tres regiones anatómicas del epidídimo. Su cabeza, esta los conductos eferentes estas se unen al conducto epididimario, presenta una forma aplanada en uno de los polos testiculares; el estrecho cuerpo termina en el polo opuesto en la que amplía la cola. La región media de cada conducto eferente muestra actividad secretoria. El conducto contorneado del epidídimo es muy largo. La pared del conducto del epidídimo tiene una notable capa de fibras musculares circulares y un epitelio Seudoestratificado de células cilíndricas. Los espermatozoides almacenados en el epidídimo conservan su capacidad fecundante por varias semanas; la cola de esta estructura es el principal órgano de almacenamiento, contiene alrededor del 75% de las células espermáticas alojadas en el epidídimo (Hafez, 2002).

2.2.5. Espermatozoide

El espermatozoide (del griego *esperma*-semilla, y *zoon*-animal) es un célula haploide y cuya función es la formación de un cigoto totipotente, resultado de la fusión de su núcleo con el del gameto femenino (Avilés, 2011). Estos gametos masculinos, están dotados de fertilidad y motilidad; ambas funciones son de necesidad para lograr la penetración al oocito y alcanzar su fecundación (Tanaka et al., 1997).

2.2.6. Estructura del espermatozoide

a) Cabeza

La cabeza del espermatozoide, es la sección correspondiente donde se encuentra el núcleo de la célula, en la cual el ADN esta

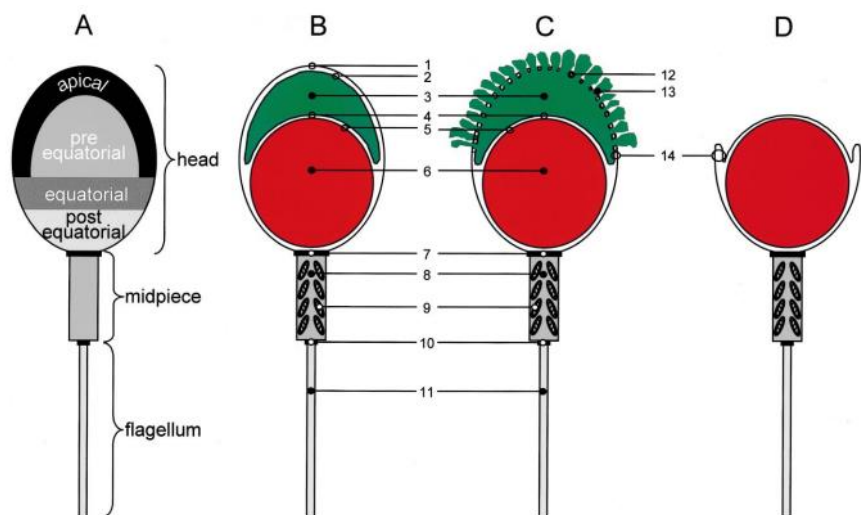
super enrollado, gracias a las proteínas denominadas protaminas que sustituyen a las histonas estos constituyentes nucleares son precisamente componentes esenciales para la fecundación (Arenas et al., 2010; Tanaka et al., 1997). La capacitación y reacción acrosomal del espermatozoide son eventos que se desarrollan en el aparato reproductor de la hembra (Arenas et al., 2010), Mas de la mitad de la cabeza está cubierto por el acrosoma, la reacción acrosómica es uno de los cambios más importantes que debe de ocurrir a nivel de la cabeza, antes de la penetración del oocito.

El acrosoma, cubre aproximadamente los dos primeros tercios de la cabeza del espermatozoides, contine enzimas hidrolíticas como la acrosina, hialuronidasa y muchas otras hidrolasas y esterases, estas son esenciales para la lisis de la zona pelúcida y las células que lo rodean al oocito (Avilés, 2011).

La membrana plasmática del espermatozoide es una estructura dinámica, la cual estas preparadas para reaccionar adecuadamente al tracto genital de la hembra (Flesch & Gadella, 2000).

Figura 1

Esquema de la estructura del espermatozoide.

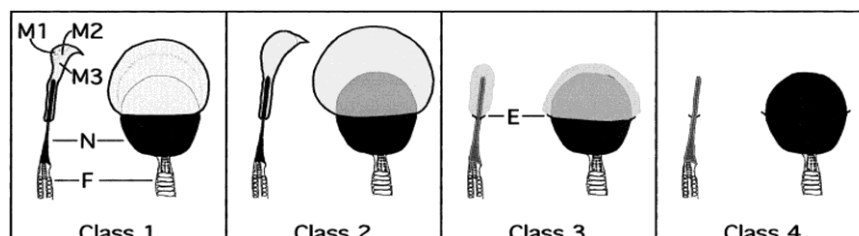


Fuente. Flesch & Gadella, (2000), (A) Esquema de la estructura del espermatozoide. (B) corte sagital de la célula espermática: 1: Membrana espermática, 2: Membrana acrosomal externa, 3: Contenido acrosomal, 4: Membrana acrosomal interna, 5: Núcleo celular, 6: Contenido de ADN altamente condensado, 7: Placa basal, 8: Pieza media, 9: Mitocondria, 10: Anillo anular, 11: Flagelo. (C) Contenido acrosomal, liberado durante la reacción del acrosoma, (enzimas hidrolíticas) 12: Vesícula (fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa), 13: Secreción acrosomal. (D) Exposición de la membrana acrosomal interna después de la reacción acrosómica, 14: estructura en horquilla

En cuyes (Kim et al., 2001), clasifico en función de su dinámica de la reacción acrosomal en 4 clases mediante tinciones como se muestra en la figura 1, los espermatozoides de clase 1 son básicamente células completamente intactas. Los componentes acrosomales se distribuyen entre los tres dominios, M1, M2 y M3. El segmento apical del acrosoma se extiende más allá de la punta anterior del núcleo (N). Solo se muestra la porción proximal del flagelo (F). Una vez iniciada la exocitosis acrosómica, el acrosoma comienza a hincharse ligeramente (clase 2). La expansión del acrosoma puede conducir a la redistribución de algunos componentes dentro del acrosoma y permite una mayor penetración de anticuerpos durante los procedimientos inmunocitoquímicos. Algunos espermatozoides de clase 2 también pueden mostrar fusión de plasma y membranas acrosómicas externas en este momento, que no se pueden discernir a nivel de microscopía de contraste de fase debido a la existencia de la matriz acrosómica. Sin embargo, los espermatozoides de clase 3 han perdido claramente la región de la membrana plasmática acrosomal externa en la mayoría de las regiones, excepto en el segmento ecuatorial. Los espermatozoides de clase 4 han perdido la mayoría, si no todo, el contenido acrosomal.

Figura 2

Modelo de liberación de proteínas acrosomales del espermatozoide del cuy.



Fuente. Proteínas acrosomales del espermatozoide del cuy (Kim et al., 2001).

Mientras que (Cabeza et al., 2020) determinaron las características morfológicas y morfométricas del espermatozoide de cuy (*Cavia porcellus*), utilizando un sistema de análisis de imágenes, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1

Variables morfométricas de la cabeza, pieza intermedia y cola del espermatozoide de cuy (media $\pm$ DS) en función de su clase morfológica.

Variable	Clase morfológica				Promedio
	1	2	3	4	
Longitud (μm)	7.40 $\pm$ 0.31b	7.44 $\pm$ 0.29	7.24 $\pm$ 0.26	7.62 $\pm$ 0.19	7.45 $\pm$ 0.29
Anchura (μm)	6.54 $\pm$ 0.26	6.57 $\pm$ 0.25	6.36 $\pm$ 0.23	6.57 $\pm$ 0.21	6.55 $\pm$ 0.25
Área (μm^2)	42.41 $\pm$ 3.08	42.85 $\pm$ 3.03	42.33 $\pm$ 3.39	44.64 $\pm$ 2.16	43.02 $\pm$ 3.03
Perímetro (μm)	26.55 $\pm$ 1.02	26.74 $\pm$ 0.99	25.50 $\pm$ 1.25	26.33 $\pm$ 1.06	26.56 $\pm$ 1.07
Elipticidad	1.13 $\pm$ 0.04	1.13 $\pm$ 0.04	1.14 $\pm$ 0.02	1.16 $\pm$ 0.02	1.14 $\pm$ 0.04
Rugosidad	0.76 $\pm$ 0.02	0.75 $\pm$ 0.02	0.82 $\pm$ 0.06	0.81 $\pm$ 0.04	0.77 $\pm$ 0.04
Elongación	0.06 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.02
Regularidad	0.90 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.03	0.86 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.04
Longitud PI (μm)	11.95 $\pm$ 0.70	12.11 $\pm$ 0.73	11.74 $\pm$ 0.65	11.91 $\pm$ 0.54	12.02 $\pm$ 0.70
Longitud cola (μm)	92.89 $\pm$ 3.77	93.42 $\pm$ 4.07	90.75 $\pm$ 3.61	92.30 $\pm$ 3.52	92.96 $\pm$ 3.96

Fuente. Variables morfométricas del espermatozoides del cuy (Cabeza et al., 2020).

b) Flagelo

Es la parte encargada del movimiento, se divide en cuatro regiones la pieza de conexión, que une a la cabeza con el flagelo, la pieza media, que es también llamada cuello y donde se encuentran las mitocondrias en un arreglo helicoidal, la pieza principal que abarca la mayor parte del flagelo utilizado en la propulsión, y la vaina fibrosa o parte terminal de la cola (Arenas et al., 2010).

2.2.7. Características organolépticas y microscópicas del semen

➤ pH

Recientemente, se demostró que la capacidad de reacción ante estimulantes de la reacción acrosómica in vitro es sensible a cambios en el pH extracelular. A pH bajos de 6.7 a 7.0, se observó una inhibición de la respuesta acrosomal y del aumento del pH intracelular que ocurre durante la capacitación. Esta carencia en el incremento de pH podría explicar la inhibición de la reacción acrosómica esperada (José et al., 2007).

➤ Color

El color del semen de cuy es desde blanco lechoso, blanco semi lechoso y blanco semi transparente (Aragon, 2019).

➤ Volumen

Según (Montenegro, 2022), el volumen del eyaculado del cuy esta entre 0.5-1 ml/monta. Mientras que por el método de electroeyaculación (Cabeza et al., 2020), obtuvieron el promedio, de 0.38 ml por cada colecta.

2.2.8. Concentración espermática

Según (Cabeza et al., 2020), la concentración espermática en cuyes, es de $47.33 \times 10^6/\text{ml}$, colectados por el método electroeyaculación. Mientras que para (Aragon, 2019), fue de 21.33

$\times 10^6/\text{ml} \pm 11.29$, también colectados por el mismo método. Tapia y Tello (2016), al estudiar los fenotipos de cuyes adultos criollos y mejorados, después de colectar el semen de la cola del epidídimo obtuvieron la concentración espermática $63,7 \pm 16, \times 10^6 \text{ esp/ml}$ y $38,7 \pm 7,5 \times 10^6 \text{ esp/ml}$ respectivamente.

2.2.9. Crioprotector

Los crioprotectores son compuestos que ayudan a la conservación de un tejido o células por un tiempo prolongado donde se mantienen a temperaturas bajas. Estos ayudan a diferir la velocidad con la que penetran los tejidos, el grado de protección a los cristales de hielo y la toxicidad química que pueden tener sobre las células o tejidos, dan protección a la célula y evitan la cristalización y daño celular. Algunas de sus principales funciones es promover una rápida deshidratación celular y amortiguar las altas concentraciones de solutos en el interior de cada célula u organismo que será criopreservado (Herrán & Guevara, 2021).

La criopreservación hoy en día es una herramienta importante para el almacenamiento, de gametos y embriones por un rango de tiempo indefinido, desde las necesidades de preservación de la fertilidad de los pacientes con cáncer, hasta la reproducción de especies de interés agropecuario o la preservación de genomas en las especies animales y vegetales amenazada (Bisioli, 2006; Long, 2006). Preservar el material biológico es fundamental en laboratorios y bancos de células, con la finalidad de mantener la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas, la estructura y composición de las membranas plasmáticas de las células, determina los principales eventos celulares durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada (Ávila et al., 2006).

2.2.10. Crioprotectores permeables

Son sustancias de bajo peso molecular y permeables a través de la membrana celular, ingresan con facilidad al interior de la célula y actúan deshidratando la célula por la sustitución del agua intracelular impidiendo la formación de cristales de hielo y evitando el estrés osmótico. Los más utilizados son el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO), propanediol (PROH), etilenglicol, polietilenglicol, etanol y otros alcoholes (Ávila et al., 2006; Herrán & Guevara, 2021).

2.2.11. Crioprotectores no permeables

Los crioprotectores no permeables o extracelulares tienen un alto peso molecular y hacen parte de este grupo la polivinilpirrolidona, fructosa, glucosa, sacarosa, galactosa, trehalosa, entre otros. Estos compuestos ayudan a extraer el agua intracelular mediante la diferencia de la presión osmótica sin penetrar la célula, y son efectivos para la preservación de la función y estructura de las membranas al a ver una baja actividad de agua. Estas sustancias son generalmente polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad de agua a una magnitud mucho mayor que la que se predeciría por su concentración molar. La adición del crioprotector se genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio. Las células inicialmente se deshidratan para compensar la fuerza osmótica inducida por la presencia de los agentes crioprotectores y después se hidrata (Ávila et al., 2006; Herrán & Guevara, 2021).

2.3. Definición de términos

- **Testículo** estructuras pares ovaladas presente en animales machos, cuya función es producir células espermáticas y hormonas masculinas.
- **Espermatozoide** gameto o célula sexual masculina producida a nivel de los testículos y en conjunto al plasma seminal forma parte del eyaculado.
- **Criopreservar** es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80 °C y -196 °C (el punto de

ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo.

- **Dilutor** es una solución, es la sustancia que se halla en mayor proporción, ya sea en estado líquido o gaseoso y raramente sólido, y como su nombre lo indica, disuelve a otras sustancias.
- **Crioprotector** son sustancias hidrosolubles de baja toxicidad cuya función consiste en proteger la membrana plasmática de los espermatozoides para reducir el efecto de la excesiva concentración extracelular de solutos y disminuir la formación de cristales intra y extracelulares durante la congelación, los cuales pueden producir daños en la estructura espermática.

2.4. Hipótesis

2.4.1. Hipótesis nula

Los tres crioprotectores no tienen diferentes efectos sobre la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cuy (*cavia porcellus*).

2.4.2. Hipótesis alterna

Los tres crioprotectores tienen diferentes efectos sobre la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cuy (*cavia porcellus*).

2.5. Variables

- Variable Independiente.
Crioprotectores (glicerol, dimetilsulfóxido y etilenglicol).
- Variable Dependiente.
Motilidad, vitalidad, integridad de la membrana.

2.6. Operacionalización de variables

Tabla 2

Operacionalización de Variables.

Variables	Dimensiones	Indicadores
Independiente		
Crioprotectores.	Glicerol. Dimetilsulfóxido. Etilenglicol.	Crioprotector al 7% Crioprotector al 7% Crioprotector al 7%
Dependiente		
Criopreservación de espermatozoides.	Motilidad. Viabilidad espermática. Integridad de la membrana	Motilidad %. Viabilidad espermática %. Integridad del acrosoma %.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ámbito temporal y espacial

El estudio se realizó en el laboratorio de Biotecnologías Reproductiva de la Universidad Nacional de Huancavelica, ubicada en la ciudad universitaria de Paturpampa en la región de Huancavelica a una altitud de 3670 m.s.n.m.

3.2. Tipo de investigación

De acuerdo al trabajo de investigación, naturaleza de los problemas y objetivos formulados, por su carácter de estudio sobre manipulación de las variables independientes (supuestas causas-antecedentes), el presente estudio es de carácter de investigación experimental (Hernández et al., 2015).

3.3. Nivel de investigación

Por tener carácter de utilización en prácticas del conocimiento en el campo de producción de cuyes, el nivel de investigación es aplicativo (Hernández et al., 2015).

3.4. Método de investigación

Esta investigación pertenece al método científico, porque se plantea (Hernández et al., 2015).

3.5. Diseño de investigación

Para la presente investigación se planteó 3 tratamientos:

T1 = Glicerol (GL) al 7%.

T2= Etilenglicol (EG) al 7%.

T3= Dimetilsulfóxido (DMSO) al 7%.

Se utilizó el modelo aditivo lineal, diseño completamente al azar DCA para cada uno de los tratamientos, puesto que cada variable en estudio es independiente.

El modelo aditivo lineal utilizado, es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Es el efecto del crioprotector.

μ = Efecto de la media general de la variable en estudio

α_i =Efecto del i-ésimo tratamiento

E_{ij} =Error experimental de cada uno de los tratamientos.

3.6. Población, muestra y muestreo

3.6.1. La población

Se trabajo con 42 colas del epidídimo, procedentes de 21 cabezas de cuy sacrificados entre 10 a 12 semanas de edad, con peso no menor a 900 gramos.

3.6.2. Muestra y muestreo

No probabilístico por conveniencia de acuerdo al carácter de estudio que tiene el presente trabajo.

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1. Materiales y reactivos

a) Materiales biológicos

Para este estudio se utilizó 42 testículos provenientes de 21 cuyes sacrificados, de los cuales se extirpo los testículos, con pesos mayor a 3 g.

b) Medios usados

Tabla 3

Solución tris – base.

Componentes	Cantidad (50 ml)
Tris	1.8025 gr.
Ácido cítrico	1.012 gr.
Fructosa	0.744 gr.
Penicilina	2500 UI
Gentamicina	50 µl
Agua bidestilada	Completar hasta 50 ml
Rojo fenol	50µl

Tabla 4

Crioprotectores al 7%.

Componentes	Cantidad
Glicerol (GL) 0.9 M	7%
Etilenglicol (ET) 1.2 M	7%
Dimetilsulfóxido (DMSO) 0.9 M	7%

Tabla 5

Fracción A del dilutor sin crioprotector.

Componentes	Cantidad
Tris buffer	16 ml.
Yema de huevo al (20 %)	4 ml.

Para el preparado del dilutor Tris-yema se limpia el huevo con papel toalla impregnado de alcohol al 70%. La yema de huevo debe extraerse sin que tenga contacto alguno con la clara. Para lograrlo, se rompe la cáscara con mucho cuidado en su parte media evitando que se formen bordes agudos que pudieran romper la yema, luego se descarta toda la clara. Después, la yema (aún cubierta por su membrana protectora) se hace rodar suavemente

sobre un papel toalla para limpiar los restos de clara que estén adheridos. Una vez limpia la yema de huevo, se la pasa a otro papel toalla limpio, se rompe la membrana que la cubre y se vierte la yema a un tubo Falcón de 50 ml.

Tabla 6

Fracción B dilutor más crioprotector.

Componentes	Cantidad
Tris (fracción A)	9.3 ml.
Crioprotector al 7%	0.7 ml.

Esta fracción se prepara para cada crioprotector, antes de realizar la colección de semen y se conservó a 4°C.

3.7.2. Toma de muestra

Los testículos procedentes de animales beneficiados fueron pesado y lavado con solución salina al 0.9%. De la cola del epidídimo se separó los vasos capilares adyacentes y la túnica cerosa que lo cubre, sobre una placa Petri de material poliestireno de 90 mm de diámetro, después de este proceso se trabajó en placa Petri de 35 mm de diámetro, en la que contenía la fracción (A tris – yema del dilutor), sobre una platina térmica a 37°C.

3.7.3. Colección y evaluación del semen fresco

Se realizó la obtención de espermatozoides, mediante la técnica del desmenuzado de la cola del epidídimo; después de la colecta u ordeño se evaluó en el microscopio binocular la motilidad, vitalidad espermática, integridad de la membrana plasmática (Host) y la concentración espermática de acuerdo (WHO, 2021; Cabrera et al., 2011).

3.7.4. Motilidad espermática

La motilidad espermática se evaluó en semen fresco y en semen descongelado, colocando 10ul de la muestra espermática en una lámina porta objeto, temperada a 37°C y cubriéndola con una lámina cubre

objeto. La muestra se observó al microscopio a 400X. Para determinar la motilidad espermática, se dio un valor de 0 a 100% el cual indica los espermatozoides que presentan motilidad del total observado, se contó un total de 400 espermatozoides por cada muestra (WHO, 2021)

3.7.5. Concentración espermática

Se utilizó la cámara de Neubauer improved bright-line, para la dilución se colocó en un tubo eppendorf de medida 1.5 ml, la cantidad de 950ul de agua destilada y 50ul de muestra espermática esto nos dio una dilución 1:20. Luego, se pasa a homogenizar en el Vortex por 1 segundo, para luego cargar 10ul de muestra diluida en la cámara de Neubauer, por capilaridad a las dos áreas de conteo, se deja reposar 5 minutos y se observa al microscopio a 400X, para conteo (WHO, 2021).

En cada área de la cámara de Neubauer se llegó a contar más de 200 espermatozoides, el conteo se realizó en la cuadrícula central, que consta de 25 cuadrados grandes, estos cuadrados grandes se contó en forma horizontal hasta llegar los 200 espermatozoides, como describe el manual de laboratorio de la Organización Mundial de Salud (WHO, 2021).

Para el cálculo final de la concentración espermática, se utilizó la fórmula siguiente: $\text{concentración espermática} = (\text{N}^\circ \text{ spz})/(\text{N}^\circ \text{ de filas}) \times ((1 \text{ fila})/(20 \text{ nl})) \times \text{factor de dilución} = C \times 10^6 \text{ spz/ml}$.

3.7.6. Vitalidad espermática

El proceso se inició en semen fresco y post descongelado, colocando 5ul de semen, 5ul de Eosina al 2% (Minitube) y 10ul de Nigrosina en un portaobjeto limpio. La mezcla de ambos se dispersa realizando un frotis con una segunda lámina porta objeto a 37°C. Se deja secar el frotis, y se observa al microscopio a 400X.

Los espermatozoides vivos presentan la cabeza clara, mientras que los espermatozoides muertos dejan ingresar colorantes como la Eosina y aparecen coloreados de rojo. Para determinar el porcentaje de

espermatozoides vivos, se cuentan más de 400 espermatozoides, por cada muestra analizada, para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

Figura 3

Método de frotis para la evaluación de vitalidad espermática.

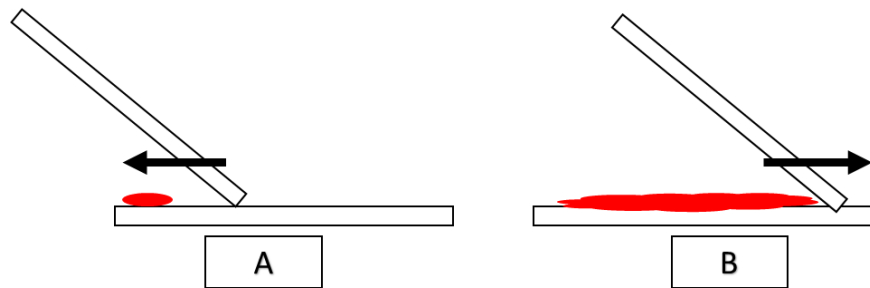
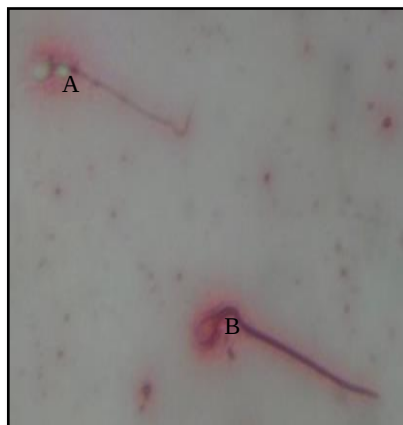


Figura 4

Espermatozoide fijado en eosina al 2%. (A) espermatozoides vivos, (B) espermatozoides muertos.



3.7.7. Integridad de membrana plasmática del espermatozoide (HOST)

Para determinar la integridad de la membrana en semen fresco y post descongelado, se cultivó en la cámara de incubación a 37°C, 5ul de muestra y 45ul de solución Host por el período de 30 minutos, transcurrido este tiempo se observó en el microscopio binocular a 400X, la muestra cultivada; se contó 400 espermatozoides.

Los espermatozoides con la membrana plasmática intacta se observan con colas enrolladas (reacción positiva), mientras que los espermatozoides con colas estiradas indican que tienen algún daño a nivel de membrana (reacción negativa). Para determinar los espermatozoides con integridad de membrana, se cuentan 400 espermatozoides y se calcula el porcentaje de espermatozoides con reacción positiva y negativa.

3.7.8. Congelación del semen

Para realizar la criopreservación de los gametos, se cultivó en cámara de incubación a 37°C por 15 minutos en la fracción (A) del dilutor, transcurrido el tiempo se procede a juntar con la fracción (B), en la que contine los crioprotectores GL, ET y DMSO al 7%, y se cultiva en la refrigeradora a 4°C por 15 minutos.

Se utilizó las pajillas de 0.25 ml para cada tratamiento, sellados con alcohol polivinílico y sumergidos a 4°C de agua. Las pajillas cargadas de semen se congeló directo en el tanque criogénico, con una curva de descendencia de 7°C por minuto hasta llegar los -120°C, y finalmente se sumergió a -196°C, las cuales fueron descongelados después de 7 días.

3.7.9. Descongelación del semen

Las pajillas se descongelaron en baño maría a 37°C. Por 18 segundos, para su evaluación microscópica.

3.7.10. Evaluación del semen descongelado

A las muestras descongeladas se evaluará por los parámetros como motilidad progresiva, vitalidad, e integridad de la membrana.

3.8. Técnicas y procesamiento de análisis de datos

3.8.1. Técnica y Procesamiento

Para datos numéricos se aplicó el test Shapiro Wilk, para observar la distribución normal y la homogeneidad de varianzas con el test Levene. Para los datos porcentuales se transformaron mediante arco seno con la fórmula $Y = \text{Arcsen } \sqrt{(\% \text{ Germinación}/100)}$, donde “x” representa el valor porcentual (Cabrera et al., 2011).

Para determinar la existencia de diferencias estadísticas se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA), así como la prueba post test de Tukey para determinar diferencias estadísticas entre grupos (Terreros et al., 2015).

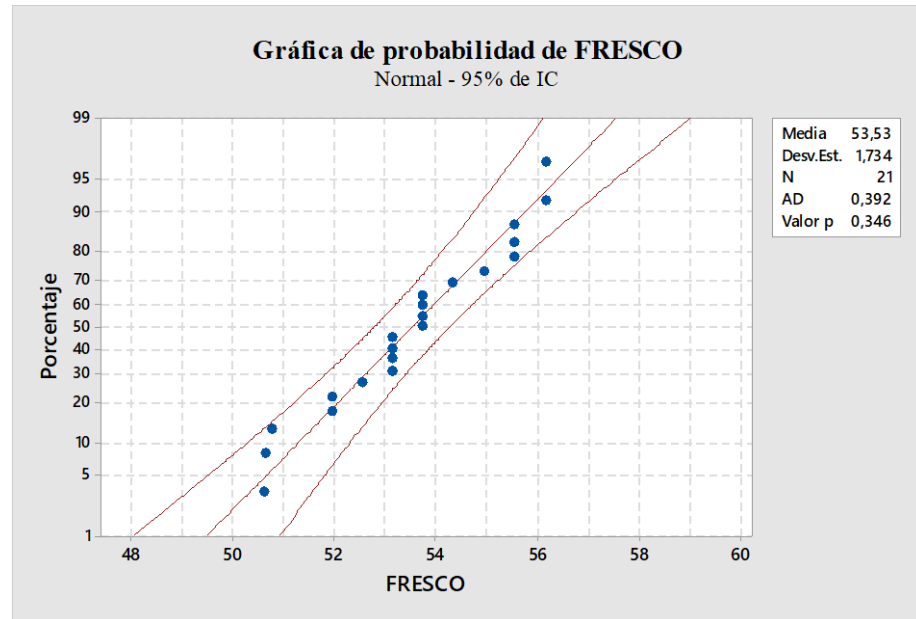
El test de Shapiro Wilk, se aplicó a cada grupo, para observar si el conjunto de datos procede de una población normal, como se muestra en las siguientes figuras.

Para el test de normalidad se tiene en consideración, la hipótesis nula (H_0) se acepta, si el P valor es mayor que alfa (nivel de significancia), se concluye que los datos vienen de una distribución normal.

En caso contrario si el P valor es menor se acepta la hipótesis alterna (H_a), se concluye que los datos no vienen de una distribución normal.

Figura 5

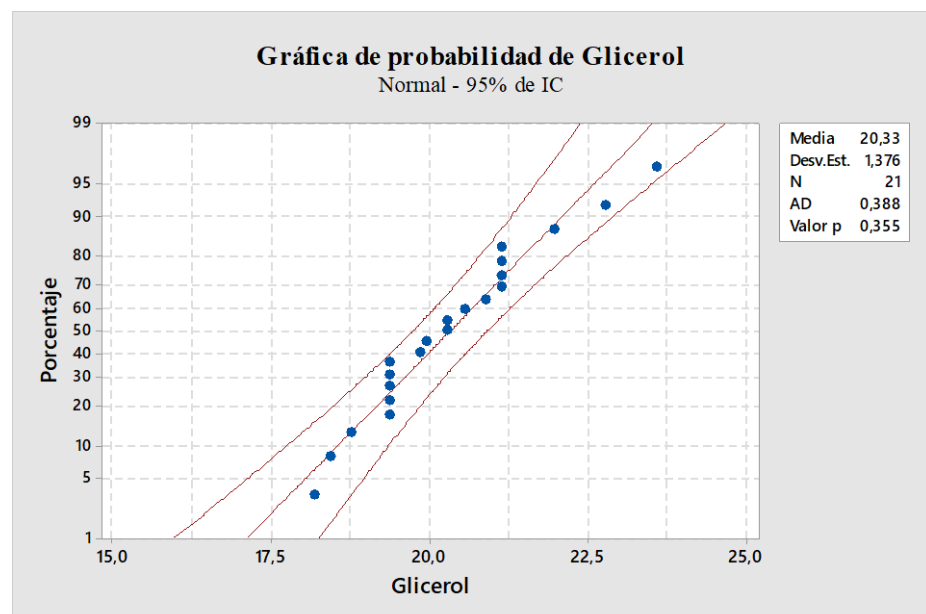
Test de normalidad para evaluación espermática en fresco.



La muestra procede de una población normal el P valor (0.392) es mayor a alfa (0,05), no se rechaza la hipótesis nula (H_0), por lo tanto, la variable “fresco” presenta un comportamiento normal o paramétrico.

Figura 6

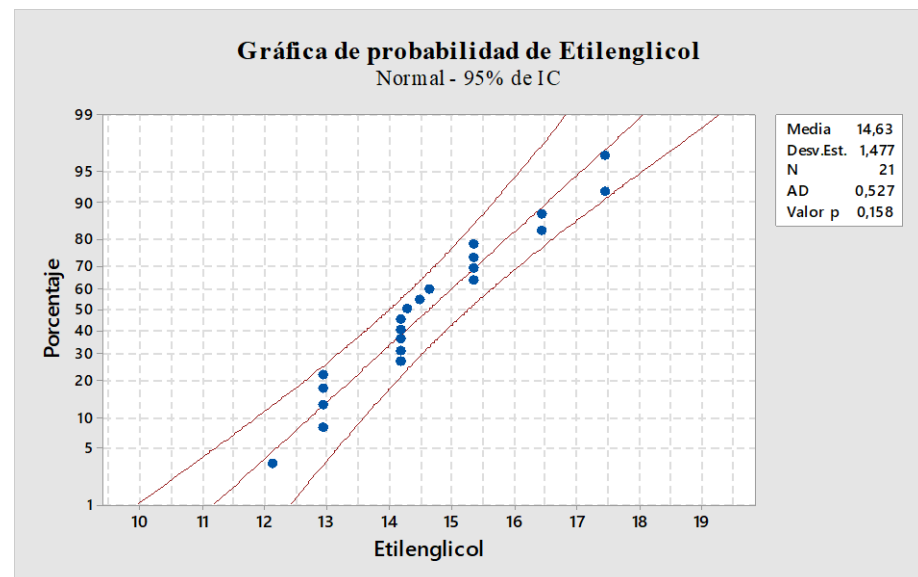
Test de normalidad para glicerol.



La muestra procede de una población normal el P valor (0.355) es mayor a alfa (0,05), no se rechaza la hipótesis nula (H_0), por lo tanto, la variable “glicerol” presenta un comportamiento normal o paramétrico.

Figura 7

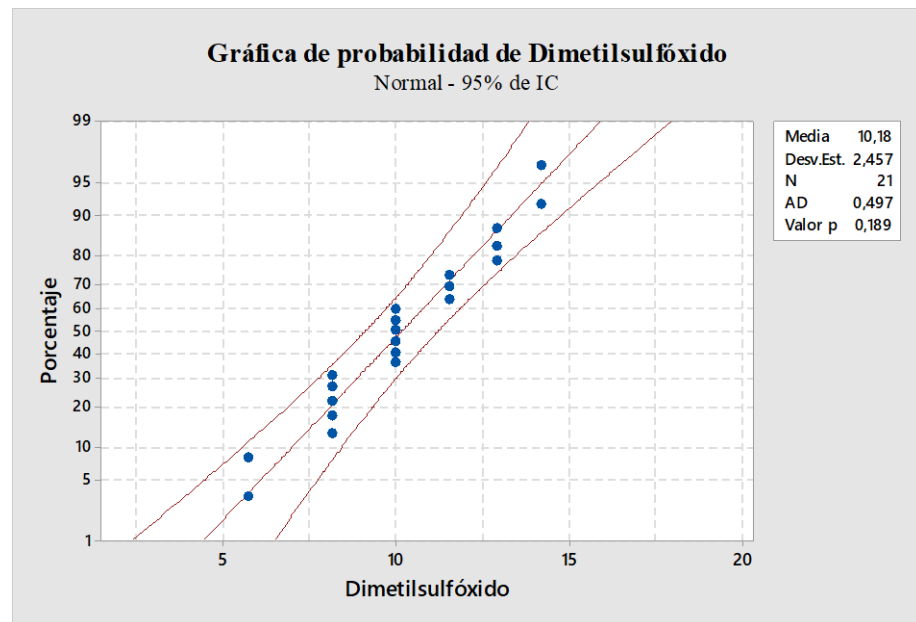
Test de normalidad para etilenglicol.



La muestra procede de una población normal el P valor (0.158) es mayor a alfa (0,05), no se rechaza la hipótesis nula (H_0), por lo tanto, la variable “etilenglicol” presenta un comportamiento normal o paramétrico.

Figura 8

Test de normalidad para dimetilsulfóxido.



La muestra procede de una población normal el P valor (0.189) es mayor a alfa (0,05), no se rechaza la hipótesis nula (H_0), por lo tanto, la variable “dimetilsulfoxido” presenta un comportamiento normal o paramétrico.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis de información

El análisis estadístico fue realizado mediante el uso del programa R y R Studio versión 4.2.1. en la cual se procesó los datos transformados por el arcoseno, además se determinó el contraste de medias.

4.2. Resultados

Tabla 7

Características seminales de espermatozoides de la cola del epidídimo de 42 testículos (promedios $\pm$ desviación estándar).

Variables	Promedio	D.S.	Max	Min
Peso del testículo g	3.84	0.51	4.85	3.16
Concentración (10 ⁶ /ml)	65.01	16.01	113.75	35.92
Motilidad fresca (%)	60.9	2.5	65	55
Vitalidad fresca (%)	64.5	3.2	69	59.73
Host fresco (%)	59.4	4.5	73	56

Los espermatozoides congelados con glicerol, presentaron mejor motilidad post descongelado, frente a etilenglicol y dimetilsulfóxido, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 8

Análisis de varianza para motilidad de espermatozoides epididimarios congelados de cuy.

Fuente	GL	Sum	Sq Mean	Sq F value	Pr(>F)
TRT	3	27844	9281	2063	<2e-16 ***
Residuals	80	360	4		
Total	83	28204			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En la tabla 8 se muestra que es altamente significativo 0 '***' a 5% de probabilidad, por la prueba de F. Entonces se rechaza la hipótesis de nulidad, el mismo que indica la existencia de del efecto significativo del factor crioprotector, en la motilidad espermática post descongelado.

Tabla 9

Efecto de los crioprotectores glicerol (GL), etilenglicol (EG) y dimetilsulfóxido (DMSO), sobre la motilidad post descongelado en espermatozoides epididimarios de cuy.

Motilidad pre congelada	Motilidad post descongelada		
F% (n=21)	GL% (n=21)	ET% (n=21)	DMSO% (n=21)
51.3 ± 1.5	18.8 ± 1.0 ^a	11.7 ± 1.7 ^b	3.3 ± 3.5 ^c

^{a,b y c} Superíndices diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05)

Para la comparación múltiple entre medias, se utilizó la prueba de Tukey, las medias que no comparten la letra son altamente significativos al 5%.

Figura 9

Efecto de los crioprotectores (GL, ET y DMSO) sobre la motilidad espermática.

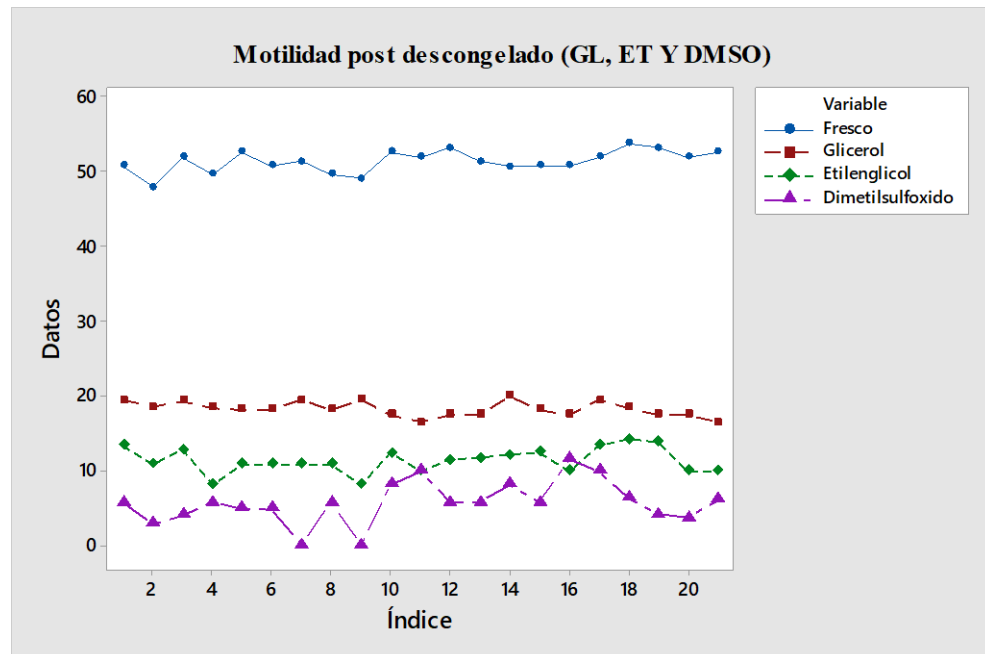


Tabla 10

Análisis de varianza para vitalidad de espermatozoides epididimarios congelados de cuy.

Fuente	GL	Sum	Sq Mean	Sq F value	Pr(>F)
TRT	3	27368	9123	1426	<2e-16 ***
Residuals	80	512	6		
Total	83	27880			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Se muestra en esta tabla que es altamente significativo al 5% a la prueba de F, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula en cuanto al efecto de los crioprotectores en la vitalidad espermática post descongelado.

Tabla 11

Efecto de los crioprotectores glicerol (GL), etilenglicol (EG) y dimetilsulfóxido (DMSO), sobre la vitalidad post descongelado en espermatozoides de cuy.

Vitalidad pre congelado	Vitalidad post descongelado		
F % (n=21)	GL% (n=21)	ET% (n=21)	DMSO% (n=21)
53.5± 1.9	20.3± 1.4 ^a	14.7 ± 1.5 ^b	5.7 ± 4.2 ^c

^{a,b y c} Superíndices diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

En la comparación de medias por la prueba de Tukey, no comparten una letra son significativamente diferentes, de los crioprotectores en la vitalidad espermática post descongelado.

Figura 10

Efecto de los crioprotectores (GL, ET y DMSO) sobre la vitalidad espermática.

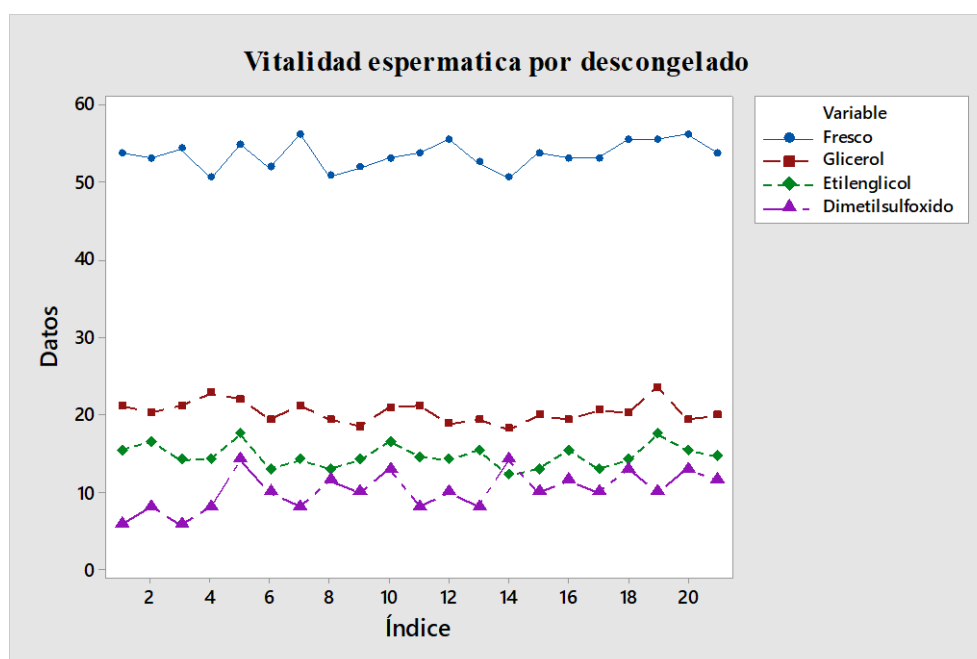


Tabla 12

Análisis de varianza para integridad de la membrana de espermatozoides epididimarios congelados de cuy.

Fuente	GL	Sum	Sq Mean	Sq F value	Pr(>F)
TRT	3	28907	9636	1062	<2e-16 ***
Residuals	80	726	7		
Total	83	29633			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Se muestra en esta tabla 11 que diferencias significativas, frente a la prueba de F, al 5%.

Tabla 13

Efecto de los crioprotectores glicerol (GL), etilenglicol (EG) y dimetilsulfóxido (DMSO), sobre la Host post descongelado en espermatozoides de cuy.

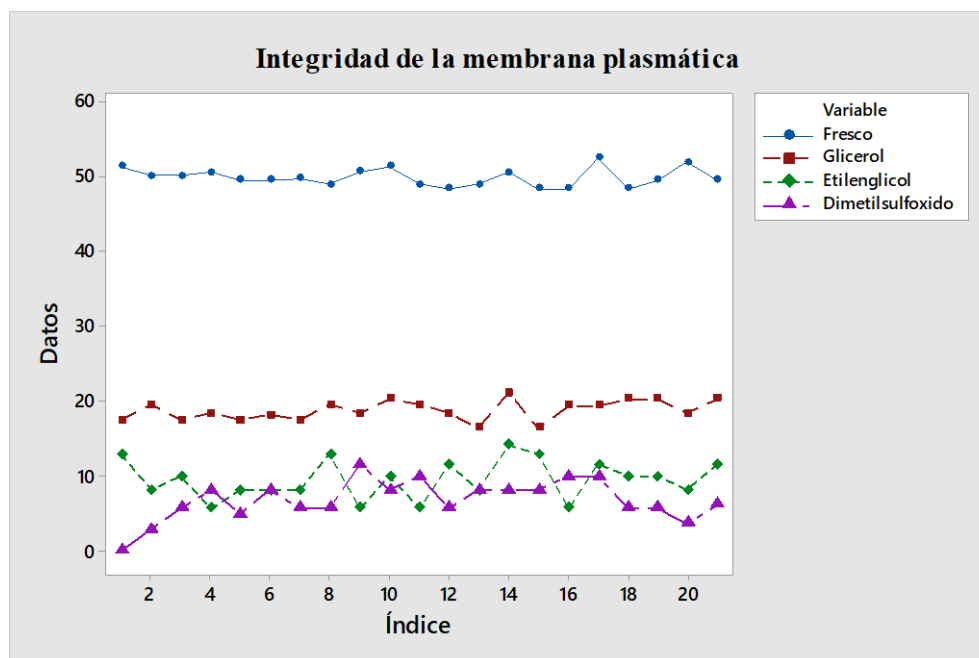
Host pre congelado	Host post descongelado		
F% (n=21)	GL% (n=21)	ET% (n=21)	DMSO% (n=21)
50.5 ± 2.7	17.6 ± 1.3 ^a	8.2 ± 4.5 ^b	2.6 ± 2.7 ^b

^{a,b y c} Superíndices diferentes indican diferencias significativas (p < 0.05)

En la comparación de medias por la prueba de Tukey, para la integridad de la membrana del espermatozoide, el crioprotector con mejor resultado fue para el glicerol, frente al etilenglicol y dimetilsulfóxido.

Figura 11

Efecto de los crioprotectores (GL, ET y DMSO) sobre la membrana plasmática de los espermatozoides.



4.3. Discusión de resultados

Concentración, motilidad y vitalidad espermática

Cabeza et al., (2020), reporta en su trabajo de investigación, después de realizar la colección de semen por el método de electroeyaculación la concentración espermática de (47.33×10^6 /ml), menor a la concentración a lo que reportamos (65.01×10^6 /ml), esta diferencia quizás sea por la técnica de obtener los espermatozoides. En cuanto a la motilidad y a espermatozoides vivos reportaron (69.40%) y (72.65%) respectivamente, muy similar a los datos reportados en este trabajo de investigación como se muestra la motilidad media de (60.9%), y espermatozoides vivos con (64.5%).

En la investigación realizada por (Quishpe, 2021) reporta la concentración espermática promedio de (149×10^6 /ml), esta concentración espermática es mayor a lo que hallamos en este trabajo de investigación (65.01

x $10^6/\text{ml}$), a pesar de que ambos trabajos de investigación realizaron con espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo; en cambio para la motilidad espermática realizaron dos tratamientos T1 motilidad (43,48%), T2 motilidad (46,3%), estos valores son menor frente a este trabajo de investigación ($60.9 \pm 2.5\%$), mientras que, (Montenegro, 2022) reporto la concentración espermática de (76.5%)

Congelación

Quishpe, (2021), reporto dos tratamientos en congelación de espermios epididimarios con el dilutor comercial OPTIXCELL, obteniendo T1 la motilidad media de (15.8%) y en el T2 (14.42 %), las cuales fueron ligeramente superior a los resultados de nuestro trabajo de investigación con el tratamiento (glicerol).

CONCLUSIONES

- En el trabajo de investigación, se determinó la concentración espermática de espermatozoides epididimarios, de cuy (*Cavia purcellus*), obteniendo el resultado promedio ($65.01 \times 10^6/\text{ml}$).
- Se realizó, la criopreservación de espermatozoides de cuy, provenientes de la cola del epidídimo, con el tratamiento de tres crioprotectores, como son: Glicerol, etilenglicol y dimetilsulfóxido, evaluando las variables independientes como motilidad, vitalidad (vivos y muertos) y la integridad de la membrana plasmática (Host test) post congelado.
- En los tratamientos ejecutados en la criopreservación de espermatozoides epididimarios, fue mejor con diferencia significativa para el crioprotector glicerol, tanto en la motilidad espermática como en vitalidad e integridad de la membrana plasmática del espermatozoide. En segundo lugar, es para el crioprotector etilenglicol con baja tasa de sobrevivencia de los espermatozoides post descongelado, y por último el crioprotector dimetilsulfóxido, tiene muy poca tasa de sobrevivencia de los espermatozoides.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar más trabajos de investigación, en criobiología de gametos masculinos del cuy (*Cavia purcellus*).
- Se debe de trabajar con los crioprotectores penetrantes y no penetrantes a la membrana celular, en diferentes porcentajes.
- Se recomienda continuar, con los trabajos de investigación en criopreservación de semen de cuy, porque es una buena alternativa para diseminar el material genético en corto tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aragon, S. (2019). Características macroscópicas, microscópicas, estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de Cuy (*Cavia Porcellus*). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
https://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/4280/253T20190366_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Arenas, E., Cambrón, A., Ambríz, D., Zuñiga, P., Rodríguez, A., & Rosadio, A. (2010). Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide.
- Ávila, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J., & Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, 57(4), 291–300.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Avilés, K. (2011). Estudio de la funcionalidad espermática , interacción de gametos y análisis proteico en espermatozoides epididimarios y eyaculados en especie porcina. Universidad de Murcia.
- Bisioli, C. (2006). Criobiología de gametos. Revista Endicronologia de Ginecologica y Reproductiva, XIII, 23–33.
http://www.saegre.org.ar/revista/numeros/2006/n2/3_criobiologia_2_2006.pdf
- Cabeza, U., Ordóñez, C., Meza, A., & Cucho, H. (2020). Caracterización morfológica y morfométrica del espermatozoide de cuy (*Cavia porcellus*). Spermova, 2(10), 94–101. <https://doi.org/10.18548/aspe/0008.14>
- Cabrera V., P., Ayulo L., A., & Pantoja A., C. (2011). Efecto del dilutor tris y citrato Con yema de huevo de cordorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 22(2), 105–113. <https://doi.org/10.15381/rivep.v22i2.276>
- Chauca, L. (1997a). Producción de cuyes (*Cavia porcellus*).
https://www.fao.org/3/w6562s/w6562s02.htm#P370_30920
- Flesch, F., & Gadella, B. (2000). Dynamics of the mamalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. 1469.
- Freund, M. (1969). Interrelationships Among The Characteristics Of Guinea-Pig

- Semen Collected By Electro-Ejaculation. *Reproduction*, 19(3), 393–403.
<https://doi.org/10.1530/JRF.0.0190393>
- Gosden, R. (2011). Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. *fertility and sterility*, 96(2), 264–268.
<https://doi.org/10.1016/J.Fertnstert.2011.06.029>
- Grégoire, A., Joly, T., Huamán, E., Silva, R. M., & León, S. (2010). Crioconservación de los recursos genéticos del cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones. *Bulletin de l'Institut Français d'études Andines*, 39(39 (1)), 185–188.
<https://doi.org/10.4000/bifea.2164>
- Hafez, E. S. (2002). Reproduccion e inseminacion artificial de animales (E. M.-H. I. E. S. de C. México. (ed.); 7ma. Ed.).
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, M. (2015). Metodología de la investigación. in *syria studies* (6 ta, Vol. 7, Issue 1). www.jstor.org/stable/41857625
- Herrán, G., & Guevara, P. (2021). Criopreservación de gametos y embriones en animales domésticos. 1–22.
http://74.208.53.179/bitstream/20.500.12494/33618/1/2021_criopreservacion_gametos_embryones.pdf
- Imba, G., & Tallana, M. (2011). Aceptabilidad del bagazo de caña, rastrojo de maíz y tamo de cebada en bloques nutricionales como reemplazo del maíz en cobayos de engorde (*Cavia porcellus*) en la granja la pradera-chaltura. <http://docplayer.es/124756752-Universidad-tecnica-del-norte-facultad-de-ingenieria-en-ciencias-agropecuarias-y-ambientales-carrera-ingenieria-agropecuaria.html>
- INIA. (2007). Reconocimiento reconocimiento dirección de extensión agraria programa nacional de medios y comunicación técnica. Instituto Nacional de Innovación Agraria.
- José, M., Godoy, A., Toro, A., Orellana, R., & Cortés, M. (2007). La reacción acrosómica del espermatozoide : Avances recientes. 5(4), 368–373.
- Kim, K., Foster, J., & Gerton, G. (2001). Differential release of guinea pig sperm acrosomal components. 156, 148–156.
- Long, J. A. (2006). Avian semen cryopreservation. *Poultry Science*, 85, 232–236.
- MINAGRI. (2019). Potencial del mercado internacional para la carne de cuy. Agencia Peruana de Noticias Andina.
- MINAGRI. (2020). Más de 800 mil familias empoderan la crianza de cuy como actividad comercial – Instituto Nacional de Innovación Agraria.
<https://www.inia.gob.pe/2020-nota-105/>
- Montenegro, A. (2022). Evaluación de tres crioprotectores para la crioconservación de semen de cuy (*Cavia porcellus*) extraído de la cola del epidídimo en el Centro Experimental Uyumbicho. Universidad Central del Ecuador.
<http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/26977/1/UCE-FMVZ-Sub->

Montenegro Andrea.pdf

- Navarro, J. (2016). Caracterización zoométrica de Cuyes de la línea mantaro en la E.E.A. Santa Ana – I.N.I.A. Huancayo. Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Quishpe, J. (2021). Evaluación de dos curvas de congelación programables para la criopreservación de semen de cuy (*Cavia porcellus*) en el Centro Experimental Uyumbicho. In Universidad Central del Ecuador (Vol. 3, Issue March). [http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25416/1/UCE-FMVZ-Sub-Quishpe Jonathan.pdf](http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/25416/1/UCE-FMVZ-Sub-Quishpe%20Jonathan.pdf)
- Ruiz, J. (2018). Producción y transferencia de embriones in vitro en camélidos sudamericanos: nuevas oportunidades y desafíos in vitro production and transfer of embryos in south american camelids: New opportunities and challenges. *Spermova*, 8(1), 60. <https://doi.org/10.18548/aspe/0006.06>
- Santos, V. (2016). Importancia del cuy y su competitividad en el mercado. XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú, 1–2. <http://www.bioline.org.br/pdf?la07056>
- Taibe, C., Corilla, D., Ventura, A., & Espinoza, G. (2021). La Crianza de cuy y procesamiento con fines de exportación en la provincia de acobamba. *Dominio de Las Ciencias*, 7, 1659–1679.
- Tanaka, H., Ballarales, P., Masaki, J., & Kanagawa, H. (1997). Theory and practice of in vitro fertilization.
- 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 Facultad de Ciencias Agropecuarias Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. [https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25404/1/TESIS Tapia-Tello.pdf](https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/25404/1/TESIS%20Tapia-Tello.pdf)
- Terreros, M., Huanca, W., Arriaga, I., & Ampuero, A. (2015). Effect of three cryoprotectants on the cryopreservation of epididymal alpaca spermatozoa. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 26(3), 420–426. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11182>
- WHO. (2021). World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 6th ed. World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. Geneva, Switzerland. In WHO Press. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
- Wright, S. (1960). The genetics of vital characters of the guinea pig. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 56 (Suppl(May 2019), 123–151. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030560413>

APÉNDICE

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADORES/ DIMENSIONES	METODO
¿Efecto de tres crioprotectores (glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol) en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Cuy (<i>Cavia porcellus</i>)? Problema general: ¿Cuál es el efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Cuy (<i>Cavia porcellus</i>)? Problema específico: ➤ ¿Cuál es el efecto del glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Cuy (<i>Cavia porcellus</i>)? ➤ ¿Cuál es el efecto del etilenglicol en la criopreservación de espermatozoides	Objetivo general: Evaluar el efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cuy (<i>Cavia porcellus</i>). Objetivos específicos: ➤ Determinar la motilidad post descongelado de espermatozoides epididimarios de cuy (<i>Cavia porcellus</i>). ➤ Determinar la viabilidad post descongelado de espermatozoides	Hipótesis nula Los tres crioprotectores no tienen diferentes efectos sobre la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cuy (<i>cavia porcellus</i>). Hipotesis alterna	Variable Independiente Crioprotectores (glicerol, dimetilsulfóxido y etilenglicol). Variable Dependiente ➤ Motilidad. ➤ Vitalidad.	➤ 7% de glicerol. ➤ 7% de dimetilsulfóxido. ➤ 7% de etilenglicol.	Tipo de investigación: Experimental Nivel de Investigación: Aplicativo. Método de Investigación Método científico Diseño de investigación Para la presente investigación se planteó 3 tratamientos: T1 = Glicerol (GL) al 7%. T2= Etilenglicol (EG) al 7%. T3= Dimetilsulfóxido (DMSO) al 7%. Se utilizó el modelo aditivo lineal, diseño completamente al azar DCA para cada uno de los tratamientos, puesto que cada variable en estudio es independiente.

epididimarios de Cuy (<i>Cavia porcellus</i>)? ➤ ¿Cuál es el efecto del dimetilsulfóxido en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de Cuy (<i>Cavia porcellus</i>)?	epididimarios de cuy (<i>Cavia porcellus</i>). ➤ Determinar la integridad de la membrana post descongelado de espermatozoides epididimarios de cuy (<i>Cavia porcellus</i>).	Los tres crioprotectores tienen diferentes efectos sobre la criopreservación de espermatozoides epididimarios de cuy (<i>cavia porcellus</i>)	➤ Integridad de la membrana.	El modelo aditivo lineal utilizado, es el siguiente: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + E_{ij}$ Donde: Y_{ij} = Es el efecto del crioprotector. μ = Efecto de la media general de la variable en estudio α_i =Efecto del i-ésimo tratamiento E_{ij} =Error experimental de cada uno de los tratamientos. Población: Se trabajo con 42 colas del epidídimo, procedentes de 21 cabezas de cuy sacrificados entre 10 a 12 semanas de edad, con peso no menor a 900 gramos. Muestra: No probabilístico por conveniencia de acuerdo al carácter de estudio que tiene el presente trabajo.
---	--	--	-------------------------------------	--

Tabla 14

Concentración espermática de espermatozoides epididimarios de cuy.

FRESCO			
Muestra	Vol. Diluctor	Peso del testículo	Concentración epz 106/ml
M1	1,5	4,79	113,75
M2	1,5	4,85	80,01
M3	1,5	3,72	63,45
M4	1,5	3,77	95,67
M5	1,5	3,21	61,75
M6	1,5	3,22	54,89
M7	1,5	3,16	64,7
M8	1,5	3,18	51,17
M9	1,5	3,48	63,45
M10	1,5	3,52	48,99
M11	1,5	3,55	64,555
M12	1,5	3,57	57,89
M13	1,5	4,33	67,95
M14	1,5	4,39	63,45
M15	1,5	3,92	35,92
M16	1,5	3,89	63,44
M17	1,5	3,86	61,78
M18	1,5	3,82	63,45
M19	1,5	3,96	60,55
M20	1,5	3,91	57,89
M21	1,5	4,59	70,59
Promedio		3,84	65,01
D.S.		0,5	16,0

Tabla 15

Datos obtenidos en fresco y post congelado de la motilidad espermática en porcentaje.

MOTILIDAD IDIVIDUAL PROGRESIVA							
Fresco Mot.		Glicerol		Etilenglicol		Dimetilsulfóxido	
Mot %	No Mot %	Mot %	No Mot %	Mot %	No Mot %	Mot %	No Mot %
60	40	11	89	5	95	1	99
55	45	10	90	4	96	0	100
62	38	11	89	5	95	0	100
58	42	10	90	2	98	1	99
63	37	10	90	4	96	1	99
60	40	10	90	4	96	1	99
61	39	11	89	4	96	0	100
58	42	10	90	4	96	1	99
57	43	11	89	2	98	0	100
63	37	9	91	5	95	2	98
62	38	8	92	3	97	3	97
64	36	9	91	4	96	1	99
61	39	9	91	4	96	1	99
60	40	12	88	4	96	2	98
60	40	10	90	5	95	1	99
60	40	9	91	3	97	4	96
62	38	11	89	5	95	3	97
65	35	10	90	6	94	1	99
64	36	9	91	6	94	1	99
62	38	9	91	3	97	0	100
63	37	8	92	3	97	1	99
60,94		9,79		3,94		1,21	
2,5		1,0		1,1		1,0	

Tabla 16

Datos obtenidos en fresco y post congelado de vitalidad espermática en porcentaje.

VITALIDAD							
Fresco		Glicerol		Etilenglicol		Dimetilsulfóxido	
Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos	Vivos	Muertos
65	35	13	87	7	93	1	99
64	36	12	88	8	92	2	98

66	34	13	87	6	94	1	99
60	40	15	85	6	94	2	98
67	33	14	86	9	91	6	94
62	38	11	89	5	95	3	97
69	31	13	87	6	94	2	98
60	40	11	89	5	95	4	96
62	38	10	90	6	94	3	97
64	36	13	87	8	92	5	95
65	35	13	87	6	94	2	98
68	32	10	90	6	94	3	97
63	37	11	89	7	93	2	98
60	40	10	90	4	96	6	94
65	35	12	88	5	95	3	97
64	36	11	89	7	93	4	96
64	36	12	88	5	95	3	97
68	32	12	88	6	94	5	95
68	32	16	84	9	91	3	97
69	31	11	89	7	93	5	95
65	35	12	88	6	94	4	96
64,64		12,11		6,43		3,29	
2,9		1,6		1,3		1,5	

Tabla 17

Datos obtenidos en fresco y post congelado de la integridad de la membrana del espermática en porcentaje.

HOST							
Fresco Host		Glicerol		Etilenglicol		Dimetilsulfóxido	
Host +	Host -	Host +	Host -	Host +	Host -	Host +	Host -
61	39	9	91	5	95	0	100
59	41	11	89	2	98	0	100
59	41	9	91	3	97	1	99
60	40	10	90	1	99	2	98
58	42	9	91	2	98	1	99
58	42	10	90	2	98	2	98
58	42	9	91	2	98	1	99
57	43	11	89	5	95	1	99
60	40	10	90	1	99	4	96
61	39	12	88	3	97	2	98
57	43	11	89	1	99	3	97

56	44	10	90	4	96	1	99
57	43	8	92	2	98	2	98
60	40	13	87	6	94	2	98
56	44	8	92	5	95	2	98
56	44	11	89	1	99	3	97
63	37	11	89	4	96	3	97
56	44	12	88	3	97	1	99
58	42	12	88	3	97	1	99
62	38	10	90	2	98	0	100
58	42	12	88	4	96	1	99
58,56		10,38		2,90		1,60	
2,0		1,4		1,5		1,0	

Tabla 18

Datos transformados a arcoseno en fresco y post congelado de motilidad espermática.

MOTILIDAD IDIVIDUAL PROGRESIVA							
Fresco Mot.		Glicerol		Etilenglicol		Dimetilsulfóxido	
Mot %	Arcoseno	Mot %	Arcoseno	Mot %	Arcoseno	Mot %	Arcoseno
60	50,77	11	19,37	5	13,41	1	5,74
55	47,87	10	18,48	4	10,87	0	2,83
62	51,94	11	19,27	5	12,84	0	3,96
58	49,60	10	18,43	2	8,13	1	5,74
63	52,53	10	18,15	4	10,80	1	4,96
60	50,77	10	18,15	4	10,80	1	4,96
61	51,35	11	19,37	4	10,87	0	0,00
58	49,60	10	18,15	4	10,87	1	5,74
57	49,02	11	19,47	2	8,13	0	0,00
63	52,53	9	17,46	5	12,31	2	8,13
62	51,94	8	16,43	3	9,97	3	9,97
64	53,13	9	17,46	4	11,40	1	5,74
61	51,35	9	17,46	4	11,64	1	5,74
60	50,64	12	19,95	4	12,12	2	8,13
60	50,77	10	18,15	5	12,49	1	5,74
60	50,77	9	17,46	3	9,97	4	11,54
62	51,94	11	19,37	5	13,38	3	9,97
65	53,73	10	18,43	6	14,18	1	6,25
64	53,13	9	17,46	6	13,83	1	4,14
62	51,94	9	17,46	3	9,97	0	3,62
63	52,53	8	16,43	3	9,97	1	6,10

Tabla 19

Datos transformados a arcoseno en fresco y post congelado de vitalidad espermática.

VITALIDAD							
Fresco		Glicerol		Etilenglicol		Dimetilsulfóxido	
Vivos	Arcoseno	Vivos	Arcoseno	Vivos	Arcoseno	Vivos	Arcoseno
65	53,73	13	21,13	7	15,34	1	5,74
64	53,13	12	20,27	8	16,43	2	8,13
66	54,33	13	21,13	6	14,18	1	5,74
60	50,61	15	22,79	6	14,29	2	8,13
67	54,94	14	21,97	9	17,46	6	14,18
62	51,94	11	19,37	5	12,92	3	9,97
69	56,17	13	21,13	6	14,18	2	8,13
60	50,77	11	19,37	5	12,92	4	11,54
62	51,94	10	18,43	6	14,18	3	9,97
64	53,13	13	20,89	8	16,43	5	12,92
65	53,73	13	21,13	6	14,48	2	8,13
68	55,55	10	18,76	6	14,18	3	9,97
63	52,53	11	19,37	7	15,34	2	8,13
60	50,64	10	18,18	4	12,12	6	14,18
65	53,73	12	19,86	5	12,92	3	9,97
64	53,13	11	19,37	7	15,34	4	11,54
64	53,13	12	20,56	5	12,92	3	9,97
68	55,55	12	20,27	6	14,18	5	12,92
68	55,55	16	23,58	9	17,46	3	9,97
69	56,17	11	19,37	7	15,34	5	12,92
65	53,73	12	19,95	6	14,63	4	11,54

Tabla 20

Datos transformados a arcoseno en fresco y post congelado de Host - test.

HOST							
Fresco Host		Glicerol		Etilenglicol		Dimetilsulfóxido	
Host +	Arcoseno	Host +	Arcoseno	Host +	Arcoseno	Host +	Arcoseno
61	51,35	9	17,46	5	12,92	0	0,00
59	50,18	11	19,47	2	8,13	0	2,83
59	50,18	9	17,46	3	9,97	1	5,74
60	50,61	10	18,43	1	5,74	2	8,13
58	49,60	9	17,46	2	8,13	1	4,96
58	49,60	10	18,15	2	8,13	2	8,13
58	49,80	9	17,46	2	8,13	1	5,74
57	49,02	11	19,47	5	12,92	1	5,74
60	50,77	10	18,43	1	5,74	4	11,54
61	51,35	12	20,27	3	9,97	2	8,13
57	49,02	11	19,47	1	5,74	3	9,97
56	48,45	10	18,43	4	11,54	1	5,74
57	49,02	8	16,43	2	8,13	2	8,13
60	50,64	13	21,13	6	14,18	2	8,13
56	48,45	8	16,43	5	12,92	2	8,13
56	48,45	11	19,37	1	5,74	3	9,97
63	52,53	11	19,37	4	11,54	3	9,97
56	48,45	12	20,27	3	9,97	1	5,74
58	49,60	12	20,27	3	9,97	1	5,74
62	51,94	10	18,43	2	8,13	0	3,62
58	49,60	12	20,27	4	11,54	1	6,10

PANEL FOTOGRÁFICO

Figura 12

Control de peso de testículos de cuy.



Figura 13

Solución madre más crioprotectores.

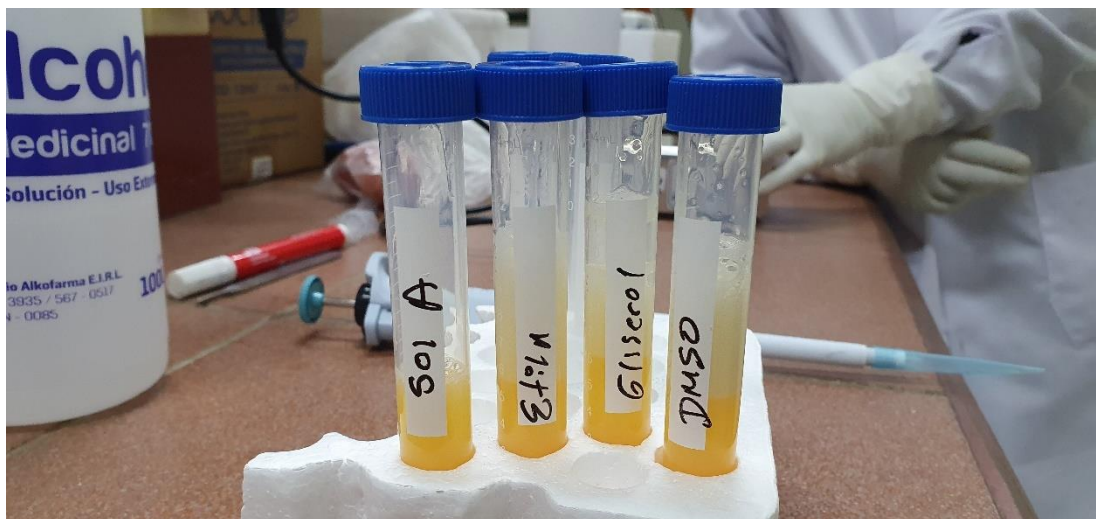


Figura 14

Evaluación microscópica de espermatozoides epididimarios de cuy.

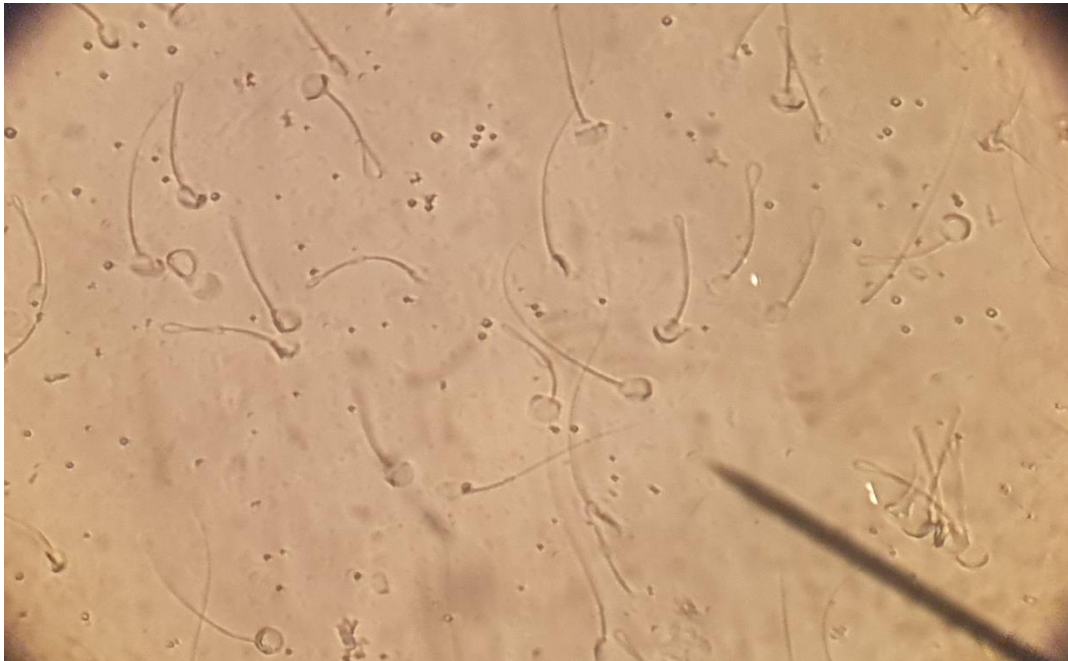


Figura 15

Concentración espermática con la cámara de Neubauer improved.

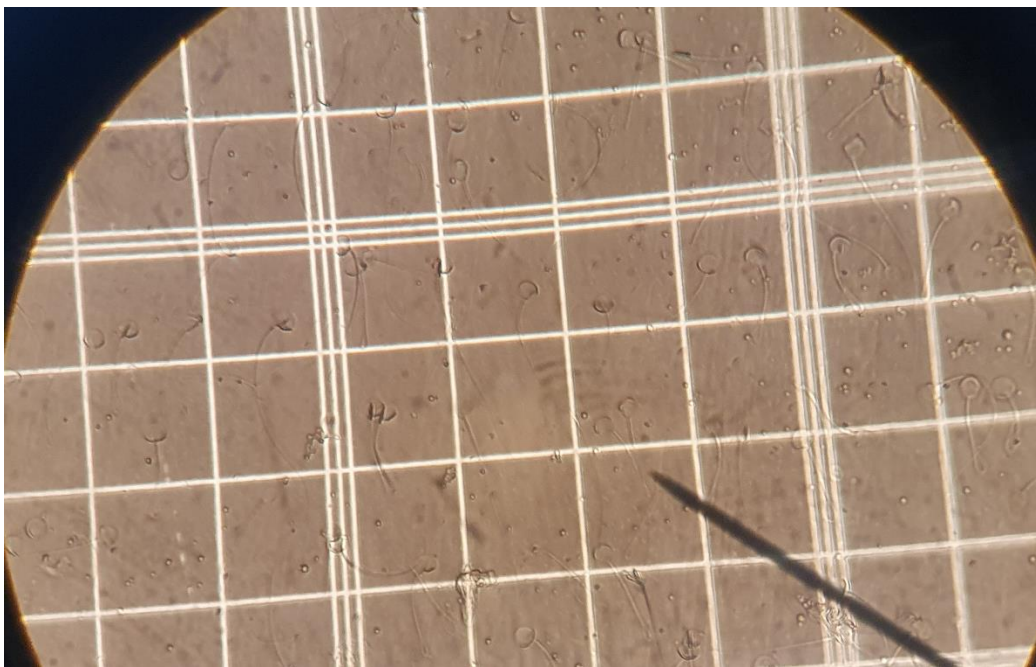


Figura 16

Empajillado de las muestras en cada tratamiento.



Figura 17

Proceso de congelación y almacenamiento de las muestras congeladas.

