



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN
DE MACA ROJA O NEGRA ATOMIZADA
COMERCIAL COMBINADA CON UN
POTENCIAL CRIOPROTECTOR PARA
CÉLULAS MADRE
ESPERMATOGONIALES (SSC) DE
ALPACA *Vicugna pacos* TANTO EN SSC
AISLADAS COMO EN FRAGMENTOS
TESTICULARES”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN
FISIOLOGÍA**

MARTHA ESTHER VALDIVIA CUYA

LIMA - PERÚ

2019

ASESOR

Dr. Gustavo Francisco Gonzales Rengifo

DEDICATORIA

A mis padres Juan y Juana *In memoriam*

Los que me inspiraron y me inculcaron con
Amor las enseñanzas que hoy dirigen mi vida.

A mi Hermana Mercedes, a mi sobrina Jukiko

Y a mi amada Hija Camila

Quienes constantemente me apoyan en el inicio y
En la culminación de mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Gustavo Francisco Gonzales Rengifo, por su apoyo e impulso en estudiar nuevas propiedades de la maca con esta investigación; así como por su contribución en la culminación de esta investigación.

A mis colaboradores y miembros del Grupo de investigación UNMSM en Biotecnología Reproductiva para la conservación y mejora genética animal (BIOTRA) del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Al Jurado Dr. Jorge Enrique Rodríguez Bailón, Dra. Galy Mendoza Torres, Dr. Alexei Santiani Acosta y Dr. Iván Lozada Requena, por sus aportes e importantes preguntas los que hicieron que lograra finalmente culminar este trabajo.

Al Doctor Alexei Santiani por el uso del citómetro de flujo Amnis de la Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM adquirido mediante el proyecto de Equipamiento denominado: Adquisición de un citómetro de flujo para investigaciones en gametología y ciencias veterinarias” (Contrato N° 123-FINCyT-ECL-2014).

Al Doctor Jaime Ruiz y a su equipo de investigadores de la Universidad Nacional de Huancavelica por la evaluación de la edad y salud de los animales así como en la colecta de las muestras usadas en este trabajo de investigación.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS por el apoyo financiero con los Proyectos de Investigación CON/CON UNMSM 151001261, PIBA15A106, PROCYT 313-CONCYTEC-OAJ, así como las facilidades en el uso de equipamiento para la ejecución de esta investigación en el Laboratorio de Fisiología de la Reproducción de la Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION.....	10
II.1. Planteamiento del problema.....	10
II 1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN GENERAL.....	11
II.1.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN ESPECÍFICA.....	11
II.2 MARCO TEÓRICO.....	12
II.2.1 FERTILIDAD MASCULINA CONSERVACIÓN DE LA FERTILIDAD Y CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES (SSC).....	12
II.2.2 MACA <i>Lepidium meyenii</i> COMO POTENCIAL ANTIOXIDANTE NATURAL EN LA CRIOGENIA DE SSC:.....	17
II.2.3 CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO TESTICULAR:.....	18
II.2.4 CRIOPRESERVACIÓN DE SUSPENSIONES DE CÉLULAS ESPERMATOGONIALES AISLADAS:.....	20
II.2.5 CRIODAÑO POR APOPTOSIS Y NECROSIS EN CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES DURANTE LA CRIOPRESERVACIÓN.....	20
II.2.6 <i>Dolichos biflorus</i> agglutinin (DBA), MITOSENSE Y 7AAD:.....	25
II.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....	27
II.4 OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	30
II.4.1 OBJETIVO GENERAL:.....	30
II.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
II.4.3 HIPÓTESIS.....	30
III. METODOLOGÍA.....	31
III.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	31
III.2 POBLACIÓN.....	32
III.3 MUESTRA.....	33
III.3.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	34
III.3.3 Criterios de exclusión:.....	36
III. 3.4 FLUJOGRAMA.....	37
III.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:.....	38
III. 4.1. VARIABLES INDEPENDIENTES.....	38
III.4.2. VARIABLES DEPENDIENTES.....	40

III. 5 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	41
III.5.1 AISLAMIENTO DE LAS SSC EN FORMA DE SUSPENSIÓN CELULAR	41
III.5.2 AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS TESTICULARES DE ALPACA:	42
III.5.3 CULTIVO DE SSC Y PLAQUEO DIFERENCIAL:	42
III. 5.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS SSC:	43
III.5.5 VIABILIDAD DE CELULAS ESPERMATOGONIALES CON AZUL DE TRIPAN	49
III.5.6 DETERMINACION DE LA CITOTOLERANCIA, DETERMINADA POR LA VIABILIDAD, EN LAS CELULAS ESPERMATOGONIALES AISLADAS EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE MACA ROJA Y MACA NEGRA JUENS EN UN PERIODO DE ESTABILIZACION CELULAR PARA CRIOGENIA A 4°C.	50
III.5.7 CRIOPRESERVACION.....	51
III.5.8 DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE SSC CON LA Sonda DBA EN CÈLULAS FRESCAS MEDIANTE CF.....	53
III.5.9 DETERMINACION DE SSC Y EVALUACION DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POSTDESCONGELAMIENTO MEDIANTE CF ...	54
III 5.10 MUESTRAS DE SSC CONGELAS EN FORMA AISLADAS FUERON SOMETIDAS A PROLIFERACION Y DIFERENCIACION POSTDESCONGELAMIENTO	56
III. 6 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA:.....	56
III.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	57
IV. RESULTADOS.....	58
IV.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO.....	58
IV.2 IDENTIFICACION MOLECULAR DE LAS SSC DE ALPACA.....	60
IV.3 VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS ESPERMATOGONIALES AISLADAS EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE MACA ROJA Y NEGRA JUENS A 4°C.....	61
IV.4 VIABILIDAD CELULAR EN FRAGMENTOS DESCONGELADOS:.....	66
IV.5 CÉLULAS ESPERMATOGONIALES CONGELADAS EN FORMA AISLADA:.....	71
IV.6 COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR POSTDESCONGELAMIENTO CON AZUL DE TRIPAN PROVENIENTE DE MUESTRAS CONGELADOS EN FORMA DE FRAGMENTOS Y EN FORMA AISLADA:.....	74
IV.7 DETERMINACION DE sDBA+, wDBA+, DBA-, sMITOSENSE+, wMITOSENSE+ y 7AAD+ POSTDESCONGELAMIENTO.....	80
IV.7.1 DESCONGELAMIENTO DE FRAGMENTOS.....	80
IV.7.2 DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS AISLADAS:	85
IV.7.3 DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS AISLADAS vs FRAGMENTOS:	87

IV.8 POTENCIAL MITOCONDRIAL POSTDESCONGELAMIENTO DETERMINADA MEDIANTE CF CON LAS SONDAS MITOSENSE Y 7AAD:	92
IV.8.1 COMPARANDO LOS TIPOS DE MACA JUVENS (ROJA – NEGRA) VS CONTROL (SIN MACA)	96
IV.8.2 COMPARANDO LOS MEDIOS CON ACP PERMEABLES (DMSO VS DMA) EN FRAGMENTOS Y CÉLULAS AISLADAS POSTDESCONGELAMIENTO EVALUADAS MEDIANTE CF:	97
IV.8.3 COMPARANDO LOS MEDIOS CON ACP NO PERMEABLES (FRUCTOSA, TREHALOSA Y SUCROSA) EN FRAGMENTOS Y EN CÉLULAS AISLADAS POSTDESCONGELAMIENTO MEDIANTE CF:	98
IV.8.4 COMPARACION ENTRE EL TIPO DE MUESTRA CONGELADA (CELULAS Y FRAGMENTOS)	99
IV.9 CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS ESPERMATOGONIALES POSTDESCONGELAMIENTO	101
V. DISCUSIÓN	103
VI. CONCLUSIONES	121
VI.1 Conclusión general	121
VI.2 Conclusiones específicas	121
VII. LIMITACIONES	122
VIII. RECOMENDACIONES	124
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
X. ANEXOS	150
Anexo N°1: Muestras usadas en el estudio:	151
Anexo N°3: Tiempo de congelamiento de células espermatozonales aisladas a -196°C	153
Anexo N° 4. Viabilidad de las células espermatozonales de alpaca postdescongelamiento proveniente de fragmentos con azul de Tripán	156
Anexo N°6. Viabilidad Media$\pm$EE de las células espermatozonales evaluados con azul de Tripán obtenidas desde fragmentos descongelados	158
Anexo N°7. Viabilidad Media$\pm$EE de las células espermatozonales	159
Postdescongelamiento congeladas en forma aislada y	159
evaluadas con Azul de Tripán	159
Anexo N°8. Porcentaje de células espermatozonales redondas frescas tipificadas mediante CF de acuerdo a la reactividad de la sonda DBA como sDBA+, wDBA+ y DBA-	160
Anexo N°9. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en las muestras Totales proveniente de fragmentos congelados con CF	161
Anexo N°10. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en las muestras Buenas proveniente de fragmentos congelados con CF	162

Anexo N°11. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en las muestras Malas de muestras congeladas en forma de fragmentos con CF.....	163
Anexo N° 12. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en las muestras totales de células aisladas evaluadas con CF.....	164
Anexo N°13. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en muestras buenas en células aisladas mediante CF.....	165
Anexo N°14. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en muestras Malas de células aisladas con CF.....	166
Anexo 15. Comparacion del porcentaje de sDBA+, wDBA+, DBA-, sMitosense+, Mitopsense+, AAD, en muestras totales congeladas en forma aislada (Cell) y en fragmentas (Frag) evaluadas mediante CF.....	167
Anexo N°16. Comparación de la Media $\pm$EE en muestras Buenas de sDBA+, wDBA+, DBA-, sMitosense+, wMitosense+, 7AAD+ en las células aisladas (cell) y células proveniente de fragmentos (Frag) postdescongelamiento evaluadas con CF.....	168
Anexo N°17. Comparación de la Media $\pm$EE en muestras Malas de sDBA+, wDBA+, DBA-, sMitosense+, wMitosense+, 7AAD+ en las células aisladas (cell) y células proveniente de fragmentos (Frag) postdescongelamiento evaluadas mediante CF.....	169
Anexo N°18. Composición de la Maca Juvens Negra y Roja. (178).....	170
Anexo N°19. Cromatogramas de maca negra y roja.....	171

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N°1: Valor ponderado de los productos bandera del Perú.	01
Tabla N°2. Muestras utilizadas en el estudio.	34
Tabla N°3: Detalle de los componentes de los medios de Criopreservación.	35
Tabla N°4. Primers diseñados para PCR	45
Tabla N°5. Valores de Referencia de los parámetros evaluados	58
Tabla N°6. Porcentaje de viabilidad de las células espermatogoniales	62
Tabla N°7. Comparación de la viabilidad fragmentos y células	77
Tabla N° 8. Proliferación y diferenciación de células aisladas	102

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. N° 1. La criopreservación induce la apoptosis celular	22
Fig. N°2: Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis celular	23
Fig. N° 3. Diagrama de flujo de las actividades	37
Fig. N° 4. Curva de congelamiento termocontrolado para fragmentos	52
Fig. N° 5. Curva de congelamiento termocontrolado para células aisladas.	52
Fig. N°6. Células espermatozonales de alpaca frescas evaluadas con DBA mediante CF.	59
Fig. N°7. Porcentaje de SSC (sDBA), SSC en diferenciación temprana (wDBA+) y células diferenciadas (DBA-) en muestras frescas.	59
Fig. N°8. Ideograma de <i>Sus scrofa</i> y <i>Bos taurus</i> .	60
Fig. N°9. Amplificación de PCR de SSC y SSC en diferenciación.	61
Fig. N°10. Viabilidad en MSO de células espermatozonales con maca roja y negra.	63
Fig. N° 11. Viabilidad en MTO de células espermatozonales con maca roja y negra.	64
Fig. N°12. Porcentaje de viabilidad de las células espermatozonales de alpaca en concentraciones crecientes de Maca en medio MSO y MTO.	65
Fig. N°13: Viabilidad con azul de Tripán postdescongelamiento en las células espermatozonales congeladas en fragmentos testiculares de alpaca	67

Fig. N°14. Viabilidad con azul de Tripán de las células espermatozonales postdescongelamiento provenientes de fragmentos testiculares.	68
Fig. N° 15. Distribución de la viabilidad con azul de Tripán en muestras categorizadas como Buenas, Regulares y Malas.	70
Fig. N°16. Viabilidad de Células espermatozonales congeladas en forma Aislada y evaluadas mediante el colorante azul de Tripán.	71
Fig. N° 17. Viabilidad postdescongelamiento de células espermatozonales de alpaca congeladas en forma aislada evaluadas con azul de Tripán en muestras Totales, Buenas y Regulares.	72
Fig. N°18. Comparación de la viabilidad celular en muestras Totales entre células congeladas en fragmentos y en forma aislada (Azul de Tripán).	78
Fig. N°19. Comparación de la viabilidad celular en células congeladas en fragmentos y en forma aislada en Muestras Buenas (Azul de Tripán).	79
Fig. N° 20. Células madre de alpaca postdescongelamiento evaluadas con DBA FlowCelect TM Mitopotential red Kit mediante CF.	80
Fig. N°21. Área analizada mediante CF. Histograma de la intensidad de DBA, 7AAD y Mitosense.	82
Fig. N°22 Distribución porcentual de las sDBA+ proveniente de Fragmentos descongelados en muestras Totales (FRAGTsDBA+), Buenas (FRAG BsDBA+) y Malas (FRAG MsDBA+)	83
Figura N°23. A) Porcentaje de SSC (TsDBA ⁺), B) SSC en diferenciación temprana (TwDBA ⁺) y C) células espermatozonales redondas diferenciadas (TDBA-) en Todas las muestras congeladas en forma aislada.	86
Fig. N°24. Porcentaje de células TsDBA+ en fragmentos (FRAG TsDBA) y en células congeladas en forma aislada (CEL TsDBA+) evaluadas mediante CF.	88

Fig. N° 25. Porcentaje ($X \pm EE$) de células BsDBA+ en fragmentos (FRAG BsDBA) y en células congeladas en forma aislada (CEL BsDBA+) evaluadas mediante CF.	89
Fig. N°26. Porcentaje ($X \pm EE$) de células BwDBA+ en fragmentos (FRAG BwDBA) y en células congeladas en forma aislada (CEL BwDBA+) evaluadas mediante CF.	90
Fig. N°27. Porcentaje ($X \pm EE$) de células DBA- en fragmentos (FRAG BDBA-) y en células congeladas en forma aislada (CEL BDBA-) evaluadas mediante CF.	91
Fig. N°28. Análisis de Dot Plot de Mitosense y 7AAD en células espermatozonales postdescongelamiento.	92
Fig. N°29. Distribución porcentual de las sDBA+ proveniente de Fragmentos descongelados en muestras Totales (FRAGTsDBA+), Buenas (FRAG BsDBA+) y Malas (FRAG MsDBA+).	95
Fig. N°30. Alto potencial de membrana mitocondrial en las células congeladas en forma aislada postdescongelamiento en muestras Totales (CEL TsMIT), Buenas (CEL BsMIT) y en muestras Malas (CEL MsMIT).	96
Fig. N° 31. En el análisis comparativo de los porcentajes promedios de SSC con alto potencial de membrana mitocondrial.	100
Fig. N°32. Porcentaje de SSC con mitocondria activa en muestras consideradas regulares en relación a su límite mayor y menor.	101
Fig. N°33. Proliferación y diferenciación In vitro de muestras congeladas en forma aislada postdescongelamiento.	102

ABREVIATURAS

A: Apoptosis

ACP: Agente crioprotector

BsDBA+: Célula madre espermatogonial fuertemente positiva a DBA en muestras Buenas.

BwDBA+: Célula madre espermatogonial en diferenciación temprana débilmente positiva a DBA en muestras Buenas.

B DBA-: Célula espermatogonial diferenciada negativa a DBA en muestras Buenas.

BsMitosense+: Célula fuertemente positiva a Mitosense, con alto potencial de membrana mitocondrial en muestras Buenas.

BwMitosense+: Célula débilmente positiva a Mitosense con bajo potencial de membrana mitocondrial en muestras Buenas.

B 7AAD+: células en necrosis en muestras Buenas.

Cell: Células congeladas en forma aisladas

CF: Citometría de flujo

COPROBA: Comisión Nacional de Productos bandera.

DBA: “*Dolichos biflorus* Agglutinin marker”: Marcador específico para células madre.

DE1: Digestión Enzimática 1

DE2: Digestión Enzimática 2

DMA: Dimetilacetamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

EA: “*Early apoptosis*” Apoptosis temprana

FRAG: Fragmentos testiculares congelados en forma de fragmentos.

GalNAc: α -N- acetilgalactosamina

HAM F10 mod: Medio HAM F 10 modificado

ICSI *Intracitoplasmatic sperm insemination*: Inseminación intracitoplasmática de un espermatozoide.

INDECOPI: Instituto Nacional de Defensa de la Competencia y de la Protección de la Propiedad Intelectual.

MEM: Minimal esencial medio

MFA: Medio crioprotector conteniendo Fructosa y Dimetilacetamida.

MFAN: Medio crioprotector conteniendo Fructosa, Dimetilacetamida y Maca Negra.

MFAR: Medio crioprotector conteniendo Fructosa, Dimetilacetamida y Maca Roja.

MFO: Medio crioprotector conteniendo Fructosa y Dimetilsulfóxido.

MFON: Medio crioprotector conteniendo Fructosa, Dimetilsulfóxido y Maca Negra.

MsDBA+: Célula madre espermatogonial fuertemente positiva a DBA en muestras Malas.

MwDBA+: Célula madre espermatogonial en diferenciación temprana débilmente positiva a DBA en muestras Malas.

M DBA-: Célula espermatogonial diferenciada y negativa a DBA en muestras Malas.

MsMitosense+: Célula con alto potencial de membrana mitocondrial fuertemente positiva a Mitosense en muestras Malas.

MwMitosense+: Célula con bajo potencial de membrana mitocondrial débilmente positivo a Mitosense en muestras Malas.

M 7AAD+: Célula en necrosis, fuertemente positiva a 7AAD en muestras Malas.

MSA: Medio crioprotector conteniendo Sucrosa y Dimetilacetamida.

MSAN: Medio crioprotector conteniendo Sucrosa, Dimetilacetamida y Maca Negra.

MSAR: Medio crioprotector conteniendo Sucrosa, Dimetilacetamida y Maca Roja.

MSO: Medio crioprotector conteniendo Sucrosa y Dimetilsulfoxido.

MSON: Medio crioprotector conteniendo Sucrosa, Dimetilsulfoxido y Maca Negra.

MSOR: Medio crioprotector conteniendo Sucrosa, Dimetilsulfoxido y Maca Roja.

MTA: Medio crioprotector conteniendo Trehalosa, Dimetilacetamida.

MFOR: Medio crioprotector conteniendo Fructosa, Dimetilsulfoxido y Maca Roja.

MTAN: Medio crioprotector conteniendo Trehalosa, Dimetilacetamida y Maca Negra.

MTAR: Medio crioprotector conteniendo Trehalosa, Dimetilacetamida y Maca Roja.

MTO: Medio crioprotector conteniendo Trehalosa, Dimetilsulfoxido.

MTOR: Medio crioprotector conteniendo Trehalosa, Dimetilsulfoxido y Maca Roja.

MTON: Medio crioprotector conteniendo Trehalosa, Dimetilsulfoxido y Maca negra.Ngn3: Neurogenina 3

NL2: Nitrógeno líquido

ONUDI: Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial.

PBS: “*Phosphate Buffer saline*” Buffer fosfato salino.

ROS: Especies oxígeno reactivas

sDBA+: “*strongly DBA positive*” (células madre espermatogoniales fuertemente positivas a DBA)

wDBA+: “*Weakly DBA positive*” (células en diferenciación temprana débilmente positivas a DBA)

DBA-: “*DBA negative*” (células diferenciadas negativas a DBA).

sMitosense+: “*strongly Mitosense positive*” (Células fuertemente positivas a Mitosense, con alto potencial de membrana mitocondrial)

wMitosense+: “*weakly Mitosense positive*” (Células débilmente positivas a Mitosense, con bajo potencial de membrana mitocondrial, células en apoptosis temprana)

Mitosense-: “*Mitosense negative*” (Células negativas a Mitosense en Apoptosis)

7AAD+: “*7AAD positive*” (Células necróticas)

SSC: “Spermatogonia stem cell” (Células madre espermatogoniales).

SSCs: Células madre espermatogoniales.

TsDBA+: Célula madre espermatogonial fuertemente positiva a DBA en muestras Totales.

TwDBA+: Célula madre espermatogonial en diferenciación temprana débilmente positiva a DBA en muestras Totales.

T DBA-: Célula espermatogonial diferenciada negativa a DBA en muestras Totales.

TsMitosense+: Célula espermatogonial con alto potencial de membrana mitocondrial viva en muestras Totales.

TwMitosense+: Célula espermatogonial con bajo potencial de membrana mitocondrial o apoptosis temprana en muestras Totales.

T 7AAD+: Célula en necrosis fuertemente positiva en muestras Totales.

Zbtb16: “*zinc-finger and BTB-domain containing 16*”

RESUMEN

Células madre espermatogoniales (SSC) de alpacas adultas fueron identificadas con marcadores moleculares (*Zbtb16*, Integrina $\beta 1$) y mediante citometría de flujo (CF) bajo la intensidad de *Dolichos biflorus* como sDBA⁺ (SSC). Se congelaron fragmentos testiculares y suspensiones de células espermatogoniales en 18 medios conteniendo ACPs permeables (DMSO y DMA), ACPs no permeables (Trehalosa, Glucosa y Sucrosa), suplementados con Maca roja y negra. Se congelaron 44 muestras (fragmentos) y 32 (Células aisladas) mediante protocolos de congelamiento I y II respectivamente.

Al comparar la viabilidad entre fragmentos y células postdescongelamiento, en muestras Buenas, con azul de Tripán se observó $75,81 \pm 3,25\%$ de viabilidad en fragmentos vs $54,67\% \pm 4,07$ en células aisladas en el medio MSA ($p < 0,05$). Asimismo el porcentaje más alto observado en células aisladas fue de $57,24 \pm 4,11\%$ vs $73,87 \pm 3,55\%$ en fragmentos ($p < 0,05$). En muestras Buenas mediante CF se observó que $13,52 \pm 1,27\%$ de sDBA⁺ (fragmentos) y $5,07 \pm 1,87\%$ (células en suspensión) en el medio MTO y $9,67 \pm 2,22\%$ (Fragmentos) y $2,73 \pm 2,02\%$ (Células aisladas) en el medio ($p < 0,05$). Los potenciales de membrana mitocondrial (sMitosense⁺) postdescongelamiento más altos fueron $57,20 \pm 9,57\%$ (fragmentos) y $63,68 \pm 8,90\%$ (Células aisladas) en los medios MTON y MSON respectivamente ($p > 0,05$). En muestras regulares se observa que el 34,4% de células son sMitosense⁺ en el medio MSON postdescongelamiento y en muestras buenas existe diferencia significativa en BsMitosense⁺ entre el medio MFOR vs MFO y MFON vs MFO ($p < 0,05$). Asimismo, las células congeladas en el medio MSON fueron capaces de proliferar y diferenciarse *In vitro* postdescongelamiento. Se concluye que es posible identificar la presencia de SSC en alpacas adultas usando

marcadores moleculares como β integrina y ZBTB16 mediante qPCR y con DBA mediante CF. Durante la criopreservación se observó que la Maca negra conserva la viabilidad y la actividad mitocondrial en las SSC de alpacas adultas congeladas en forma de fragmentos testiculares y en células aisladas

Palabras clave: Célula madre espermatogonial, ACP, Maca, Criopreservación. Maca, alpaca.

ABSTRACT

Spermatogonial stem cells (SSC) of adult alpacas were identified with molecular markers (Zbtb16, Integrin β 1) and by flow cytometry (CF) under the intensity of Dolichos biflorus as sDBA + (SSC). Testicular fragments and spermatogonial cell suspensions were frozen in 18 media containing permeable ACPs (DMSO and DMA), non-permeable ACPs (Trehalose, Glucose and Sucrose), supplemented with red and black Maca. 44 samples (fragments) and 32 (Isolated cells) were frozen by freezing protocols I and II respectively.

When comparing the viability between fragments and post-defrosting cells, in Good samples, with Trypan blue, $75.81 \pm 3.25\%$ viability in fragments vs $54.67\% \pm 4.07$ was observed in cells isolated in the MSA medium ($p < 0.05$). Likewise, the highest percentage observed in isolated cells was $57.24 \pm 4.11\%$ vs. $73.87 \pm 3.55\%$ in fragments ($p < 0.05$). In Good samples by CF it was observed that $13.52 \pm 1.27\%$ of sDBA + (fragments) and $5.07 \pm 1.87\%$ (suspended cells) in the MTO medium and $9.67 \pm 2.22\%$ (Fragments) and $2.73 \pm 2.02\%$ (Isolated cells) in the medium ($p < 0.05$). The highest mitochondrial membrane (sMitosense +) potentials after thawing were $57.20 \pm 9.57\%$ (fragments) and $63.68 \pm 8.90\%$ (Isolated cells) in the MTON and MSON media respectively ($p > 0.05$) . In regular samples it is observed that 34.4% of cells are sMitosense + in the post-defrosting MSON medium and in good samples there is a significant difference in BsMitosense + between the MFOR vs MFO medium and MFON vs MFO medium ($p < 0.05$). In addition, the frozen cells in the MSON medium were able to proliferate and differentiate in vitro post-thawed. It is concluded that atomized commercial black maca exerts a protective effect on cryopreserved alpaca SSC in combination with the dilutor medium containing DMSO and Sucrose on the

mitochondrial potential of adult alpacas SSCs. It is concluded that it is possible to identify the presence of SSC in adult alpacas using molecular markers such as β integrin and ZBTB16 by qPCR and with DBA by CF. During cryopreservation it was observed that black Maca retains the viability and mitochondrial activity in the SSC of frozen adult alpacas in the form of testicular fragments and isolated cells.

Key words: SSC, CPA, Maca, cryopreservation, alpaca

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es el principal productor y exportador de Maca y de fibra de alpaca por lo que las actividades laborales asociadas a estos productos tienen una gran transcendencia socioeconómica para nuestro país. El Perú mediante el Decreto Supremo N° 015-2004-MINCETUR del 28 de julio del 2004 creó la Comisión Nacional de productos bandera del Perú (COPROBA); estableciéndose entre los siete primeros productos bandera del Perú a la Maca y a los camélidos sudamericanos, la Comisión ha culminado en funciones, pero los productos siguen vigentes como productos bandera del Perú como lo indica INDECOPI en el 2013 (3) y el Ministerio de la Producción el 2018 (5). En el primer lugar de la ponderación está ubicada la alpaca junto a la vicuña con una ponderación de 8.79 y en el cuarto lugar la Maca con una ponderación de 8.25 (Tabla N°1), los criterios de inclusión para esta ponderación están basados en: I) En relación al origen (24%), II). En relación a producción y gestión (34%) y a su III) Potencial de exportación (42%); debido a estos criterios de inclusión se ha posicionado a los productos bandera del Perú (1, 2). Actualmente el Perú cuenta con 13 productos que son reconocidos como productos bandera del Perú (3), (5).

Tabla N°1: Valor ponderado de los productos bandera del Perú. (1)

PRODUCTO	VALOR PONDERADO
Camélidos Peruanos (Alpaca y Vicuña)	8.79
Gastronomía Peruana	8.74
Pisco	8.45
Maca	8.25
Algodón Peruano (Pima y Tanguis)	8.11
Lúcuma	7.87
Cerámica de Chulucanas	7.80
Espárrago	7.71
Granos Andinos (Quinoa, Kiwicha y Cañihua)	7.64
Camu Camu	7.46
Tara	7.43
Maíz Morado	7.41
Joyería y Orfebrería	7.38
Café Especial	7.08
Pimiento Piquillo	6.98
Páprika	6.81
Chirimoya	6.76
Aicachofa	6.58
Papa	6.46

La exportación de maca (4) así como de alpaca se ha incrementado anualmente de acuerdo a los registros de PROMPERU. La Maca ha incrementado en 40% el volumen de exportación/Kg entre los años 2016/2015 y de 30% entre el 2017/2016; siendo el principal mercado Estados Unidos con el 40,6% de la exportación y con un precio relativo de 4,46 dólares USA/kg. En relación a la fibra de alpaca, el principal mercado es China con una exportación que supera en 110% entre los años 2017/2016 y un incremento del 28% en prendas de líneas textiles del hogar (5).

En este estudio se utilizaron ambos productos bandera: la alpaca y la Maca con la finalidad de establecer biotecnologías reproductivas en relación a la crioconservación de células madre de alpaca en presencia de medios crioprotectores suplementados con un suplemento natural como la Maca por su potencial antioxidante.

La alpaca, es una de las principales especies ganaderas de la región altoandina en Perú, con mayor impacto económico debido a la cantidad de cabezas que el Perú posee, distribuidas en mayor proporción en Puno, Cuzco y Huancavelica. El 85% de la población de las alpacas corresponde a la raza Huacaya (con un 95% de color blanco y 05% de colores) y el 15% a la raza Suri, la que actualmente está reduciendo su productividad. La alpaca en Perú posee una alta variabilidad genética, no obstante, la productividad de fibra está disminuyendo anualmente en -2,3%. Existen dificultades en la reproducción como son: un largo tiempo de gestación, dificultades en el manejo de la especie a través de inseminación por las dificultades en la colecta de las muestras de semen debido a su alta viscosidad, lo que aunado a la enterotoxemia de recién nacidos reduce los rebaños peligrosamente (6).

Lepidium meyenii “maca” es recurso natural de los Andes Centrales del Perú con variedades de acuerdo al color de su hipocótilo. La maca posee constituyentes principales como el almidón, fibra dietética y proteínas y componentes menores como

minerales, polisacáridos, polifenoles (flavonolignanos), macaenos, macamidas, glucosinolatos y alcaloides de maca con bioactividades benéficas en la salud reproductiva, antifatiga, antioxidación, neuroprotección, actividad antimicrobiana, anticáncer, hepatoprotección, inmunomodulación y mejora de la salud de la piel y la función del sistema digestivo, sin embargo los mecanismos de acción permanecen en estudio (190). En la espermatogénesis la maca negra está asociada con la promoción de ésta, por otra parte, se ha observado que la maca negra está asociada con la ayuda para la memoria y contra la fatiga, mientras que la maca roja es la variedad que inhibe la hiperplasia benigna de próstata y la osteoporosis inducida experimentalmente (7); (8). Se ha demostrado, que la Maca ejerce el mejoramiento de la movilidad espermática en animales (9), (11), (12) y en humanos (13). Además, se ha demostrado que revierte los efectos dañinos ejercidos por agentes contaminantes como el acetato de plomo (14), mejora la calidad espermática en cuanto a concentración y reduce la fragmentación del ADN en los espermatozoides de animales sometidos a una subfertilidad inducida químicamente con imidazol oral o mediante infertilidad inducida físicamente con campos magnéticos de extremadamente baja frecuencia demostrando su efecto citoprotector sobre la fragmentación del ADN (15). A la Maca como suplemento se le atribuye un efecto antioxidante ejerciendo un efecto benéfico reduciendo el estrés oxidativo (16). En la fracción acuosa de la maca se han encontrado azúcares libres, aminoácidos con alto componente de prolina, uridina, ácido málico y una fracción conteniendo glucosinolatos mientras que en la fase no polar existen macaenos y macamidas (ácidos grasos poliinsaturados y sus correspondientes amidas). En la porción seca, el contenido de macaenos oscila entre 0,09 y 0,45%. Las principales macamidas identificadas son: n-bencil pentadecanamida, n-bencil hexadecanamida, n-(3metoxibencil)-hexadecanamida, n-bencil-hepta decanamida, n-bencil-(9z)-

octadecanamida, n-bencil-9-oxo-(12z)-octodecamida, n-bencil-(9z,12z)octadecadienamida, n-bencil-9-oxo-(12z,15z)-octadecadienamida, n-bencil-13-oxo-(9E,11E)-octadecadienamida, n-bencil-5-oxo-(6E,8E)-octadecadienamida, n-3-metoxibencil-9z-octadecanamida, n-bencil-(15z)-tetracosenamida, metoxi-n-bencil-(9z,12z)-octadecadienamida, n-3-metoxibencil-(9z-12z)-octadecadienamida, n-bencil-(9z,12z,15z) octadecatrienamida, metoxi-n-bencil-(9z,12z,15z)-octadecatrienamida, n-3-metoxibencil-(9z,12z,15z)-octadecatrienamida y la n-benciloctadecanamida. La maca en polvo posee actividad anti-fatiga, y puede aumentar la duración de la movilidad en ratas, en pruebas forzadas de natación ya que atenúa el estrés oxidativo inducido por el ejercicio (16).

Los glucosinolatos corresponden al segundo metabolito secundario más importante en la Maca siendo en su mayoría los glucosinolatos aromáticos. Los hipocótilos de maca contienen seis glucosinolatos: 5-metilsulfenilpentil, 4-hidroxibencil, bencil, 3-metoxibencil, 4-hidroxi-3-indolilmetil y 4-metoxi3-indolilmetil glucosinato, de los cuales el bencil glucosinato representa el 80% del total. Los hipocótilos de maca negra tienen en la cosecha más cantidad ($0,28 \pm 0,01 \text{ mmol/kg}$) de 5-metilsulfenilpentil glucosinato que la maca roja ($0,23 \pm 0,01 \text{ mmol/kg}$) con diferencia significativa ($p\text{value} < 0,05$); no mostrando diferencia significativa ($p\text{value} > 0,05$) en relación a la cantidad total de glucosinato que poseen la maca roja ($34,9 \pm 0,56$) y la maca negra ($31,43 \pm 0,94$) mmol/kg (17). Por otra parte, en ratas tratadas con Maca y sometidas a natación se ha demostrado el efecto antioxidante de la maca sobre las mitocondrias de las células espinales lo que aumenta los niveles de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y glucógeno muscular, así como la mejora evidente en la natación (195). Entre los metabolitos secundarios de la Maca, las macamidas, bencilamidas de ácidos grasos de cadena larga: N- (3-metoxibencil) oleamida (MAC 18: 1), N- (3-

metoxibencil) linoleamida (MAC 18: 2) y N- (3- metoxibencil) linolenamida (MAC 18: 3), han demostrado poseer efectos neuroprotectores in vitro e in vivo en células de glioblastoma MG U-87 en ambientes neurotóxico producidos por cloruro de manganeso ($MnCl_2$), éstos efectos neuroprotectores de la maca fueron revertidos por el antagonista AM251 del receptor canabinoide CB1. El mecanismo neurotóxico del manganeso (Mn) induce un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) incrementando el calcio intracelular e induciendo la permeabilidad mitocondrial, lo que disminuye el potencial de la membrana mitocondrial induciendo la apoptosis temprana) y la necrosis de las neuronas en trastornos neurodegenerativos lo que puede ser revertido por las tres macamidas analizadas. Estos hallazgos sugieren que las macamidas logran sus efectos neuroprotectores a través de los receptores CB1 a través de su asociación a proteína G, protegiendo a las mitocondrias contra la toxicidad inducida por Mn en las células de glioblastoma MG U-87. Estos hallazgos sugieren que las macamidas logran sus efectos neuroprotectores al unirse a los receptores CB1 y ejercen su función neuroprotectora específicamente a nivel mitocondrial (196).

El polisacárido de Maca MC-1 posee arabinosa (26.21%), manosa (11.81%), glucosa (53.66%) y galactosa (8.32%) bajo un ensayo inmunoestimulador se observó que mejoró significativamente la capacidad pinocítica y fagocítica y se promueve la secreción de NO, $TNF-\alpha$ e IL-6 de las células RAW 264.7, demostrando su rol como alimento funcional y promotor de la inmunidad (197). Asimismo se demostró que el polisacárido de Maca MC-2 posee arabinosa (20.9%), manosa (4.5%), glucosa (71.9%) y galactosa (2.7%). Los ensayos inmunoestimulantes indicaron que MC-2 induce la polarización de macrófagos M2 en el fenotipo M1. Además, el receptor 2 de tipo Toll, el receptor 4 de tipo Tll, el receptor 3 del complemento y el receptor de manosa se confirmaron como los receptores de membrana para MC-2 en macrófagos. Estos resultados indican que el MC-

2 posee efecto inmunomodulador y en las terapias de tumores (198). Por otra parte, se conoce que el marcador inflamatorio IL-6 es un predictor de la aparición de efectos negativos en la salud (enfermedades cardiovasculares, deterioro cognitivo y de supervivencia diferencial en género) y durante el envejecimiento (aumento de estrés oxidativo, cambios circulatorios y respuestas inflamatorias) y se ha demostrado que en personas de altura el consumo de Maca está asociado con menores niveles de IL-6 corroborándose que presentan mejores condiciones de salud y aptitud física al ser consumidores de maca que los que no consumen maca (10). Por otro lado se ha demostrado el efecto de la Maca en ratones con subfertilidad químicamente-inducida y físicamente inducidos, que luego de la administración de Maca durante un ciclo del epitelio germinal es activada la movilidad espermática, activando el sistema P450 en ratones inducidos a una infertilidad química; y además se reduce la fragmentación del ADN espermático en ratones con infertilidad físicamente inducidos (15).

Debido a que la maca tiene capacidad para eliminar los radicales libres, y proporcionar citoprotección en condiciones de estrés oxidativo (18), (19) y posee muchos componentes, que aún permanecen en estudio, podría poseer otras propiedades adicionales aún no descritas (20). Por sus efectos benéficos descritos hasta el momento, es importante evaluar su efecto considerándolo como un suplemento de potenciales crioprotectores para la criopreservación ya que la criogenia somete a las células o tejidos a un estrés osmótico y térmico que induce la producción de radicales libres de oxígeno, apoptosis y necrosis celular.

Debido a nuestro interés de conservar a las células madre espermatogoniales de alpaca mediante la criopreservación fue necesario evaluar el efecto antioxidante de la maca en

el medio de congelamiento con la finalidad de mejorar la viabilidad y la competencia de las células postdescongelamiento.

Las células madre se descubrieron inicialmente en embriones preimplantacionales (21), (22), (23), (24), las que al ser transferidas a ratones produjo teratomas evidenciándose su rol proliferativo (25). Se ha descrito la presencia de células madre espermatogoniales (SSC) en varias especies animales como en ratas (26), cerdos (27), (28), perros (29), toros (30), caballos (Dobrinski (31), en primates no humanos (32) y humanos (33), (34) que luego de ser xenotransplantadas a ratones se pone en evidencia la existencia de SSC por su capacidad proliferativa.

En el testículo de mamífero se ha descrito la presencia de SSC que poseen las características de autorrenovación y de diferenciación similar a las características funcionales de las células madre embrionarias (35). Y debido a que las SSC pueden conservar y transmitir información genética a la siguiente generación sería una valiosa herramienta en el manejo biotecnológico de una especie de importancia comercial, como en el caso de las alpacas.

Perú posee la mayor cantidad de alpacas del mundo con una alta diversidad genética, la que fue analizada mediante 10 microsatélites marcadores mostrando un polimorfismo alélico de 144 alelos microsatélites en poblaciones de alpacas de Puno, Junin y Huancavelica obteniéndose una alta diversidad genética y una muy baja pero significativa diferenciación genética entre las poblaciones evaluadas (36). Por otra parte, se analizó la variabilidad genética en poblaciones de alpacas de Arequipa usando 20 marcadores microsatélites; la asociación entre los genotipos de microsatélites y los rasgos de diámetro de la fibra también fueron examinadas en las alpacas de primera esquila. Se evaluaron un total de 230 alelos. La diversidad de genes para cada población varió con una alta diversidad genética, pero con reducida diferenciación genética, en

relación al grosor de la fibra, entre las poblaciones ya que el grosor no mostró diferencias significativas mostrando la homogeneidad entre las poblaciones (37). Estudios adicionales realizados en alpacas de Bolivia han demostrado que existe una alta diversidad genética y baja diferenciación genética entre las poblaciones de alpacas (38).

La criopreservación de SSC en forma aislada o en forma de biopsias testiculares propone, a largo plazo, ser una biotecnología reproductiva con grandes expectativas para conservar el material genético masculino basada en el rescate de las SSC y con el trasplante de éstas se puede restituir la fertilidad y/o conservar la variabilidad genética masculina, a través de la crioconservación de SSC lo que podría sentar las bases de la creación de bancos de SSC para la alpaca peruana generando nuevas alternativas potencialmente útiles que la conservación de la fertilidad masculina (39) en alpacas élite.

Actualmente existen grupos de trabajo dedicados a desarrollar biotecnologías tanto en el aislamiento, en la criopreservación de SSC y en el trasplante de éstas células describiendo los aportes promisorios de las SSC (40). Se ha trabajado extensivamente en humanos (41), murinos (42), en bovinos (43), (44), porcinos (45) y en alpacas (46) donde se ha logrado identificar a las SSC así como las SSC en diferenciación temprana usando marcadores moleculares y con la sonda DBA. Por otro lado, en alpaca se ha estudiado la capacidad proliferativa in vitro de las SSC de alpaca precongelamiento (47) y las ventajas que posee congelar las SSC post cultivo In vitro (48).

Con la finalidad de conservar las células madre espermato goniales se han realizado estudios para evaluar la eficacia de congelar células aisladas y fragmentos de tejido testicular, utilizado agentes crioprotectores (ACP) permeables y no permeables (42), (45); cuyos resultados hasta el momento son especie específico como en Monos (49),

bovinos (50), cerdo (51). Durante la espermatogénesis, existe una apoptosis endógena, que descarta a las células que no están idóneas para producir una línea germinal completa desde la proliferación de las SSC, lo que garantiza la calidad de la producción espermática (52). No obstante durante el congelamiento las células o tejidos experimentan cambios asociados a un estrés osmótico y térmico durante el congelamiento y descongelamiento, lo que induce en las células aisladas o en las células provenientes de tejidos una apoptosis o necrosis celular postdescongelamiento que puede ser regulada por sustancias antioxidantes (53).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación de Maca roja y maca negra en el medio de criopreservación para SSC de alpaca tanto en su forma aislada y/o en forma de fragmentos testiculares utilizando crioprotectores permeables y no permeables con la finalidad de obtener un protocolo para la conservación de las SSC en un potencial medio de criopreservación óptimo, asimismo se diseñaron protocolos de congelamiento lento y descongelamiento para conservar las SSC de alpaca.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION

II.1. Planteamiento del problema

La criopreservación de semen de alpaca presenta limitaciones en la colecta de semen y en la movilidad espermática pre y postdescongelamiento; asimismo la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca presenta las mismas dificultades en relación a una baja movilidad espermática pre y postdescongelamiento por lo que no pueden ser utilizados extensivamente en procesos de inseminación intrauterina tradicional o fecundación in vitro (IVF); a diferencia de lo que si ocurre en otras especies como en bovinos. Lo que hace muy dificultoso utilizar semen o espermatozoides epididimarios en bancos criogénicos de espermatozoides o semen que permitan la conservación de animales elite para el manejo reproductivo de alpacas seleccionadas, mediante inseminación intrauterina o mediante IVF o inseminación intracitoplasmática (ICSI).

Asimismo, la conservación mediante criogenia de células madre espermatogoniales de alpaca mediante fragmentos testiculares o SSC en forma aislada brinda grandes expectativas para la conservación de la fertilidad de animales seleccionados. Hasta el momento no se han descrito protocolos de congelamiento para SSC de alpacas ni en forma de fragmentos ni en forma de SSC aisladas.

Los medios de criopreservación existentes hasta el momento, para la conservación de SSC son especie-específicos, poseen en su composición agentes crioprotectores permeables y no permeables tradicionales los que son citotolerantes a las muestras de SSC aisladas o de fragmentos testiculares; así como protocolos de enfriamiento, congelamiento y descongelamiento, para alpaca éstos no existen por lo que es necesario

establecer los protocolos de criogenia para células aisladas o para fragmentos testiculares de alpaca.

Es por esta razón, que se propuso usar maca negra y roja como suplementos en los crioprotectores de criopreservación, debido a sus efectos antioxidantes descritos previamente que podrían ayudar a prevenir el estrés osmótico y térmico de la criopreservación, así como diseñar un nuevo protocolo de congelamiento con altas tasas de viabilidad postdescongelamiento lo cual servirá para conservar las células madre de la alpaca como un valioso recurso biológico peruano.

II 1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN GENERAL

¿Podrá la Maca roja o negra disminuir parcialmente el efecto del estrés osmótico y térmico experimentado por las SSC durante la criopreservación?

II.1.2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN ESPECÍFICA

1. ¿Será mejor criopreservar células en forma aislada ó en biopsias para conservar las SSC en alpacas?
2. ¿Existirá mayor viabilidad postdescongelamiento con azul de Tripán luego del estrés osmótico y térmico de la criopreservación cuando las SSC y los fragmentos fueron congelados en presencia de maca roja o negra?
3. ¿Será conservado el potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento, en las SSC congeladas en forma aislada o en fragmentos con Maca roja o con maca negra evaluado mediante CF?

II.2 MARCO TEÓRICO

II.2.1 FERTILIDAD MASCULINA CONSERVACIÓN DE LA FERTILIDAD Y CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES (SSC)

La fertilidad masculina en alpacas adultas ha sido estudiada y puede ser afectada debido a causas intrínsecas generadas por causas genéticas, endocrinas o causas externas como la exposición a agentes químicos o agentes físicos (15). Por otro lado, en humanos la actividad laboral, enfermedades infecciosas u oncológicas; entre otras; disminuyen la producción y calidad espermática, incluso la fertilidad la que puede ser afectada desde etapas prepuberales debido a tratamientos en pacientes oncológicos que limitan la futura fertilidad masculina e impiden conservarla debido a la ausencia de espermatozoides a través del congelamiento de semen. Incluso se ha descrito que se garantiza la fertilidad masculina en el adulto cuando existe un balance entre la tasa de autorrenovación de las SSC y la tasa de diferenciación celular de éstas (190), por lo que congelar SSC toma una gran importancia como el reservorio de la fertilidad masculina. En machos de alpaca adulta, se ha logrado establecer que existen SSC (46) y que al evaluar los espermatozoides producidos en el semen o en espermatozoides obtenidos de conducto deferente o epididimario se están analizando algunos parámetros espermáticos relacionados con la fertilidad masculina asociados al potencial fecundante. Entre los parámetros estudiados, se ha determinado la calidad de espermatozoides analizando la función de la membrana plasmática a través del test hiposmótico (54) y de la morfometría de la cabeza de los espermatozoides (55). La fertilidad masculina en alpacas significa la capacidad que tiene un macho de producir una cría luego de un empadre, la que puede disminuir si se da un empadre continuado ya que en cada monta se transfieren espermatozoides a la hembra los que son los que le confieren la capacidad fértil al macho.

Por lo que es necesario evaluar los parámetros espermáticos de viabilidad, morfología, movilidad y capacidad de interactuar con la zona pelúcida. Se analizó la función de la membrana plasmática de los espermatozoides de alpaca los que mostraron una mejor actividad a 150 mOsm/kg de citrato tribásico trihidratado de sodio y Fructosa, la que es estable desde los 15 minutos de exposición (60%) (54). Asimismo, el estudio de la morfometría espermática en los espermatozoides de alpacas fértiles, basada en criterios estrictos de Kruger logró determinar que el porcentaje de espermatozoides con cabeza normal en alpacas fértiles llega a un promedio de $48.6\% \pm 3.4$ (55). Por otra parte, en alpacas se ha observado el efecto del fluido folicular en la movilidad espermática (56) y la capacidad de los espermatozoides de alpaca a unirse a la zona pelúcida en presencia ó ausencia de fluido folicular el cual induce significativamente la movilidad y capacitación espermática así como la reacción del acrosoma (57) y la capacidad de unión a la zona pelúcida homóloga incrementándose (Media $\pm$ SD= $2,7 \pm 2,9$) en relación al control (Media $\pm$ SD= $1,7 \pm 1,88$) mostrándose diferencia significativa ($p < 0,05$) con los espermatozoides capacitados en ausencia de fluido folicular homólogo (58). Por otra parte, con la finalidad de conservar espermatozoides de alpaca mediante criogenia de espermatozoides epididimarios provenientes de camal. En los que se evaluó el efecto de crioprotectores en base a TRIS, TES y leche descremada observándose que existe diferencia significativa ($p\text{value} < 0,05$) en la conservación de espermatozoides de alpaca cuando el crioprotector posee leche descremada, sin observar mayores beneficios; ya que el porcentaje de movilidad postdescongelamiento es de $17.0\% \pm 4.3$, con una integridad de membrana plasmática de $17.9\% \pm 5.5$ y una relación de viabilidad e integridad acrosomal de $27.2\% \pm 13.5$ (59). Por otra parte, la criogenia puede inducir efectos adversos o inducir un suceso prematuro como ocurre en el espermatozoide de alpaca en que se observa una capacitación prematura posdescongelamiento de espermatozoides

(60). Asimismo, dos análogos de superóxido dismutasa (Tempo y Tempol) al crioprotector de criopreservación para el semen de alpaca conteniendo leche-yema de huevo y fructosa observándose que el porcentaje de movilidad espermática fue de $11,2\% \pm 3,8$, en el crioprotector suplementado con Tempo fue de $19,7\% \pm 2,29$ y suplementado con Tempol fue de $22,1\% \pm 3,06$. La fragmentación del ADN fue menor en el grupo Tempol (16.7%) que en el control (38.8%) con diferencias significativas ($p\text{value} < 0,05$), por lo que estos análogos de superóxido dismutasa podrían mejorar la calidad postdescongelamiento al estar presentes en el medio crioprotector (61). De forma semejante el medio TEST-TRIS-YOLK suplementado con agentes crioprotectores permeables como 0.18M, 0.375M, 0.75M de Dimetil acetamida (DMA) y 0.125M, 0.250M, 0.500M de Dimetilsulfóxido (DMSO) en relación a 0,6M de Glicerol observándose diferencias significativas en presencia de DMA 0.375M con los porcentajes más altos de movilidad espermática ($34,4\% \pm 1,4$), de viabilidad ($60,9\% \pm 4,0$) y de membrana plasmática espermática íntegra y funcional ($64,4\% \pm 1,7$) postdescongelamiento, en relación al glicerol ($p\text{value} < 0,05$) (62).

La crioconservación de espermatozoides de alpacas aún presenta limitaciones para conseguir un protocolo adecuado que asegure la calidad de los espermatozoides de alpaca postdescongelamiento, lo que aunado a una reducida capacidad para obtener muestras de semen de forma repetitiva y de buena calidad lo que asociada a una alta viscosidad del semen hacen dificultosa la creación de bancos criogénicos de semen de alpaca, lo que si es posible en otras especies por lo que el manejo biotecnológico reproductivo de la alpaca aún está en estudio. No obstante, en el testículo se encuentran las SSC que pueden ser conservadas a través de la criopreservación a bajas temperaturas en bancos criogénicos de células madre y de esta forma conservar la fertilidad masculina (63). Durante la espermatogénesis, en un animal adulto, se han descrito tres tipos de

espermátogonias: la SSC, la espermátogonia en proliferación y la espermátogonia en diferenciación (64). Las SSC son células madre adultas localizadas en el túbulo seminífero y poseen la capacidad de autorenovarse como otra célula madre, diferenciarse e iniciar la meiosis y citodiferenciación a espermatozoide o pueden iniciar la apoptosis celular (65). Recientemente, se ha descrito con una sonda fluorescente DBA por CF, la presencia de las SSC en alpacas adultas identificadas como “*strongly DBA positive*” (sDBA⁺), las células que han iniciado la citodiferenciación temprana como “*weakly positive DBA*” (wDBA⁺) y células redondas diferenciadas como *DBA negative* (DBA⁻) (46).

Las SSC están presentes en cantidad reducida en los túbulos seminíferos de animales adultos. Se estima que, en el ratón adulto, solo el 0,03% de la población de células corresponde a SSC en relación a las que se encuentran en proceso de citodiferenciación (66), (67), siendo el balance entre la autorrenovación de las SSC y la diferenciación de éstas lo que garantiza la fertilidad masculina (68). Se han evaluado marcadores moleculares que se expresan con mayor proporción en las células madre espermátogoniales (69) tanto a nivel de la superficie celular como integrina β -1 (70), (71), a nivel intracitoplasmático (entre los que se encuentra a Zbtb16 y Ngn3). PLZF también conocido como ZBTB16 o ZFP145 es un represor transcripcional que se une al ADN a través de sus dominios de dedos de zinc tipo Kruppel, se expresa específicamente en las espermátogonias no diferenciadas (46, 67). El mecanismo exacto por el cual PLZF promueve la autorrenovación de las SSC no se ha dilucidado completamente, se ha observado que regula muchos genes que codifican factores de transcripción y proteínas de unión a ARN, lo que aumenta la posibilidad de que el PLZF sea un regulador maestro en la parte superior de una jerarquía de proteínas reguladoras transcripcionales / postranscripcionales en SSC (146). PLZF reprime la transcripción de c-Kit, gen que

promueve la diferenciación espermatogonial inhibiendo la autorenovación. PLZF opera en un circuito molecular que amplifica la capacidad de respuesta a las señales de GDNF como un medio para mantener los SSC (147, 148). Ngn3 se expresa en un subconjunto de espermatogonias que inician la diferenciación, es regulada negativamente al factor GDNF responsable del mantenimiento de las SSC, impulsando la diferenciación de SSC. La Ngn3 está regulado positivamente por todos los factores de transcripción (STAT3, SOX3, SOHLH1 y SOHLH2) que promueven la diferenciación de SSC (150) y es regulado negativamente por GDNF, factor de mantenimiento de las SSC (149). Por otra parte, se ha logrado identificar a Integrina $\beta 1$ como marcador molecular específico en la superficie de las SSC de ratón que al ser transferidas produjeron espermatogénesis completa demostrando su función biológica como SSC (70). Asimismo la presencia de integrina $\beta 1$ está relacionada con el reconocimiento del nicho “*homing*” de las SSC en el testículo (191).

Zbtb16 es conservado y junto con integrina $\beta 1$ están descritos como marcadores de autorrenovación en SSC de alpacas (46) y NgN3 es considerado como uno de los primeros marcadores en células diferenciadas (72), (73). Los marcadores de autorrenovación están presentes cuando las SSC están auto renovándose y se conservan como SSC observada en felinos domésticos (67), mono Rhesus (74), humanos y en ratones (75). Luego de un cultivo *in vitro* de células espermatogoniales aisladas proveniente de alpacas adultas, se evidenció, mediante PCR la expresión de Integrina $\beta 1$ y PLZF (46).

II.2.2 MACA *Lepidium meyenii* COMO POTENCIAL ANTIOXIDANTE NATURAL EN LA CRIOGENIA DE SSC:

La Maca (*Lepidium meyenii* walp) es una planta de la familia Brassicaceae que habita la región altoandina de nuestro país, desde aproximadamente 2000 años, a 4000 msnm, cuyo uso tradicional es como alimento y a la cual se le atribuye un rol medicinal (76). Tradicionalmente y científicamente, se demostrado que el consumo de maca o de sus componentes mejora la capacidad reproductiva así como en el comportamiento sexual masculino; es decir, mejora el libido, la disfunción eréctil cuando se administra un extracto lipídico de maca a ratas macho con disfunción eréctil animales (12), (77), como en humanos (78).

La maca negra es la que posee mejores resultados sobre la espermatogénesis, la memoria y contra la fatiga, mientras que la maca roja revierte la hiperplasia benigna de próstata y la osteoporosis inducida experimentalmente en ratas (80) y ayuda en la salud humana (81). Por otro lado, la Maca reduce la fragmentación del ADN espermático en animales con subfertilidad química inducida (15) en tratamientos de largo tiempo se ha observado que la maca negra produce un incremento de la producción diaria de espermatozoides e incrementa la movilidad espermática. En cambio, la maca roja, no influye en el número de espermatozoides producidos diariamente ni en la movilidad espermática, pero si induce una reducción en la próstata. Estos hallazgos indican una diferencia en la respuesta biológica de los ecotipos de maca (82) asimismo se le atribuyen efectos energizantes antiestrés y posee una capacidad para eliminar los radicales libres, y proporcionar citoprotección en condiciones de estrés oxidativo (19), (18), (83).

Mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis bioquímico se ha identificado que en la raíz de maca existen proteínas, lípidos, hidratos de carbono, así como ácidos grasos insaturados y minerales. Adicionalmente se han encontrado metabolitos de acuerdo a la coloración del hipocótilo y al lugar de procedencia de la maca entre los que destaca la Sucrosa por su elevado contenido (84). Con la finalidad de entender la diferencia biológica en la respuesta a los hipocótilos de maca de diferente color se conocen algunas de sus propiedades como antioxidantes (19) y como citoprotector natural (14), (85) y presencia de Sucrosa (84), (178), podría ser utilizado como un suplemento en los medios de criopreservación para células o tejidos con la finalidad de fortalecer, nutrir y proteger a las células del estrés osmótico y térmico al cual se enfrentan durante el proceso de congelamiento y descongelamiento. Por sus componentes y propiedades antioxidantes, la maca se vuelve un buen candidato potencial para la suplementación de un crioprotector eficaz para células madre espermatogoniales de alpaca.

II.2.3 CRIOPRESERVACIÓN DE TEJIDO TESTICULAR:

La criopreservación de tejido testicular posee un rol promisorio en la infertilidad masculina (86), (87), ya que a partir de las biopsias testiculares se puede conservar tanto espermatozoides como SSC. En humanos, se han utilizado espermatozoides provenientes de biopsias testiculares postdescongelamiento para producir embriones, por ICSI (Inseminación intracitoplasmática de un espermatozoide) sin incrementar las tasas de aborto (88). Asimismo, se ha observado que al transferir SSC de ratón, que permanecieron congeladas durante 5 meses a -196°C, desarrollaron espermatogénesis completa en el ratón transplantado (95) y al transferir SSC de ratón que permanecieron

congeladas durante 14 años a -196°C nacen crías vivas en el ratón transplantado (192) lo cual demuestra la competencia de las SSC descongeladas después de permanecer durante largos periodos de tiempo (155), a -196°C en nitrógeno líquido. Asimismo, se ha desarrollado un protocolo de congelamiento de SSC en bovino (98) y en alpacas (157). El banco criogénico de SSC facilitaría la conservación de material genético que le permitiría usar las biopsias descongeladas en un trasplante de células madre espermato goniales incluso podrían ser usadas para una proliferación y diferenciación celular In vitro lo que brindaría expectativas alentadoras a pacientes oncológicos posterior al tratamiento así como se ha realizado en porcino (51) y bovino (50) y pueden ser aplicados en animales élite. Cuando estas tecnologías de conservar tejido testicular o SSC aisladas congeladas brinda innumerables posibilidades cuando las SSC provienen de los que pueden ser transferidos a animales de baja calidad reproductiva, a los que se ha silenciado su línea germinal masculina endógena, para finalmente transferir las SSC de animales elite con alto valor económico, como ocurre con las alpacas en el Perú.

Los avances en la criopreservación de tejidos, así como el trasplante de células germinales y de biopsias testiculares abren nuevos horizontes en la preservación de la fertilidad masculina (89), (90) ofreciendo alternativas a pacientes que se enfrentan a tratamientos oncológicos que afectan su fertilidad en la etapa infantil ya que no es posible conservar espermatozoides en esta etapa, por lo que crioconservar biopsias testiculares (91) puede ayudar a los infantes que siguen tratamientos de quimioterapia y/o radioterapia para un posterior trasplante y conservar su fertilidad futura (92), aun esta estrategia está en etapa experimental en humanos así como en animales y en continua investigación (93). Se analizó el efecto del congelamiento y descongelamiento sobre el diámetro de los túbulos seminíferos observándose que luego de la criogenia existe un daño notable a las células de Sertoli a las espermato gonias y a los espermato citos, en

cambio en las espermatidas redondas, espermatides alargadas y en los espermatozoides mostraron un leve daño pero en su mayoría estas células mantuvieron su estructura normal (94).

II.2.4 CRIOPRESERVACIÓN DE SUSPENSIONES DE CÉLULAS ESPERMATOGONIALES AISLADAS:

Una alternativa al congelamiento de biopsias o fragmentos testiculares ha sido desarrollada en células madre espermátogoniales en forma aislada, con la finalidad de obtener un protocolo óptimo para crioconservar estas células y usarlas posteriormente en un trasplante; se han realizado investigaciones que demuestran la viabilidad del 40% de las células espermátogoniales posdescongelamiento (95) y algunas investigaciones describen una viabilidad en las células aisladas que oscila entre 66 y 87% en humanos y murinos (40), (89) (96) y en bovino el 70% siendo capaz de proliferar *In vitro* (97), demostrando que son funcionales y capaces de colonizar los testículos en un xenotrasplante. Esta evidencia demuestra que en un animal adulto las SSC pueden ser criopreservadas y luego del descongelamiento son capaces de recuperar su capacidad funcional completa (95), (98) (192). Demostrando que bajas tasas de viabilidad son suficientes para el uso de SSC postdescongelamiento.

II.2.5 CRIODAÑO POR APOPTOSIS Y NECROSIS EN CÉLULAS MADRE ESPERMATOGONIALES DURANTE LA CRIOPRESERVACIÓN.

Durante la criopreservación, las células o tejidos atraviesan por un estrés osmótico y térmico, pudiendo ser afectada drásticamente hasta llegar a la apoptosis y a la necrosis (99). El agua es una de las principales moléculas existente en las células y es la que pone

en riesgo a las células durante la criopreservación, durante el cambio de estado de ésta, pasando durante la criopreservación del estado líquido al estado sólido, lo que conlleva como consecuencia un aumento en su volumen lo cual ocurre durante el congelamiento y a su vez es imprescindible la restitución del agua en la célula durante el descongelamiento (Fig. N°1). El uso de Agentes crioprotectores (ACP) ha permitido la remoción del agua intracelular permitiendo la citoprotección de las células pero que en altas concentraciones puede ser tóxica para las células induciendo muerte, apoptosis celular y necrosis (100). Por lo que es imprescindible someter a las células o tejidos a un periodo precongelamiento a baja temperatura 4°C denominado periodo de equilibrio desde la exposición inicial de la muestra a los CPA lo que representa el segundo paso en el proceso de criopreservación que introduce una diversidad de agentes penetrantes (permeables a la membrana) y no penetrantes contenidos dentro de un medio crioprotector de incubación de células denominado cóctel crioprotector con una duración entre 10–60 minutos a 4 °C , lo cual es clave para el equilibrio del ACP y la remoción del agua desde el interior de la célula estabilizando las membranas plasmáticas y previniendo la formación de cristales de hielo en el interior de las células (193, 194).

Como consecuencia el proceso de congelamiento y descongelamiento puede inducir daños irreversibles, denominado criodañó, pudiendo llegar incluso a la apoptosis y muerte celular. Se observa, un aumento significativo en algunos marcadores de apoptosis, después del proceso de congelamiento/descongelamiento, entre los que se encuentra la alteración en el potencial de membrana mitocondrial, la activación de Caspasas, la fragmentación del ADN (101); sin embargo, los protocolos óptimos de criopreservación pueden minimizar la inducción de apoptosis celular. Incluso, se ha podido observar que luego del descongelamiento se observa necrosis celular y que luego del cultivo de células postdescongelamiento se observa la activación de Caspasa 3 lo que

induce la apoptosis, cuando han sido congeladas con protocolos de congelamiento lento (102).

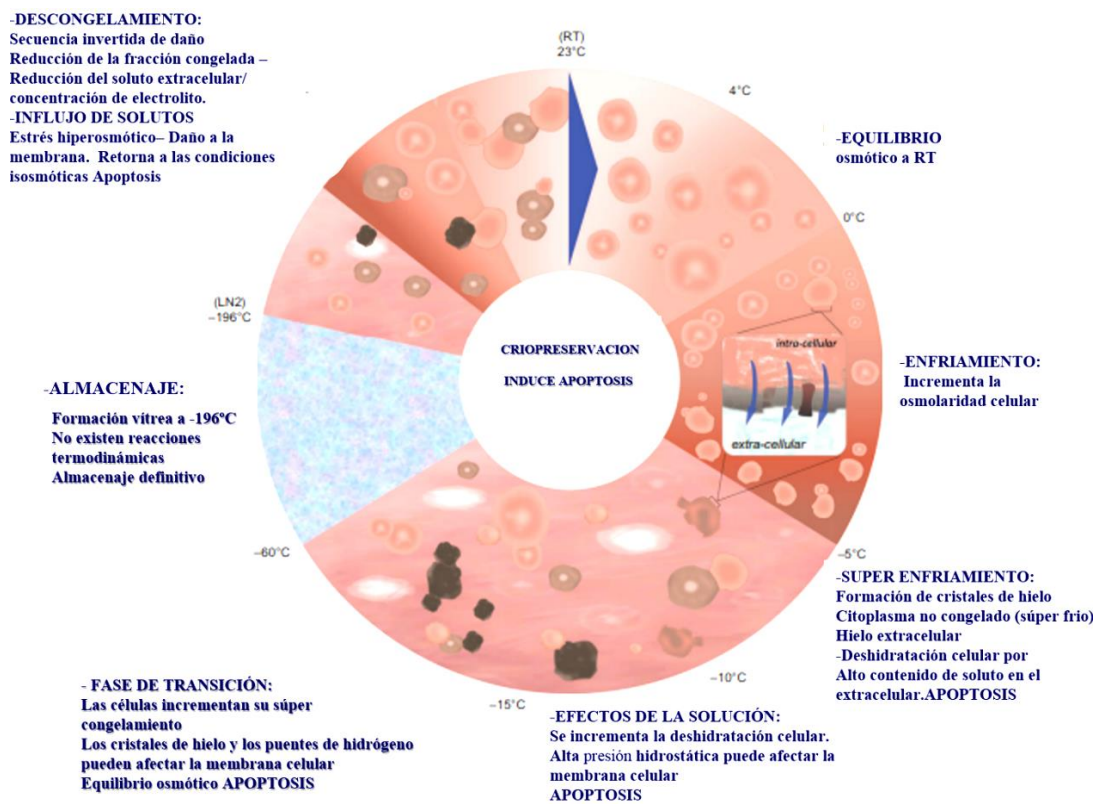


Fig. N° 1. La criopreservación induce la apoptosis celular (101).

Debido al estrés osmótico y térmico que experimenta la célula o el tejido durante el proceso de ajuste a un protocolo idóneo para criopreservar las células se puede inducir un proceso de apoptosis temprana y de necrosis celular (103). La muerte celular programada es un proceso denominado apoptosis celular, es regulado a través de dos vías, la vía intrínseca o también llamada vía mitocondrial y la vía extrínseca o también llamada vía de receptores-ligandos; durante la primera vía participa la cisteína proteasa (caspasa) 9 y APAF forman el apoptosoma, así como proteínas de la familia Bcl-2 que determinan la salida del citocromo c de la mitocondria entre otras proteínas. Mientras, que en la vía extrínseca participa la caspasa-8, receptores de muerte como Fas (CD95/Apo-1) o TNF-1 (TNFR1, Tumor Necrosis Factor Receptor 1), entre otros

(Figura 2). Ambas vías convergen en la activación de la caspasa ejecutora, caspasa-3 (104).

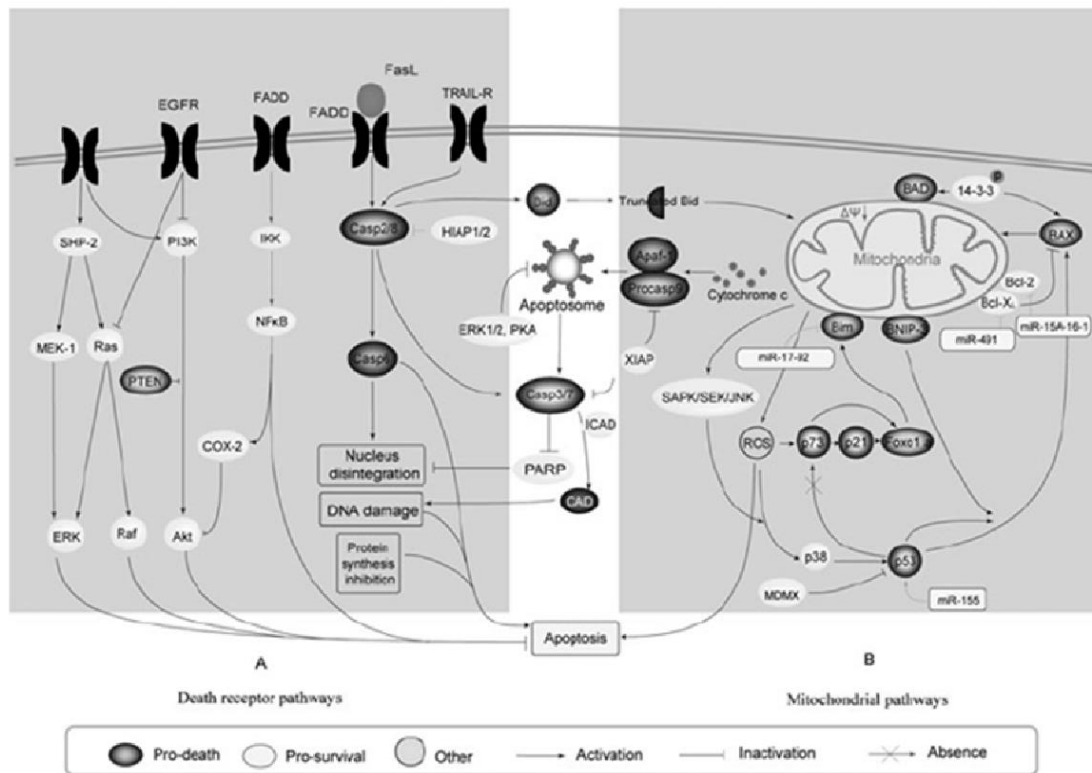


Fig. N°2: Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis celular (104).

Durante el proceso de criopreservación y descongelamiento de células madre se ha observado que la viabilidad celular disminuye significativamente cuando son evaluadas con el colorante vital azul de Tripán (105). Por otro lado, se encontró una relación directa en la criopreservación de células madre y la apoptosis temprana, evaluadas por un aumento de la activación de caspasas-3,8 y 9, además de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la translocación de la proteína p53(106).

La función mitocondrial (107) es un buen marcador de viabilidad y también de estrés celular ya que esta organela funciona ejerciendo un balance energético celular y posee

varios estados; cuando las células poseen membrana plasmática intacta y alto potencial de membrana mitocondrial (célula viable), cuando la célula posee membrana plasmática intacta pero disminuye su potencial mitocondrial (apoptosis temprana) y se denomina necrosis, cuando la membrana plasmática está deteriorada y rota, donde no existe potencial de membrana mitocondrial (108). Durante la respiración mitocondrial, la energía celular es almacenada como un gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial, se acumula energía en células vivas y saludables creando un potencial transmembrana que permite a las células dirigir la síntesis de ATP. La pérdida del potencial de transmembrana mitocondrial (109) interno es frecuentemente asociada con estados tempranos de apoptosis celular (110), (111) y puede ser usada como biomarcador de estrés oxidativo (65). Existen varios factores que pueden regular la apoptosis mediada por la actividad mitocondrial. Uno de los procedimientos que puede inducir estrés y daño celular es durante la criopreservación lo que induce un deterioro en el potencial de membrana mitocondrial (112), induciendo apoptosis celular. En muestras descongeladas podríamos obtener muestras celulares intactas, con apoptosis temprana y en necrosis, lo cual solo puede ser determinado con diferentes técnicas como citometría de flujo (113), inmunofluorescencia (114), western blot (115), mediante caracterización molecular (116), (117) mediante la evaluación de la fragmentación del ADN mediante TUNEL (118).

Una forma de determinar el potencial mitocondrial, apoptosis temprana, apoptosis y necrosis en las células postdescongelamiento es a través de citometría de flujo (CF) mediante el uso del Kit de Millipore FlowCollect™ MitoPotential Red incluye dos sondas fluorescentes siendo uno de ellas, el MitoSense agente químico denominado 1,1', 3,3,3',3'-Hexametilindodicarbocianina yoduro), un colorante catiónico fluorescente

que se acumula en las mitocondrias y es sensible a los cambios en el potencial de membrana mitocondrial (109) y la sonda 7-AAD (Aminoactinomicina D) la cual puede determinar indirectamente la viabilidad celular ya que este colorante (7AAD) no se intercala en el ADN celular cuando las membranas son impermeables e intactas (vivas, en apoptosis temprana) y solo puede unirse al ADN de las células en necrosis cuando las células ya han experimentado la ruptura de la membrana celular y nuclear dejando que el 7AAD se una al ADN (113) que identifica a las células en necrosis.

II.2.6 *Dolichos biflorus* agglutinin (DBA), MITOSENSE Y 7AAD:

Dolichos biflorus agglutinin conocida como DBA es una lectina específica que reconoce a los residuos glicoconjugados terminales α -N- acetilgalactosamina (GalNAc) altamente reactivos en la superficie de las membranas plasmáticas de las SSC. Se ha evaluado a las SSCs de bovino (97), felinos (119), ratones (120), cerdos (121) de forma exitosa exitosamente, que ha sido corroborado con marcadores moleculares (73) (122), para células madre como NANOG y SSEA-1 (123). Así como en SSC de alpaca la sonda DBA ha sido asociada a marcadores moleculares como Integrina β 1 y PLZF para SSC y NgN3 para SSC en diferenciación temprana (46).

Los epítomos de glicanos disminuyen rápidamente en las células que experimentan una diferenciación temprana, por lo tanto la pérdida de epítomos de GalNAc, es el cambio inicial que ocurre en la superficie celular que se evidencia en las células que se diferencian, como una diferenciación temprana y es el único marcador de superficie celular que está estrechamente asociado con el estado pluripotente (120). La lectina DBA es, por lo tanto, una herramienta útil para caracterizarlas como un indicador de compromiso de diferenciación y un predictor de pluripotencia durante el desarrollo,

demostrándose que posee una gran utilidad en el reconocimiento y la caracterización de las células madre espermatogoniales aisladas, así como en la evaluación de su presencia en las colonias de SSC evidenciando de manera eficiente a las SSC con un marcador no destructivo. Asimismo se ha usado a DBA como una herramienta para discriminar a las SSC, las células que están en diferenciación temprana y las células diferenciadas en el testículo de alpacas adultas lo que facilita su uso y monitoreo en procedimientos como cultivo celular y criopreservación de células espermatogoniales entre las que se encuentra las SSCs (47), (124).

II.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En el Perú, de acuerdo a la declaración simplificada de exportación en el sector textil se ha observado un incremento en los dos primeros meses del año 2018 el que asciende a US\$ 203 millones, siendo US\$ 21 millones mayor con respecto al mismo periodo del año anterior. La demanda del mercado ha solicitado el pelo fino cardado de Alpaca lo que llega a US\$ 13 millones reflejando un aumento del 47,5% en relación al año anterior (125).

La criopreservación de espermatozoides de alpaca, no ha sido utilizada extensivamente debido a sus limitaciones en la colecta de semen, asimismo la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca presenta dificultades en relación a una baja movilidad espermática postdescongelamiento. Debido a estas limitaciones, nosotros proponemos la conservación del material genético testicular destacando la crioconservación de las SSC para su uso posterior.

El aislamiento, caracterización, cultivo y trasplante de las SSC son herramientas que permitirán mejorar la eficiencia de la producción ganadera. Este tipo de tecnología permitirá la inmortalización y/o transferencia de líneas germinales de alpacas macho con características genéticas deseables, como buena fibra, expandiendo su disponibilidad y haciendo más accesible este recurso y finalmente, comercial, para beneficio de las comunidades que apoyan su economía en la alpaca.

El uso de biotecnologías reproductivas como la criogenia permitiría el rescate y la conservación de material genético masculino no solo en espermatozoides que tiene una vida limitada al tiempo de fertilidad del animal del cual provienen; sino también en el rescate y la conservación de células madre testiculares proveniente de machos de alpaca

de buena fibra y fertilidad probada, cuyas células pueden ser conservadas por largo tiempo, proliferadas *in vitro* y transplantadas a animales sin línea endógena para que pueda permanecer la genética del animal del cual proceden las SSC.

Por otra parte, trabajar en la conservación de SSC y aportar al conocimiento en el aislamiento, proliferación, conservación criogénica de SSC aisladas o en forma de fragmentos testiculares puede ayudar al desarrollo y la aplicación de esta tecnología en pacientes oncológicos e incluso en niños que aún no poseen espermatogénesis completa y carecen de espermatozoides, cuyo trasplante puede mantener su fertilidad futura para lo cual es necesario continuar investigando con la finalidad de optimizar los protocolos de criopreservación para SSC. Hasta el momento se conocen protocolos para la criopreservación de SSC de ratón, bovino, cerdo y humano. Los medios de criopreservación, los tipos de muestras (Fragmentos o células aisladas), los protocolos de enfriamiento y congelamiento son especie específicos, sin resultados extrapolables para las SSC de alpacas; es por esta razón que se propuso congelar SSC en fragmentos y en forma de SSC aisladas evaluando el efecto de maca roja y negra como un suplemento en el crioprotector de Criopreservación, así como diseñar un nuevo protocolo de congelamiento con altas tasas de viabilidad postdescongelamiento lo cual serviría para conservar las células madre de la alpaca como un valioso recurso biológico peruano.

Razón por lo cual, hemos evaluado un panel de agentes crioprotectores (ACP) permeables y no permeables asociados a un suplemento natural, con función antioxidante, como la maca negra y maca roja, asociados a un enfriamiento, congelamiento y descongelamiento. Verificando postdescongelamiento la viabilidad celular. Por otra parte, mediante citometría de flujo, se describe el número de sDBA+,

wDBA+ y DBA- con la reactividad a la sonda DBA y con el Kit Flow Collect Mitopotential Red que posee dos sondas: Mitosense y 7AAD; determinan la conservación del potencial de membrana mitocondrial describiendo células como sMitosense+ (con potencial mitocondrial intacto); wMitosense+ (con disminución del potencial mitocondrial o en apoptosis temprana), sin potencial mitocondrial pero negativa a 7AAD (Apoptosis) y células 7AAD+ (en Necrosis).

Esta nueva metodología de SSC congeladas propondría una alternativa al manejo reproductivo tradicional de la alpaca ya que potencialmente podría usarse para la creación de bancos de SSC y potencialmente podría usarse en el trasplante y/o extensión de la fertilidad, así como la diferenciación In vitro de espermatozoides, a partir de SSC congeladas provenientes de alpacas élite de alto valor genético, lo cual impactaría positivamente en la producción y la exportación de la fibra de la alpaca peruana.

II.4 OBJETIVOS E HIPOTESIS

II.4.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto de la suplementación de Maca roja y Maca negra JUVENS en la criopreservación de fragmentos testiculares y SSC aisladas determinando la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial en las SSC postdescongelamiento en alpaca *Vicugna pacos*

II.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la presencia de SSC con marcadores moleculares y con DBA mediante CF en muestras testiculares de alpacas adultas.
2. Diseñar sistemas de criopreservación para fragmentos y SSC aisladas proveniente de alpacas adultas usando como suplemento natural a maca negra y roja Juvens.
3. Evaluar y comparar el potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en SSC descongeladas provenientes de fragmentos y SSC aisladas postdescongelamiento mediante CF.

II.4.3 HIPÓTESIS

El suplemento de Maca en el medio crioprotector conserva la viabilidad de las SSC de alpaca postdescongelamiento dependiendo de la propiedad antioxidante que posee.

III. METODOLOGÍA

III.1 DISEÑO DEL ESTUDIO

Es un estudio de investigación experimental donde se evalúa la presencia de SSC en el testículo de machos adultos de alpaca mediante el uso de marcadores moleculares mediante PCR, con la sonda (DBA) usada en la identificación de SSC mediante CF en muestras frescas. Asimismo, se evaluó el efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja y de maca negra atomizada comercial de la marca JUVENS que corresponden al mismo tipo de Maca descritos en su composición anteriormente (178) y usados como suplemento en los medios de criopreservación de este trabajo de investigación. Las muestras fueron congeladas en forma de fragmentos así como en forma aislada en suspensión. Por otro lado, se diseñaron los protocolos de congelamiento para fragmentos y para células aisladas, asimismo se comparó la viabilidad celular postdescongelamiento usando azul de Tripán. Por otra parte, se determinó la presencia de SSC y el cambio del potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento.

Adicionalmente, muestras descongeladas en forma aislada en medio MSON fueron cultivadas postdescongelamiento para evaluar su capacidad proliferativa y de diferenciación *In vitro*.

El procedimiento del trabajo siguió la siguiente secuencia:

- 1) Análisis molecular para la identificación de células madre con marcadores moleculares específicos mediante PCR,
- 2) Criogenia termocontrolada para fragmentos o para SSC aisladas usando el software Cryogenesis IV.

- 3) Determinación del potencial de membrana mitocondrial, apoptosis temprana, apoptosis y necrosis en las muestras postdescongelamiento fueron analizadas mediante CF con la lectina FITC-DBA (revela a las células madre) asociado al Kit Flow CollectTM Mitopotential Red (revela células saludables con alto potencial de membrana mitocondrial, con bajo potencial de membrana mitocondrial (células en Apoptosis temprana), con nulo potencial mitocondrial y negativas a 7AAD (células en Apoptosis) y 7AAD+ (Células en necrosis) mediante CF.
- 4) Cultivo de células postdescongelamiento para evaluar su capacidad proliferativa y de diferenciación analizadas mediante CF.

III.2 POBLACIÓN

En este estudio se usaron muestras provenientes de 47 animales (Tabla N°2). Las muestras frescas para las pruebas de viabilidad celular precongelamiento, cultivo de muestras para PCR con marcadores moleculares para SSC, en la determinación de SSC con la sonda DBA mediante CF y se analizó la viabilidad de los suplementos de Maca roja y maca negra comercial atomizada JUVENS cuyos componentes principales son descritos (Anexo 18) y la composición de la Maca roja y negra fue estudiada mediante resonancia magnética nuclear por el Círculo de Investigación de Plantas con Efecto en la Salud, (Grant no. 010-2014-FONDECYT) (Anexo 19). Por otra parte, se congelaron muestras en forma de fragmentos y suspensiones celulares de células espermatogoniales en los 18 medios analizados. En las muestras postdescongelamiento se evaluó la viabilidad con azul de Tripán, se determinó la presencia de SSC y el potencial de actividad mitocondrial. En la tabla N°2 se resume lo realizado.

III.3 MUESTRA

Muestra biológica. El moderno Camal Municipal de Huancavelica cuenta con un sistema de bioseguridad certificado por SENASA donde recibe alpacas que provienen de crianza familiar y de centros pablados de las zonas de Lacchoc, Cachimayo, Huaracco y Carhuanchu. Las características fenotípicas de alpaca y la edad fueron evaluadas por veterinarios-zootecnistas del Grupo de Investigación del Dr. Jaime Ruiz de la Universidad Nacional de Huancavelica. Está ubicado en la localidad de Chuñuranra, a 3,680 msnm, a unos 15 minutos de la ciudad de Huancavelica. A este lugar llegan alpacas casi exclusivamente del fenotipo Huacaya, entre machos jóvenes, machos adultos, capones y hembras. Diariamente son sacrificadas entre 80 y 100 alpacas. Estos animales están alimentados bajo condiciones de campo o pastoreo natural, expuestos a la luz natural durante el día, a una temperatura ambiental promedio de 6 a 8°C, precipitación pluvial anual promedio entre 400 a 700 mm y a una altitud entre 4,000 a 4,600 msnm. Los animales suben a la plataforma y el personal técnico del Camal realiza el puntillazo en la médula espinal, a la altura de la nuca, quedando el animal inmovilizado. Seguidamente, las degollan, desangran y luego los cuelgan boca abajo para proceder a retirar la piel y luego las vísceras. Es en este momento en que se procede a muestrear los testículos, que inmediatamente son lavados con PBS, decapsulados y colocados en una caja isotérmica provista de hielo en gel para su transporte hasta el laboratorio. Se usaron testículos provenientes de 47 animales, se detallan en el Anexo N°1, con los cuales se realizaron las evaluaciones que se detalla en la Tabla N°2.

Tabla N°2. Muestras utilizadas en el estudio

N° de muestras analizadas para la determinación de la:	Tipo de muestra	
	FRAGMENTOS	CELULAS AISLADAS
Viabilidad de muestras frescas pre congelamiento (azul de tripán)		47*
Evaluación de marcadores moleculares de SSC en muestras frescas cultivadas		6*
Viabilidad de muestras frescas postdescongelamiento (azul de tripán)	44*	32**
Determinación de SSC precongelamiento con DBA mediante CF		24*
Determinación de SSC y potencial mitocondrial postdescongelamiento mediante CF	8*	8**
Determinación de la capacidad proliferativa y diferenciación postdescongelamiento mediante CF		3**

N° de muestras evaluadas (n=172)

(*) (**) Símbolos iguales corresponden a muestras del mismo animal.

III.3.1 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

El personal técnico del Camal realiza la inspección sanitaria antes y después del sacrificio. Las características fenotípicas de alpaca clínicamente sanas (126), (127). Asimismo, la clasificación en Huacaya, cuando los animales presentaban fibras perpendicularmente a la superficie del cuerpo (sin fibras uniformes en grosor en un mismo animal) y Suri (con fibra espiralada formando rulos que caen paralelamente a ambos lados del cuerpo con fibra uniforme y fina) (128), (129, 130). La edad y la salud reproductiva de las alpacas macho (131) fueron evaluadas por veterinarios-zootecnistas de la Universidad Nacional de Huancavelica. Se seleccionaron machos Huacaya adultos para la colecta de testículos y epidídimos considerándose como macho adulto (de 4 a 6 años). Un parámetro importante fue la movilidad espermática progresiva, la cual fue registrada de forma rápida, como porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y de acuerdo a esto, las muestras espermáticas fueron tipificadas como buenas ($\geq 30\%$ de

espermatozoides epididimarios móviles progresivos), regulares (20-29% de espermatozoides epididimarios móviles progresivos) y malas (De 0 a 19% de espermatozoides epididimarios móviles progresivos) (46).

Luego del aislamiento celular, se siguió el procedimiento descrito en la Fig. N°3, se determinó la viabilidad de las células espermátogoniales redondas precongelamiento y se seleccionaron las muestras con $\geq 80\%$ de viabilidad mediante azul de tripán tanto para el cultivo y criopreservación. Los medios experimentales usados, como medios crioprotectores, para fragmentos como para SSC aisladas incluyeron un ACP permeable, un ACP no permeable y suplementados con el extracto atomizado comercial de Maca JUVENS Roja y negra, descritas en su composición en el Anexo 18 y estudiada por el Círculo de Investigación de Plantas con Efecto en la Salud, (Grant no. 010-2014-FONDECYT) y descritas por el la presencia de glucosinolatos y macamidas por resonancia magnética nuclear (Anexo 19). Asimismo, la maca atomizada JUVENS corresponde al mismo tipo de maca usada anteriormente (178) cuyo voucher fue registrado en HEPLAME-MG_2015 en la Sección de Ciencias Farmacèuticas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (178). Los medios usados como dilutor fueron suplementados con Maca Roja, negra ó sin Maca y se detallan en la Tabla N°3.

Tabla N°3: Componentes de los medios de Criopreservación

MEDIOS DE CRIOPRESERVACIÓN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	MTOR	MTON	MTO	MTAR	MTAN	MTA	MFOR	MFON	MFO	MFAR	MFAN	MFA	MSOR	MSON	MSO	MSAR	MSAN	MSA
HAMF10 - SFB 10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO 10%	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
DMA 10%	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Fructosa 0.2M	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Sucrosa 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Trehalosa 0.2M	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maca roja (20mg/ml)	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Maca negra (20mg/ml)	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-

DMSO = Dimetilsulfóxido. DMA= Dimetilacetamida.Maca: Juvens.

III.3.2 Criterios de inclusión:(46)

- Peso testicular mayor a 8g de peso.
- Con espermatozoides epididimarios móviles ($\geq 30\%$).
- Con viabilidad inicial en células espermatogoniales $\geq 80\%$.

III.3.3 Criterios de exclusión:

- Testículos menores a 8g de peso.
- Testículos con anomalías como hidrocele, con quistes o coloración oscura.
- Muestras testiculares que presenten espermatozoides muertos en el epidídimo.
- Viabilidad $< 80\%$ en células espermatogoniales aisladas precongelamiento.

III. 3.4 FLUJOGRAMA

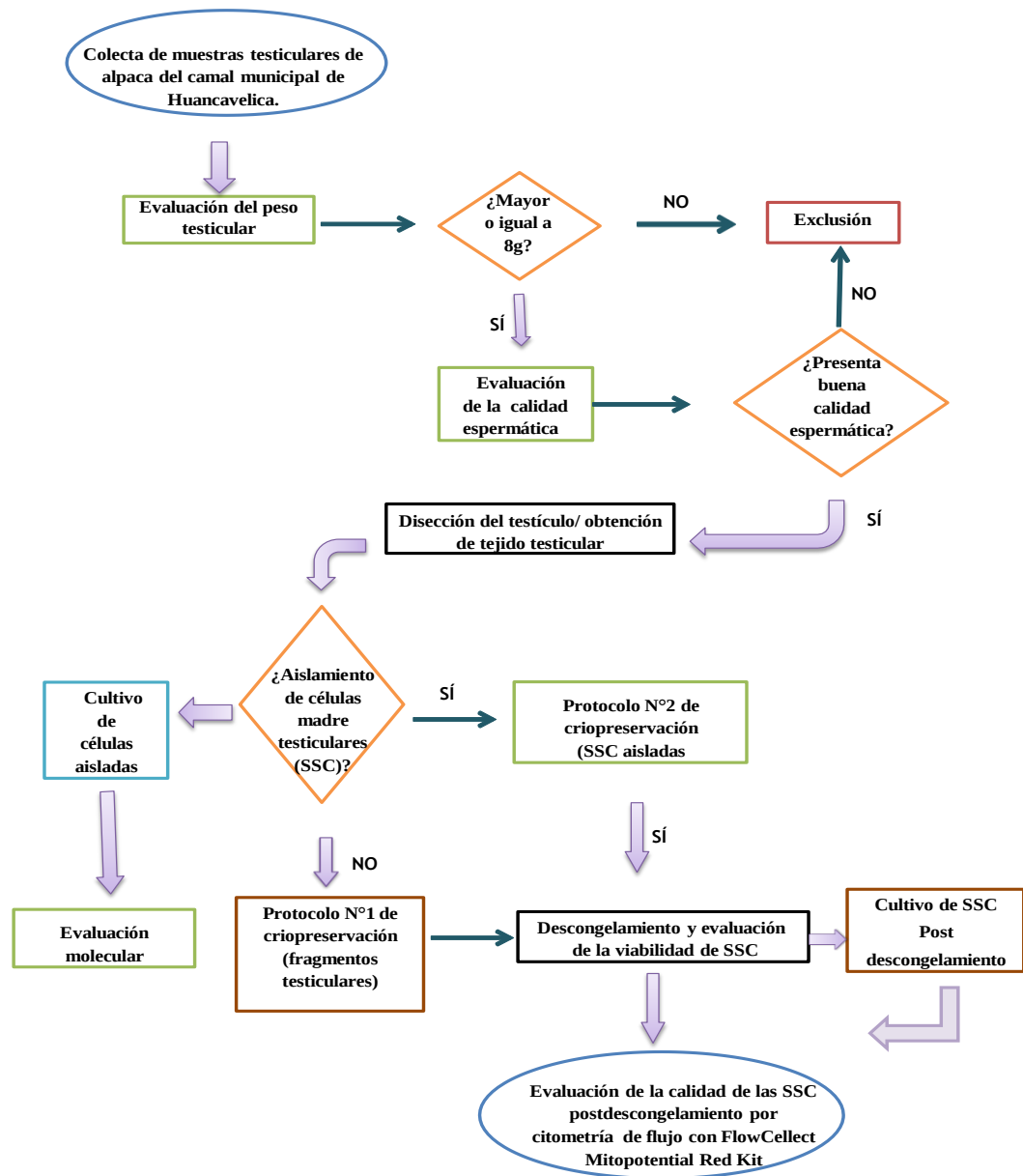


Fig. N° 3. Diagrama de flujo de las actividades realizadas en el estudio de investigación.

III.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

III. 4.1. VARIABLES INDEPENDIENTES

Medios de criopreservación:

1. MTOR (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB, conteniendo, 0,2M Trehalosa, 10% Dimetilsufóxido suplementado con 20 mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de Maca Roja JUVENS).
2. MTON (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB, conteniendo, 0,2M Trehalosa, 10% Dimetilsufóxido suplementado con 20 mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de Maca Negra JUVENS)
3. MTO -(Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB, conteniendo, 0,2M Trehalosa y 10% Dimetilsufóxido)
4. MTAR Roja (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB, 0,2M de Trehalosa/ 10% Dimetilacetamina suplementado con 20mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de Maca Roja JUVENS)
5. MTAN (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Trehalosa/ 10% de Dimetilacetamina suplementado con 20 mg/ml de del extracto hidroalcohólico atomizado de Maca Negra JUVENS)
6. MTA (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB, conteniendo 0,2M de Trehalosa y 10% de Dimetilacetamina)
7. MFOR (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Fructosa, 10% de Dimetilsufóxido y 20 mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de maca Roja JUVENS)
8. MFON (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Fructosa, 10% de Dimetilsufóxido y 20 mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de maca Negra JUVENS)

9. MFO-(Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Fructosa y 10% de Dimetilsufóxido)
10. MFAR (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Fructosa, 10% de Dimetilacetamida y 20 mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de maca Roja JUVENS)
11. MFAN (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Fructosa, 10% de Dimetilacetamida y 20 mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de maca Negra JUVENS)
12. MFA-(Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Fructosa y 10% de Dimetilacetamida)
13. MSOR (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Sucrosa, 10% de Dimetilsufóxido y 20mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja JUVENS)
14. MSON (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Sucrosa, 10% de Dimetilsufóxido y 20 mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de Maca negra JUVENS)
15. MSO- (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Sucrosa y 10% de Dimetilsufóxido)
16. MSAR (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Sucrosa, 10% de Dimetilacetamida y 20 mg/ml del extracto hidroalcohólico de maca roja JUVENS)
17. MSAN (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Sucrosa, 10% de Dimetilacetamida y 20 mg/ml del extracto hidroalcohólico atomizado de Maca negra JUVENS)

18. MSA- (Medio HAM F10 suplementado con 10% de SFB conteniendo 0,2M de Sucrosa y 10% de Dimetilacetamida)

III.4.2. VARIABLES DEPENDIENTES

Porcentaje de viabilidad con azul de tripán.

Porcentaje de SSC identificadas con DBA.

Porcentaje de SSC con alto potencial de membrana mitocondrial.

Porcentaje de células en apoptosis temprana y necrosis.

Tipos de muestra: fragmentos y células espermatozonales aisladas.

III. 5 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

III.5.1 AISLAMIENTO DE LAS SSC EN FORMA DE SUSPENSIÓN CELULAR

En las muestras seleccionadas para el estudio se evaluó el peso testicular, la concentración de células espermatogoniales redondas, la concentración de espermatozoides y la calidad de la movilidad espermática. Categorizándose las muestras espermáticas de acuerdo a (46); en buenas ($\geq 30\%$ de espermatozoides móviles progresivos), regulares (20 a 29% espermatozoides móviles progresivos) y malas (0 a 19% móviles progresivos). La movilidad espermática progresiva nos indica la calidad indirecta del individuo del cual provienen, así como la calidad del transporte de las muestras biológicas. Los testículos usados en este estudio fueron seleccionados cuando poseían $\geq 30\%$ de espermatozoides móviles progresivos en el epidídimo.

El aislamiento de células madre espermatogoniales consistió en obtener 0,8 gr del tejido testicular (excepto la rete testis) cuyo tejido fue cortado en pequeños trozos en el medio MEM suplementado con antibióticos 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ de Estreptomicina; los trozos del tejido fueron transferidos a través de una malla metálica con la finalidad de obtener una suspensión de células espermatogoniales y tejido disgregado. La suspensión celular fue posteriormente procesada de acuerdo a (97) mediante dos Digestiones Enzimáticas 1 (DE1) y 2 (DE2). La DE1 fue realizada en medio MEM suplementado con 1mg/ml de colagenasa, 26,3 $\mu\text{l/ml}$ de DNAasa y 0,5 mg/ml de hialuronidasa durante 30 minutos a 32°C en movimiento continuo, posteriormente la suspensión fue sometida a un lavado con medio MEM mediante centrifugación y resuspensión. Luego se resuspendieron las células en la DE2 la que fue suplementado con 1mg/ml de colagenasa y 0,5 mg/ml de hialuronidasa según la metodología descrita (97). La suspensión celular fue centrifugada a 1800 rpm (300g)

durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet de células fue lavado 3 veces en medio MEM suplementado con penicilina y estreptomicina.

La viabilidad de las células fue evaluada utilizando el colorante de exclusión azul de tripán. Se considera célula viva a la célula que no presenta color y célula muerta a la célula que se tiñe de azul.

III.5.2 AISLAMIENTO DE FRAGMENTOS TESTICULARES DE ALPACA:

Los testículos seleccionados para el estudio fueron lavados en buffer fosfato salino (PBS) suplementado con 0,1mg/ml de penicilina, 0,1mg/ml de estreptomicina y 0,5mg/ml de gentamicina. Posteriormente en condiciones estériles la túnica albugínea fue retirada. Luego se realizó un corte longitudinal al eje mayor del testículo y se realizaron cortes de fragmentos de 8 mm x 2mm x 2mm los que inmediatamente cortados fueron transferidos a los medios de criopreservación.

III.5.3 CULTIVO DE SSC Y PLAQUEO DIFERENCIAL:

Para la caracterización molecular se realizó un cultivo de células espermatozonales, mediante plaqueo diferencial de acuerdo al método descrito por (98), (47). Brevemente, las células espermatozonales fueron incubadas durante 72 horas en medio HAM-F10 suplementado con Suero fetal bovino (SFB) al 1% a 37°C, 5%CO₂.

III. 5.4 IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS SSC:

III.5.4.1 Diseño de primers para identificación molecular de SSC:

A la fecha no existen genomas completos publicados de alpaca en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/905>), sólo se dispone de genomas parciales de *Vicugna pacos* (secuenciado por Washington University Genome Sequencing Center y el Broad Institute) y de *Vicugna pacos huacaya* (secuenciado por Inner Mongolia Agricultural University (IMAU y BGI), por ello se procedió a buscar genes homólogos en el NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) para los marcadores moleculares de *Thy1*, *Integrina $\beta 1$* , *Cd9*, *Receptor C-Kit*, *Oct 3/4*, *Zbtb16* y *Ngn3* también dentro de organismos filogenéticamente emparentados (artiodáctilos al igual que la alpaca: *Sus scrofa* y *Bos Taurus* con el fin de ganar robustez en la amplificación. Se analizó la ubicación cromosómica de los genes evaluados en los cromosomas para la alpaca *Vicugna pacos*, cerdo *Sus scrofa* y toro *Bos taurus*.

El diseño de primers para evaluar la expresión de genes en células espermatozonales se realizó con el programa Primer3web v. 4.1.0 (<http://primer3.ut.ee/>) (132), se procuró que el producto sea menor de 250pb, contenga secuencia de diferentes exones (exon-exon junction) y los demás parámetros fueron por defecto. La especificidad de los mismos se verificaron por Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), cabe resaltar que los primers diseñados para los genes *Zbtb16* e integrina $\beta 1$ fueron específicos solo para *Sus scrofa* y *Bos taurus* pero no para las secuencias disponibles de alpaca. La formación de estructuras secundarias de los primers (heterodímero, homodímeros) se evaluó con el programa PerlPrimer v,1,1,21 (<http://en.bio-soft.net/pcr/PerlPrimer.html>) y la herramienta online IDT SciTools OligoAnalyzer 3.0 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

Para evaluar potenciales estructuras secundarias en los amplicones se usó el servidor Mfold ([133](#)) a 50 °C y a 60 °C, 50 mM NaCl, 1.6 mM MgCl₂.

III.5.4.2 Primers sugeridos para amplificar mRNA para los genes del estudio en alpaca

La ubicación de los genes del estudio fueron analizados en los cromosomas descritos para *Bos taurus* y *Sus scrofa* ya que para alpaca aún no están descritos en la base del ncbi (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>). Los primers seleccionados para cuantificar relativamente los transcritos de los genes *Zbtb16*, *Gfra1*, *Itgb1b*, *Ngn3*, *Ddx4*, *Cd9*, *Thy-1* y *Oct-3/4* en células espermatozonales de alpacas fueron los siguientes:

Tabla N°4. Primers diseñados para PCR

Gen		Primer sequence	Longitud (pb)	Amplicon (pb)
<i>*Zbtb16</i>	<i>Fw</i>	GATACCGAGAGCAACAGTTCC	21	206
	<i>Rv</i>	GATCATGCCCATCTTTGTCAG	21	
<i>*Gfra1</i>	<i>Fw</i>	GCAGCCAGCCCTCCCAGTTC	20	126
	<i>Rv</i>	GCACAAGGTGGTAAAACATGAGTGGGG	27	
<i>*Itgb1b</i>	<i>Fw</i>	TGTGTTCAGTGCCGAGCCTTCA	22	116
	<i>Rv</i>	TGGCCTGGCTGGGGCAATTT	20	
<i>**Ngn3</i>	<i>Fw</i>	GACGACGCGAAGCTCACCAA	20	95
	<i>Rv</i>	AGAGGCTGTGGTCCGCTATGC	21	
<i>*Ddx4</i>	<i>Fw</i>	TATTGACAGATGCTCAACAGG	21	95
	<i>Rv</i>	CGTTTCCTCTTGTACTACCAC	21	
<i>*CD9</i>	<i>Fw</i>	TCCGATTGACTCTCAGACCA	21	175
	<i>Rv</i>	GAAGCCAAAGAACAAGCCCA	20	
<i>*Thy-1</i>	<i>Fw</i>	GCTAACAGTCTTGCAGGTGG	20	131
	<i>Rv</i>	GGCTGAACTCGTACTGAATGG	21	
<i>*Oct-3/4</i>	<i>Fw</i>	TCTCTTTGGGAAGGTGTTTCAG	21	194
	<i>Rv</i>	CGATACTTGTCCGCTTTCTC	20	

Primers para SSC (*) y SSC en diferenciación temprana (**)

III.5.4.3 Extracción de ARN

El protocolo consistió en homogenizar las SSC con 1 ml de Trizol (Invitrogen™ 15596018), se centrifugaron a 14,000 g durante 10 min a 2-8 °C. La extracción del ARN se realizó con Trizol, según el fabricante. Brevemente, las células congeladas en nitrógeno líquido fueron centrifugadas a 12,000g, el medio MEM (Sigma) fue retirado, se añadió 1 ml de Trizol (Invitrogen™ 15596018), con una incubación a una temperatura de 15-30 °C por 5 min y posterior a ese paso se le agregó 200µl de cloroformo y se homogenizó por vortex, se incubó durante 3 minutos a una temperatura de 15-30 °C, luego del cual fue centrifugado a 14000 g x 15 min a 2-8 °C. Posterior a la centrifugación, la mezcla queda separada en una fase fenol-cloroformo baja de color roja, una interfase blanca y una fase superior acuosa incolora. El ARN se ubica exclusivamente en la fase acuosa, el cual fue transferido cuidadosamente a un criovial de 1.5 ml. para ser precipitado con 0.5 ml de alcohol isopropílico mediante 40 a 50 inversiones, luego se incubó la mezcla por 10 min a 15-30°C, se prosiguió a centrifugación a 14000g durante 10 min a 2-8°C, el sobrenadante fue eliminado y el pellet (ARN) fue lavado con etanol al 75% frío, para ser finalmente diluido en agua milliQ libre de RNAsas.

III.5.4.4 Síntesis de ADNc

A partir del ARN aislado se procedió a la síntesis del ADNc para lo cual se empleó el First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Thermo Scientific™) según describe el fabricante. Se mezcló el ARN a una concentración de 5 µg por reacción con los *primers* de oligo(dT)₁₈, y agua tratada con DEPC (Thermo Scientific™); esta mezcla fue

incubada por 5 min a 65 °C para romper posibles estructuras secundarias y luego colocado sobre hielo por lo menos 1 minuto. Posterior a ello, se adicionó el master mix, para la síntesis de ADNc, de acuerdo a las indicaciones del fabricante, como sigue 4µl de 5X Reaction Buffer, 1µl de RiboLock™ RNase Inhibitor Thermo Scientific™ (20 U/µl), 2µl de 10 mM dNTP Mix y 2µl de M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µl), se mezcló, se le dio un spin. Se incubó a 45°C durante 60 minutos y se terminó la reacción por calentamiento a 70°C durante 5 minutos. Todos los procesos de calentamiento se realizaron en el termociclador Multigene™ Mini Personal (Labnet).

III. 5.4.5 Amplificaciones PCR

Las amplificaciones se realizó usando el kit por PCR (Polymerase Chain Reaction) se realizaron usando *Taq* DNA Polymerase (recombinant) Cat. No. #EP040 c2.

Se realizó el master mix de la sgte manera:

Master Mix Reacción PCR:

1X Taq Buffer with (NH₄)₂SO₄, 1.67mM MgCl₂, 0.2µM DNTPs, 0.67µM oligo Forward, 0.67µM oligo Reverse, 0.2M Trehalosa, 0.5U Taq Polimerasa Recombinante, cDNA, 15 H₂O Milli Q 15ul.d.p.c.

III. 5.4.6 Programa de PCR

El ADNc obtenido fue amplificado por PCR con el siguiente programa de amplificación: denaturación inicial con 1 ciclo de 95 °C durante 5 minutos; 35 ciclos de amplificación a 95°C, denaturación de 30 segundos; alineamiento a 60°C durante 30 segundos;

elongación a 72 °C durante 30 segundos y un ciclo de elongación final a 72 °C durante 10 minutos usando Taq DNA Polimerasa recombinante (Thermo Scientific™). Las reacciones fueron realizadas en un termociclador Multigene™ Mini Personal (Labnet). Se empleó un PCR convencional a partir de ADNc (ADN complementario) de células espermatogoniales aisladas para estandarizar los parámetros óptimos (temperatura, tiempos, concentración de primers) de los primers seleccionados (Table N° 4). Como gen de referencia fue usado el gen ribosomal *Rp10* (134).

III.5.4.7 Electroforesis de los productos amplificados

Los productos amplificados por PCR fueron cargados en geles de agarosa al 2%, se mezcló 12 µl de los amplificados por PCR con 3 µl de rojo de cresol y se cargó en los pocillos del gel 15µl, adicionalmente se colocó un marcador estándar de peso molecular 100bp (Invitrogen) para determinar los tamaños en pares de bases (pb) de las muestras. Se dejó migrar por 70 minutos a 80V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio. Las bandas fueron analizadas midiendo los pixels con el software libre Adobe Photoshop (<https://es.ccm.net/download/descargar-974-adobe-photoshop-cc>).

III.5.5 VIABILIDAD DE CELULAS ESPERMATOGONIALES CON AZUL DE TRIPAN

La viabilidad de las células espermato goniales redondas fue evaluada pre congelamiento y postdescongelamiento tanto en células provenientes de fragmentos como en células aisladas (desde el 1 día a 150 días postdescongelamiento), con Azul de tripán las que fueron registradas y expresadas en porcentaje. El colorante Azul de Tripán es un colorante de exclusión que discrimina a las células vivas (Transparentes) y las muertas (azules, con membranas rotas). La lectura fue realizada a los 3 minutos de coincubación con el colorante vital. Se evaluó la viabilidad celular pre y postdescongelamiento analizando las células redondas espermato goniales. Asimismo, se analizó la viabilidad por grupos de resultados considerándose grupo total, bueno, regular y malo tanto en células provenientes de fragmentos y células aisladas, criterio establecido en este trabajo de investigación.

En Fragmentos, de acuerdo a su viabilidad postdescongelamiento las muestras fueron agrupados en Buenas con $\geq 55\%$ de viabilidad, Muestras Regulares con $< 55\%$ de viabilidad y Muestras malas $< 35\%$ de viabilidad postdescongelamiento, bajo el criterio establecido en este trabajo de investigación.

En células aisladas postdescongelamiento fueron agrupadas como Buenas con $\geq 45\%$ de viabilidad y muestras regulares $< 45\%$ de viabilidad bajo el criterio establecido en este trabajo de investigación.

III.5.6 DETERMINACION DE LA CITOTOLERANCIA, DETERMINADA POR LA VIABILIDAD, EN LAS CELULAS ESPERMATOGONIALES AISLADAS EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE MACA ROJA Y MACA NEGRA JUVENS EN UN PERIODO DE ESTABILIZACION CELULAR PARA CRIOGENIA A 4°C.

Con la finalidad de evaluar la concentración idónea y citotolerante de las células espermato goniales aisladas de alpaca se evaluó concentraciones crecientes de maca roja y maca negra cuyos componentes se detallan en el anexo 18.. Las pruebas de viabilidad de las células espermato goniales en medios de criopreservación fueron realizadas a 4°C durante una hora, ya que el sistema de criopreservación usa en su composición ACP permeables y no permeables que son citotóxicos a mayores temperaturas por lo que inmediatamente de realizar la coincubación de las células con el medio de criopreservación fueron sometidas a un enfriamiento a 4°C en baño de maría.

Luego del periodo de estabilización (1 hora a 4°C) la viabilidad celular fue analizada con azul de Tripán en las muestras conteniendo 20, 40, 80 y 160 mg/ml de maca roja y negra en el medio DMSO+ Trehalosa así como en el medio conteniendo DMSO+Sucrosa (medios en los que se ha observado mayor viabilidad celular durante el enfriamiento denominado estabilización) durante 1 hora a 4°C. En cada muestra se agregó azul de Tripán (1:1) y se determinó la viabilidad como se describió en III.5.3. La temperatura de análisis fue a 4°C ya que los demás componentes del medio de criopreservación fueron ACP permeables (DMSO y DMA) a mayores temperaturas muestran citotoxicidad por lo que se trabaja con ellos a 4°C (193, 194).

III.5.7 CRIOPRESERVACION

III.5.7.1 MEDIOS UTILIZADOS PARA EL CONGELAMIENTO DE FRAGMENTOS TESTICULARES Y SSC AISLADAS

Los fragmentos testiculares (n=44) fueron conservados para la criopreservación en solución salina hasta la transferencia a los medios de criopreservación. Se incluyó 3 fragmentos de 25mg cada uno fueron transferidos a un volumen de 80µl de los medios crioprotectores. Asimismo, células espermatozonales aisladas (n=32) a una concentración de 2'000,000/mL fueron mezcladas en una relación 1:1 en un volumen total de 80µL. A 40µL de la suspensión celular (n=8) se agregó 40µL del medio de criopreservación. Se usaron 18 medios de criopreservación tanto para fragmentos como para las células aisladas de acuerdo a la Tabla N° 3.

Los ependorffs conteniendo las muestras (fragmentos ó las células aisladas) fueron llevados a 4°C en baño de maría durante una hora para la estabilización previa al congelamiento. Posteriormente, la criopreservación fue realizada en el sistema termocontrolado Freeze Control CL 3300 Cryologic usando el software Cryogenesis IV hasta una temperatura final de -196°C. El descongelamiento consistió en llevar las muestras desde la temperatura del nitrógeno líquido a 37°C.

III.5.7.2 TASAS DE CONGELAMIENTO PARA FRAGMENTOS

El protocolo de congelamiento diseñado para fragmentos testiculares fue denominado protocolo 1 (135). Se inicia a 4°C y finaliza a -35°C. Finalizado el proceso se suspendieron las muestras en vapores de nitrógeno (-80°C) durante 12 horas, posteriormente las muestras fueron sumergidas en nitrógeno líquido a -196°C (Fig. N°4).

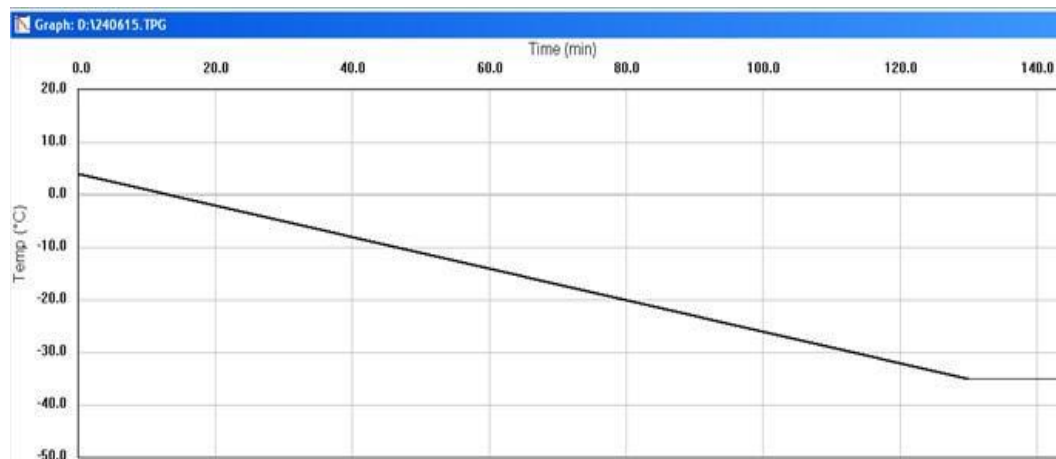


Fig. N°4: Curva de congelamiento para fragmentos testiculares de alpaca

III.5.7.3 TASAS DE CONGELAMIENTO PARA MUESTRAS DE CÉLULAS AISLADAS.

La curva de protocolo de congelamiento para las SSC en forma aislada, fue denominada protocolo 2 (48) de acuerdo a la Fig. N°5.

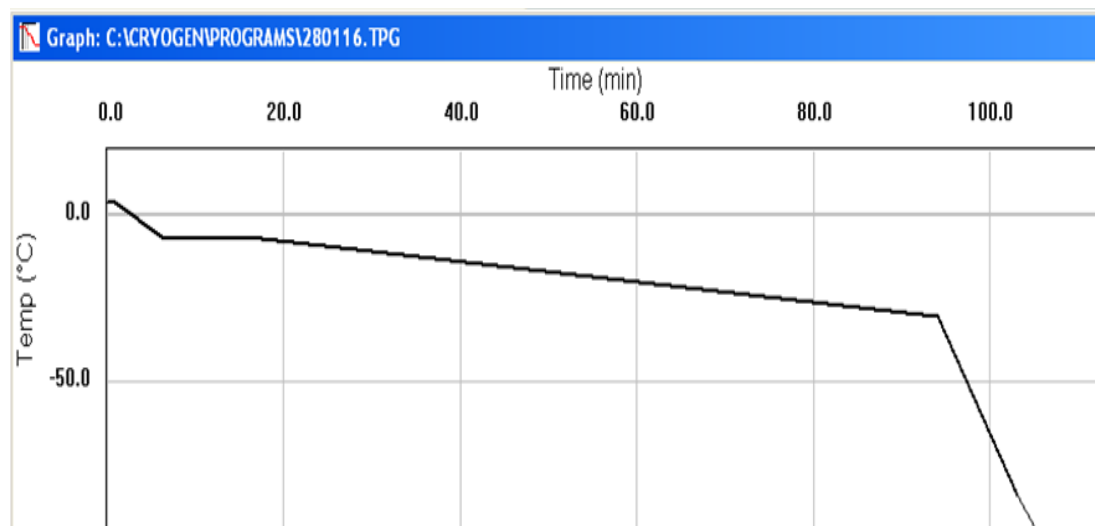


Fig. N° 5. Curva de congelamiento termocontrolado para células aisladas.

III.5.8 DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE SSC CON LA SONDA DBA EN CÈLULAS FRESCAS MEDIANTE CF

Las células madre testiculares de alpaca (n=24) fueron aisladas como se describió anteriormente **III.5.1** brevemente, los tejidos fueron transferidos a través de una malla metálica y se agregó medio MEM, luego fue lavado mediante centrifugación y descarte, posteriormente se sometió a la DE1 y DE2 finalmente fueron lavadas las células mediante centrifugación a 2000 g durante 5 min, el sedimento se resuspendió en 1 ml de Medio HAM F10. Se agregó el DBA conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una concentración de 100 µg ml⁻¹.

Las células fueron lavadas y permanecieron en oscuridad hasta su lectura en el CF. Se usó 1'000,000/ml de células espermatogoniales de donde se registraron 10000 células para el análisis. Se realizó compensación para el fluorocromo DBA.

El análisis de las células fue realizado con el láser 488 en el Canal 2, considerando la región en donde se encuentran las células redondas espermatogoniales y de ésta zona se clasificó a las células como SSC (sDBA+), SSC (wDBA+) en diferenciación temprana y células redondas diferenciadas (DBA-) de acuerdo a los criterios de (46). Las células espermatogoniales no congeladas fueron usadas como control del Mitosense, células proliferadas fueron usadas para el control de DBA y células frescas expuestas a luz UV fueron usadas como control del fluorocromo 7AAD.

III.5.9 DETERMINACION DE SSC Y EVALUACION DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POSTDESCONGELAMIENTO MEDIANTE CF

Las muestras tanto Fragmentos (n=8) y de SSC aisladas (n=8) fueron retiradas del tanque de Nitrógeno líquido conteniendo 18 tubos *ependorf* (200ul) para cada tipo correspondientes a los 18 medios de criopreservación durante 5 minutos a 18°C, posteriormente fueron transferidas a una incubadora a 37°C por 5 minutos.

Las células madre testiculares de alpaca fueron descongeladas a 18°C durante 5 minutos, tanto las células congeladas en su forma aislada como las congeladas en fragmentos, las que fueron lavadas en medio de cultivo MEM.

Las SSC proveniente de fragmentos, fueron aisladas siguiendo el protocolo descrito anteriormente en **III.5.1**. Se agregó el DBA conjugado con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una concentración de 100 µg ml⁻¹ y la sonda fluorescente Mitosense del KIT Flow Collect Mitopotential Red Kit (Millipore Cat N°FCCH100105) en el buffer de trabajo HSC del kit, la incubación fue realizada durante 15 min a 37°C. Posteriormente la sonda fluorescente Mitosense fue removida mediante lavado mediante centrifugación y resuspensión en buffer HSC. Luego las muestras fueron transportadas en incubadora transportable a 37°C en oscuridad a la sala de citometría para agregar 5µl de 7AAD. Finalmente, la emisión de fluorescencia de 10000 células fue registrada en el citómetro de imágenes AMNIS (MERCK). Se seleccionó el área de registro, donde se encontraban células individuales, redondas y fluorescentes a DBA evitando las células en dupletes, espermatozoides y debris celulares, región usada para la colecta de datos usando el láser 488 con una potencia de 20mW en el Canal 2, Canal 4 para detectar el fluorocromo 7AAD y el canal 11 con el láser 642 a una potencia de 100mW para la detección del

fluorocromo Mitosense. La evaluación de los datos fue realizada con el Software IDEAS para obtener el porcentaje de sDBA+, wDBA+, DBA- de acuerdo a (46); así como el número de células espermatogoniales de acuerdo a su potencial de membrana mitocondrial: sMitosense+ (activa), wMitosense+(en apoptosis temprana) y en necrosis positivas a 7AAD+ en cada medio de criopreservación usado tanto en fragmentos como en SSC congeladas en forma aislada de acuerdo a la siguiente clasificación: 1) con alto potencial de membrana mitocondrial, identificada por la marca intensa con Mitosense tipificadas en este trabajo como “strongly Mitosense positive” (sMitosense+), color rojo), 2) células con bajo potencial de membrana mitocondrial que son las células en apoptosis temprana y se observan con un débil marcaje a Mitosense como “*weakly Mitosense+*” (wMitosense+) y 3) en Necrosis negativas a Mitosense y con intensa fluorescencia al 7AAD, de color naranja. Se evaluaron 8 muestras de fragmentos y 8 de SSC en forma aislada con los 18 medios de criopreservación lo que llevo a realizar un análisis de datos y 144 gráficos para fragmentos y 144 gráficos para SSC en forma aislada. El análisis de la población de células fue realizado en los histogramas producidos para cada fluorocromo considerando la selección poblacional de células de acuerdo a la intensidad de los fluorocromos con la herramienta Selected bin, la cual da la observación de las células que están incluidas en el histograma producido del registro de células.

III 5.10 MUESTRAS DE SSC CONGELAS EN FORMA AISLADAS FUERON SOMETIDAS A PROLIFERACION Y DIFERENCIACION POSTDESCONGELAMIENTO

Se evaluó la capacidad proliferativa y de diferenciación temprana de las SSC congeladas en forma aislada en el medio MSON (n=3). Los cultivos de proliferación fueron realizados de acuerdo a (47) y la diferenciación de acuerdo a (136). Se analizó la presencia de SSC y del potencial de membrana mitocondrial mediante CF luego de la proliferación y diferenciación celular temprana a línea germinal masculina, con las sondas: DBA Mitosense y 7AAD y el análisis de datos con el software IDEAS

III. 6 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA:

Se compararon los porcentajes de viabilidad obtenido con azul de tripán así como de su potencial de membrana mitocondrial de las SSC postdescongelamiento, considerando que la disminución del potencial de membrana mitocondrial determina indirectamente a las células que inician apoptosis temprana. Considerando la reactividad al DBA como: sDBA+ (SSC), wDBA+(SSC en diferenciación temprana); DBA- (células redondas diferenciadas) y el potencial de membrana mitocondrial: considerándose: sMitosense+ wMitosense+ y 7AAD+, comparados con su control (Ausencia de maca) obtenidos tanto de fragmentos testiculares y de células testiculares congeladas en su forma aislada mediante CF (pvalue <0,05).

Se realizó las pruebas de contraste comparando los medios con Maca roja-JUVENS, Maca negra-JUVENS y Sin Maca, en Grupos como sigue: Grupo 1:MTOR-MTON-MTO, Grupo 2:MTAR-MTAN-MTA, Grupo 3: MFOR,MFON,.,MFO; Grupo 4: MFAR-MFAN-MFA, Grupo 5:MSOR-MSON-MSO y MSAR-MSAN-MSA mediante Kruskal

Wallis ($pvalue < 0,05$). Asimismo, se realizó las pruebas de contraste con los tipos de muestra congelados (Fragmentos versus Células) utilizando la prueba U de Mann-Whitney. Adicionalmente, se contrastó todas las variables del estudio comparando los ACP permeables mediante la prueba U de Mann-Whitney. Por otro lado, se comparó los ACP No permeables tanto para fragmentos y para células mediante la prueba de contraste de Kruskal Wallis ($pvalue < 0,05$).

Por otro lado, se contrastó la presencia de sDBA+ entre las Muestras Totales-Buenas, entre las muestras Totales-Malas y entre las Muestras Buenas y Malas; Así como el porcentaje de células con alto potencial de membrana mitocondrial posdescongelamiento congelados en forma de fragmentos y en forma de células aisladas usando la prueba de contraste U de Mann Whitney ($pvalue < 0,05$). Las pruebas de contraste de viabilidad de las células espermatozonales entre células y fragmentos fue realizada con la prueba de contraste de U de Mann-Whitney ($pvalue < 0,05$). El análisis estadístico consideró la aplicación del paquete estadístico SPSS. Se realizaron pruebas de homogeneidad (Test de Levene) y normalidad de Shapiro Wilk

III.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudio fue evaluado, registrado y aprobado por el Comité Institucional de ética para el uso de Animales CIEA de la UPCH en su sesión del 3 de agosto del 2016 (CODIGO SIDISI N° 0000066755). No existiendo interés especial ni existe incongruencia ni intereses especiales para la construcción de los medios, de los suplementos naturales usados ni de los protocolos de congelamiento estandarizados y utilizados en este trabajo de investigación.

IV. RESULTADOS

IV.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS DEL ESTUDIO

Se analizaron 172 muestras provenientes de 47 machos de alpacas (Tabla N°2). Se incluyen los parámetros evaluados, así como los valores de referencia de las muestras del estudio (Tabla N°5), obtenidas en este estudio; el peso testicular ($12,55 \pm 3,11$ gr), la viabilidad inicial de las células espermatogoniales frescas ($80,12 \pm 8,10$) y la movilidad espermática total en espermatozoides epididimarios ($\geq 30\%$).

Tabla N°5. Valores de Referencia de los parámetros evaluados en las muestras

<i>Parámetros Evaluados (n=47)</i>	<i>Promedio $\pm$ SD</i>	<i>Rango de referencia</i>
<i>Peso testicular (gr)</i>	<i>12,55 $\pm$ 3,11</i>	<i>8.55 – 19.94</i>
<i>Concentración de células espermatogoniales redondas (millones)</i>	<i>31,06 $\pm$ 37,33</i>	<i>3 – 171.5</i>
<i>Viabilidad de células redondas espermatogoniales iniciales (%)</i>	<i>80,12 $\pm$ 8,10</i>	<i>80 - 97.4</i>
<i>Concentración espermática (millones)</i>	<i>205,6 $\pm$ 246</i>	<i>9 - 1029</i>
<i>Viabilidad espermática (%)</i>	<i>57,68 $\pm$ 17,80</i>	<i>16.7 - 93.9</i>
<i>Movilidad espermática total</i>	<i>39,88 $\pm$ 18,33</i>	<i>30-57</i>

SD: Desviación estándar

Adicionalmente, en muestras frescas (n=24) se tipificó a tres poblaciones celulares con el uso de la sonda DBA mediante CF: 1) $4,43 \pm 0,68\%$ de sDBA+ que corresponde a SSC; 2) $37,43 \pm 3,07\%$ de wDBA+, que corresponden a SSC en diferenciación temprana y 3) $54,12 \pm 3,17\%$ de células DBA- que corresponden a células redondas diferenciadas (Figuras N°6 y N°7, Anexo N°8). Las SSC en las alpacas adultas en nuestro estudio oscilaron entre 500 y 1000, bajo una lectura de 10,000 eventos desde una muestra inicial de 1'000,000/ml de células espermatogoniales.

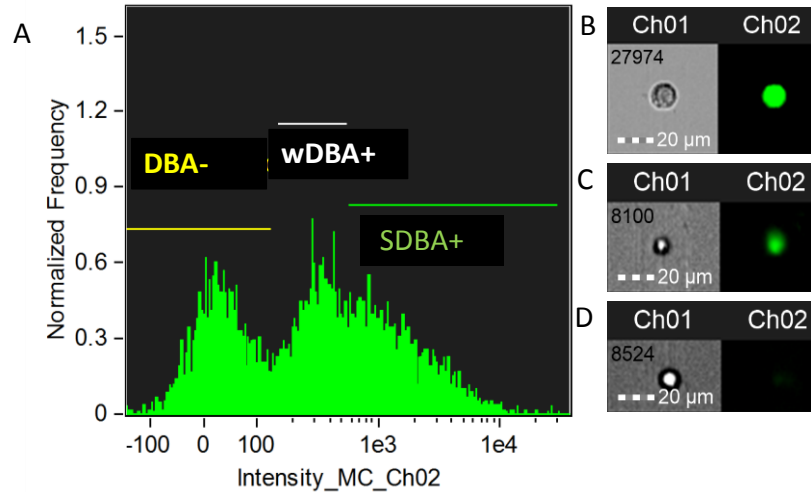


Fig. N°6. Células espermatozonales de alpaca frescas evaluadas con DBA mediante CF (n=24). En el histograma se aprecian tres poblaciones celulares: sDBA+, wDBA+ y DBA-. B) SSC de alpaca tipificada como sDBA+. (C) SSC en diferenciación temprana tipificada como wDBA+ y Célula espermatozonal redonda diferenciada DBA-.

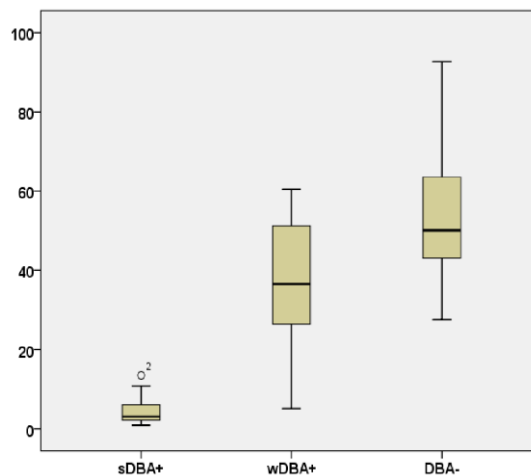


Figura N°7. Media±Error estándar del porcentaje de SSC (sDBA), SSC en diferenciación temprana (wDBA+) y células diferenciadas (DBA-) en muestras frescas.

IV.2 IDENTIFICACION MOLECULAR DE LAS SSC DE ALPACA

Mediante el análisis bioinformático de los genes del estudio se han podido diseñar los primers basado en las secuencias de artiodáctilos (*Sus scrofa*, *Bos taurus* y *Vicugna pacos*). Se obtuvieron amplicones de 175bp (*Cd9*), 131bp (*Thy 1*), 194bp (*Oct 3/4*), 206bp (*Zbtb16*), 95pb (*Ddx4*) y 104bp (*Ngn3*) (Tabla N°4).

La localización de los genes estudiados no ha sido identificada en los cromosomas de alpacas porque aún su nivel de ensamblamiento está a nivel de scaffold; debido a esto se realizó el análisis de la ubicación de estos genes en los cromosomas en cerdo y en toro. Observándose que en el idiograma de *Sus scrofa* (Fig. N°8 A) el cual muestra a 18 cromosomas autosómicos y dos sexuales y que los genes estudiados están ubicados en los cromosomas autosómicos. En el idiograma de *Bos Taurus* (Fig. N°8 B) se observan 29 cromosomas autosómicos y dos sexuales; observándose que los genes de este trabajo están localizados en los cromosomas autosómicos (Fig. N°8C).

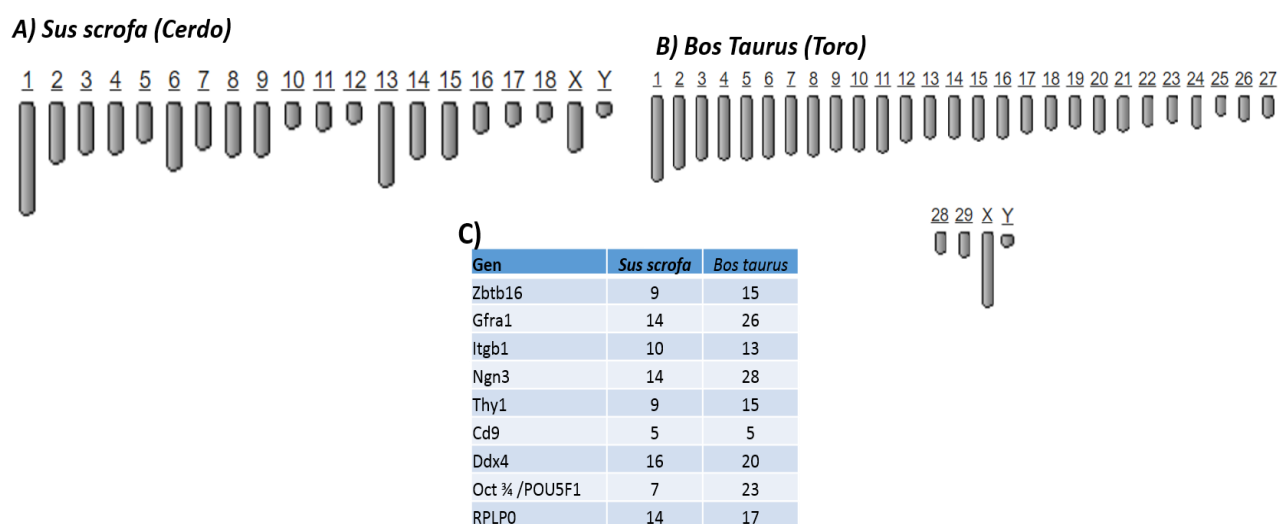


Fig. N°8. A) Idiograma de *Sus scrofa*. B) Idiograma de *Bos taurus*. C) Se observa la ubicación de los genes en los cromosomas autosómicos.

Además, se obtuvo amplicones de 126pb y 116pb para *Gfra1* e *Integrina $\beta 1$* , respectivamente. La presencia de SSC adultas fue verificada, mediante la expresión de los genes: *integrina $\beta 1$* (116bp), *Zbtb16* (206bp), como genes que promueven la autorrenovación y el mantenimiento de la SSC, y por otro lado *Ngn3* (104 pb) como un gen, que promueve la diferenciación temprana de las SSC gel de agarosa al 2%, (Fig. N°9).

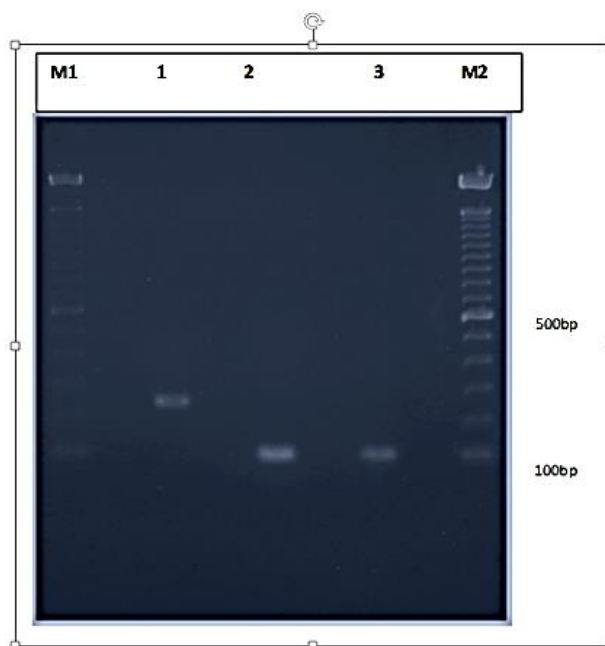


Fig. N°9. Amplificación de PCR. Gel de agarosa 2%. Carril M1 y M2: marcador Invitrogen 100bp Invitrogen 15628-019, 2.5ug/carril y 3ug/carril respectivamente. Carril 1: *Zbtb16* 260bp. Carril 2: *Integrina $\beta 1$* 108bp. Carril 3: *Ngn-3* 104bp.

IV.3 VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS ESPERMATOGONIALES AISLADAS EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE MACA ROJA Y NEGRA JUVENS A 4°C.

La viabilidad de las células espermátogoniales aisladas en presencia de Maca negra y roja fue analizada en los medios de criopreservación MSON, MTON (Conteniendo Maca negra como suplemento natural) y MSOR y MTOR (Conteniendo Maca roja) durante el periodo de estabilización a 4°C, en los medios MSO (Fig. N°10) y MTO (Fig. N°11) que

al ser suplementado con Maca negra-JUVENS son MSON y MTON y al ser suplementado con Maca roja-JUVENS son MSOR y MTOR en concentraciones crecientes de 20, 40, 80 y 160 mg/ml. Los resultados de viabilidad celular fueron obtenidos luego de 1 hora de estabilización a 4°C (Tabla N°6).

Tabla N°6. Porcentaje de viabilidad de las células espermatozonales de alpaca en Maca Negra y Maca Roja con azul de Tripán

Concentración de Maca (mg/ml)	Medios de Criopreservación			
	MSON	MSOR	MTON	MTOR
20	98	50	100	94
40	90	48	87	43
80	85**	38**	89*	50**
160	89*	49*	86*	1*

*Células deformes

** < Número de células

A concentraciones crecientes de 20, 40, 80 y 160mg/ml de Maca roja y de Maca negra el porcentaje de viabilidad y el número de células disminuye (ruptura de células); además las que se mantienen presentan deformaciones celulares e incluso no se logra disolver el producto natural en el medio de dcriopreservación (Tabla N°6).

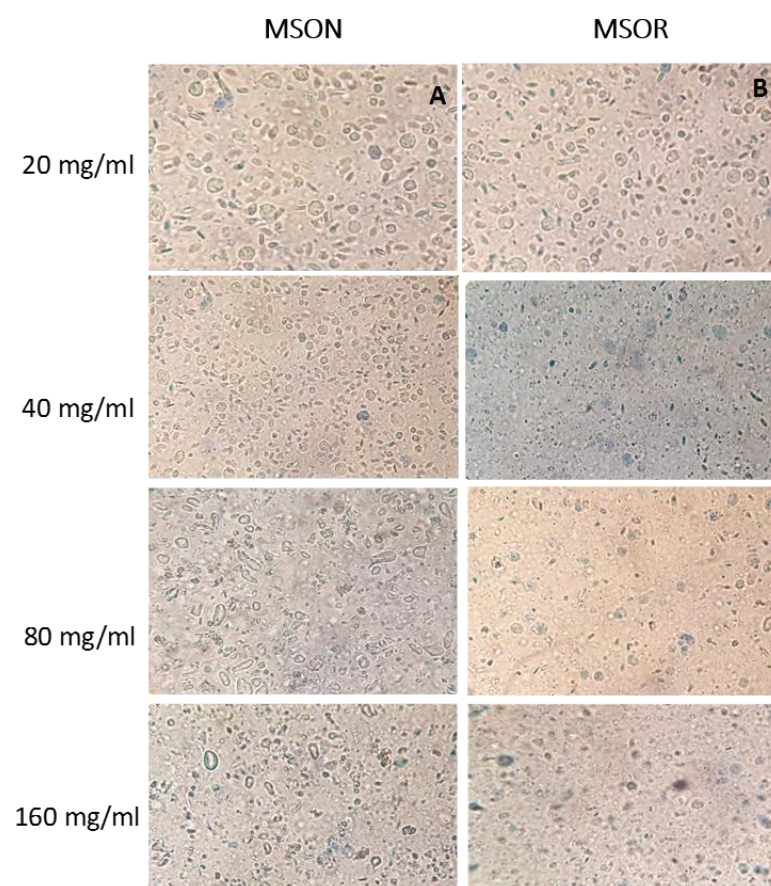


Fig. N°10. Viabilidad en las células espermatogoniales en medio MSO suplementada con Maca Roja y Maca negra A) En medio MSON y en medio B) MSOR con 20, 40, 80 y 160 mg/ml de Maca Negra o Roja-JUVENS.

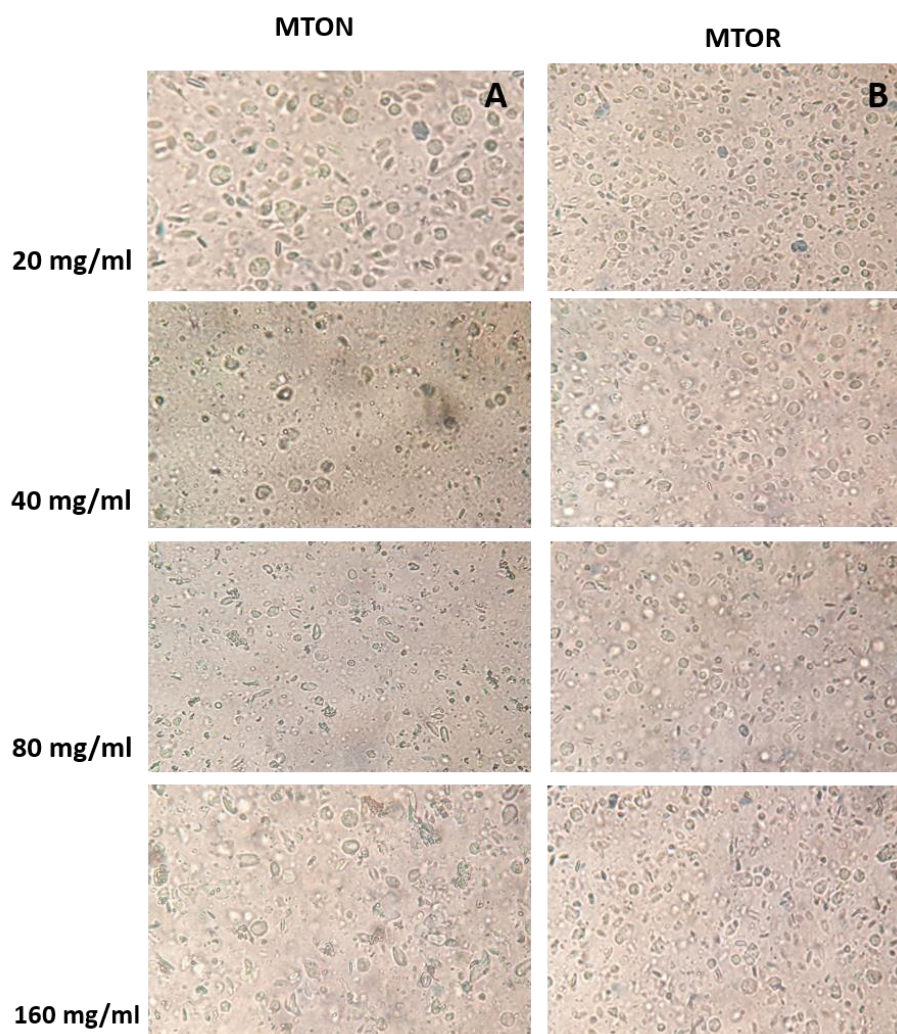


Fig. N° 11. Viabilidad de Maca Roja y Maca Negra en células espermatozonales en medio MTO. A) MTON y en medio B) MTOR con 20, 40, 80 y 160 mg/ml de Maca Negra o Roja JUVENS.

Las células se mantienen intactas a 20 mg/ml y 40mg/ml en presencia de Maca negra y a concentraciones de 80 mg/ml y 160 mg/ml se observa las células pueden afectar su forma celular y no se disuelve en el medio de criopreservación ya que se observan fracciones no disueltas, el porcentaje de mortalidad es bajo en los medios suplementados con maca negra (MSON y MTON) (Fig.N° 9,10 y 11).

La viabilidad celular en el medio MTOR (maca roja) fue de 94% a 20mg/ml y baja rápidamente a 40mg/ml; cuando se utiliza el medio MTO suplementado con Maca roja (Fig. N°9, 10 y 11, Tabla N°6). En el medio MSO en presencia de maca roja (MSOR) se observa una viabilidad de 50% en 20 mg/ml (Fig. 11).

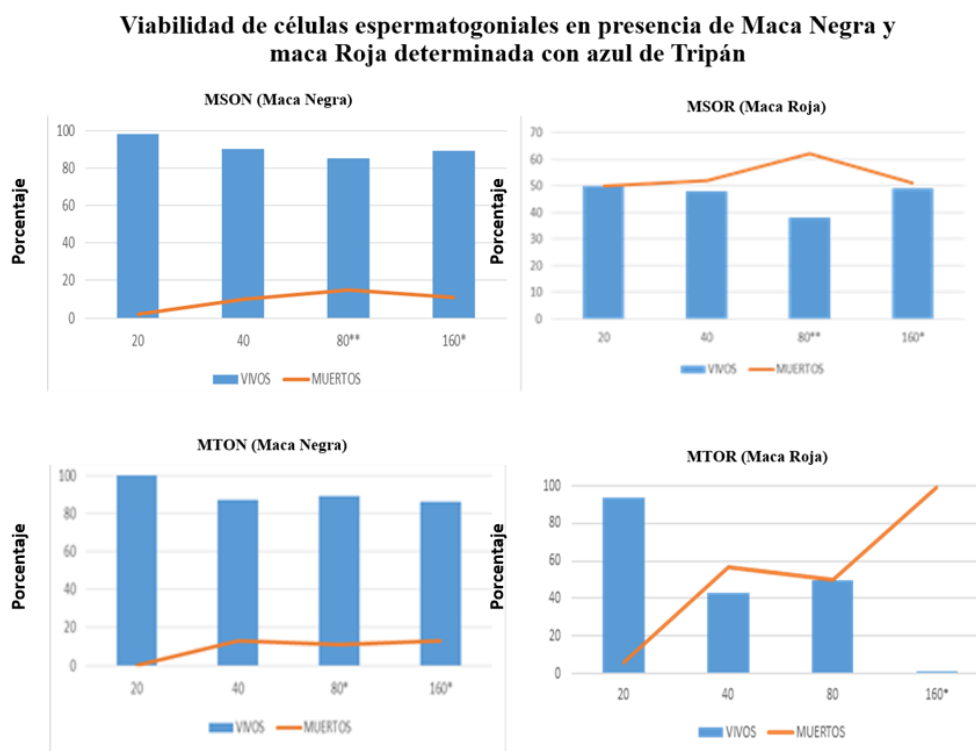


Fig. N°12. Porcentaje de viabilidad (Barras azules) de las células espermatozonales de alpaca en concentraciones crecientes de Maca. La línea roja indica el porcentaje de mortalidad en cada concentración. * Indica que existe una disminución drástica de la concentración celular. **Indica deformación de las células.

MSON: Medio de criopreservación conteniendo DMSO+Sucrosa+Maca Negra JUVENS. MSOR: Medio de criopreservación conteniendo DMSO+Sucrosa+Maca Roja JUVENS. MTON: Medio de criopreservación conteniendo DMSO+Trehalosa+Maca

Negra JUVENS. MTOR: Medio de criopreservación conteniendo DMSO+Trehalosa+Maca Roja. JUVENS.

A 80 y 160 mg/ml de maca en los medios MTO o MSO precipita en el medio, el número de células disminuye drásticamente y las células cambian de forma (Tabla N°6) observándose que la Maca roja es citotóxica para las células espermatogoniales a concentraciones de 40, 80 y 160 mg/ml tanto en el medio MTOR y MSOR. En el Grafico N°9 se observa el porcentaje de viabilidad (en Barras azules) y el porcentaje de mortalidad en línea roja en cada medio analizado. Debido a estos resultados, la concentración de Maca utilizada como suplemento a 4°C la que fue estandarizada a 20 mg/ml tanto para Maca Negra como para Maca Roja JUVENS para ser usada en los ensayos de criopreservación.. En cambio, cuando los medios MTO y MSO poseen maca negra la viabilidad es de 100% y 98% a 20mg/ml respectivamente; 87% y 90% a 40mg/ml respectivamente, 89% y 85% a 80mg/ml y 86 y 89% a 160 mg/ml respectivamente (Fig. N°9, 10, 11 y Tabla N°6).

IV.4 VIABILIDAD CELULAR EN FRAGMENTOS DESCONGELADOS:

La viabilidad postdescongelamiento en las células espermatogoniales de alpaca procedentes de fragmentos testiculares fue analizada con azul de Tripán. En la Fig. N°12 podemos observar que las flechas rojas indican células muertas teñidas de azul y las células vivas son las no coloreadas.

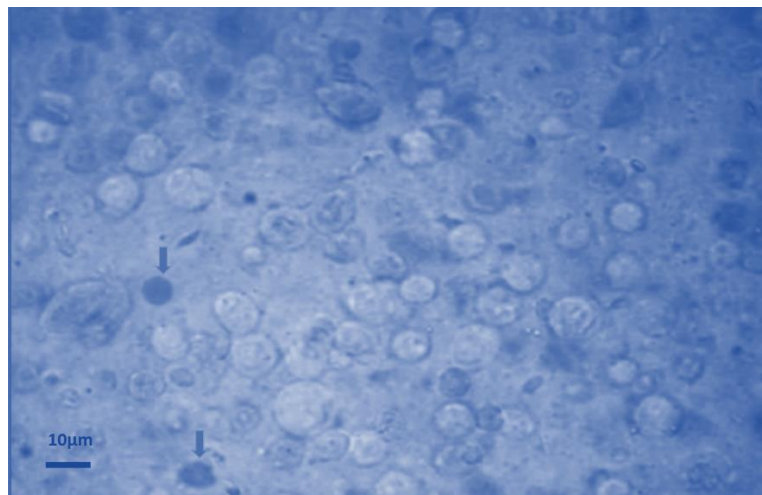


Fig. N°13: Viabilidad con azul de Tripán postdescongelamiento en las células espermatogoniales provenientes de fragmentos testiculares de alpaca. Las flechas indican células muertas.

Se presenta el resultado en $\text{media} \pm \text{Error estándar}$, de la viabilidad postdescongelamiento en muestras Totales donde se incluyen todas las muestras (Fig. N°13) y agrupadas de acuerdo a su viabilidad criterio establecido como: Muestras Buenas ($\geq 55\%$), muestras regulares ($< 55\%$) y malas ($< 35\%$) postdescongelamiento (Fig. N°14, Anexo N°4 y 6). La media máxima de viabilidad en las muestras Totales fue de $60,66\% \pm 3,64$ en el medio MSAN sin mostrar diferencias significativas con los medios MSAR ni el medio MSA ($p\text{value} > 0,05$).

Viabilidad de células espermatozonales postdescongelamiento con azul de Tripán

De acuerdo al criterio propuesto en este trabajo de investigación

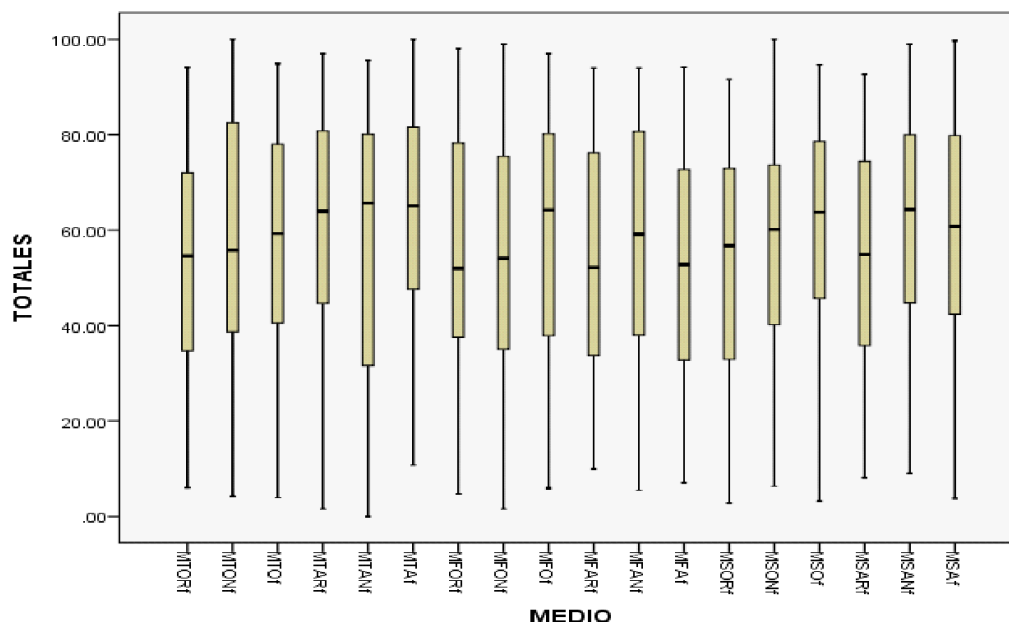


Fig. N°14. Viabilidad con azul de Tripán de las células espermatozonales postdescongelamiento provenientes de fragmentos testiculares expresados como Media $\pm$ Error Estandar% ($X \pm EE\%$) ($pvalue > 0,05$). Categorizados como Muestras totales (Se incluyen todas las muestras del estudio ($n=44$)).

De acuerdo al criterio propuesto en este trabajo de investigación, las muestras fueron agrupadas de acuerdo a su viabilidad postdescongelamiento, en muestras Totales ($n=44$), Buenos ($\geq 55\%$ de viabilidad, $n=24$), Regulares ($< 55\%$ de viabilidad, $n=8$) y malos ($< 35\%$ de viabilidad, $n=12$). En las Buenas, la media máxima de viabilidad fue de $75,81\% \pm 3,25$ en el medio MSA, sin mostrar diferencias significativas con los medios MSAR y MSAN ($pvalue > 0,05$). En muestras tipificadas como Regulares la media máxima fue de $49,71\% \pm 6,24$ en el medio MSAN sin mostrar diferencias significativas con los medios MSAR y MSA ($pvalue > 0,05$) y en Muestras Malas se observa una media

de $31,66\% \pm 10,98$ en el medio MTON sin mostrar diferencias significativas en el medio MTOR ni en el medio MTO ($pvalue > 0,05$), (Fig. N°14, Anexo N°6). Asimismo, no existen diferencias significativas en la viabilidad celular entre las muestras Totales, ni Buenas ni Regulares entre los medios MTOR, MTON, MTO ni entre los medios MTAR, MTAN, MTA ni entre los medios MFOR, MFON, MFO ni entre los medios MFAR, MFAN y MFA, ni en los medios MSOR, MSON y MSO, ni en los medios MSAR, MSAN, MSA ni en la viabilidad celular media entre los 18 medios de criopreservación evaluados ($pvalue > 0,05$) (Anexo N°6).

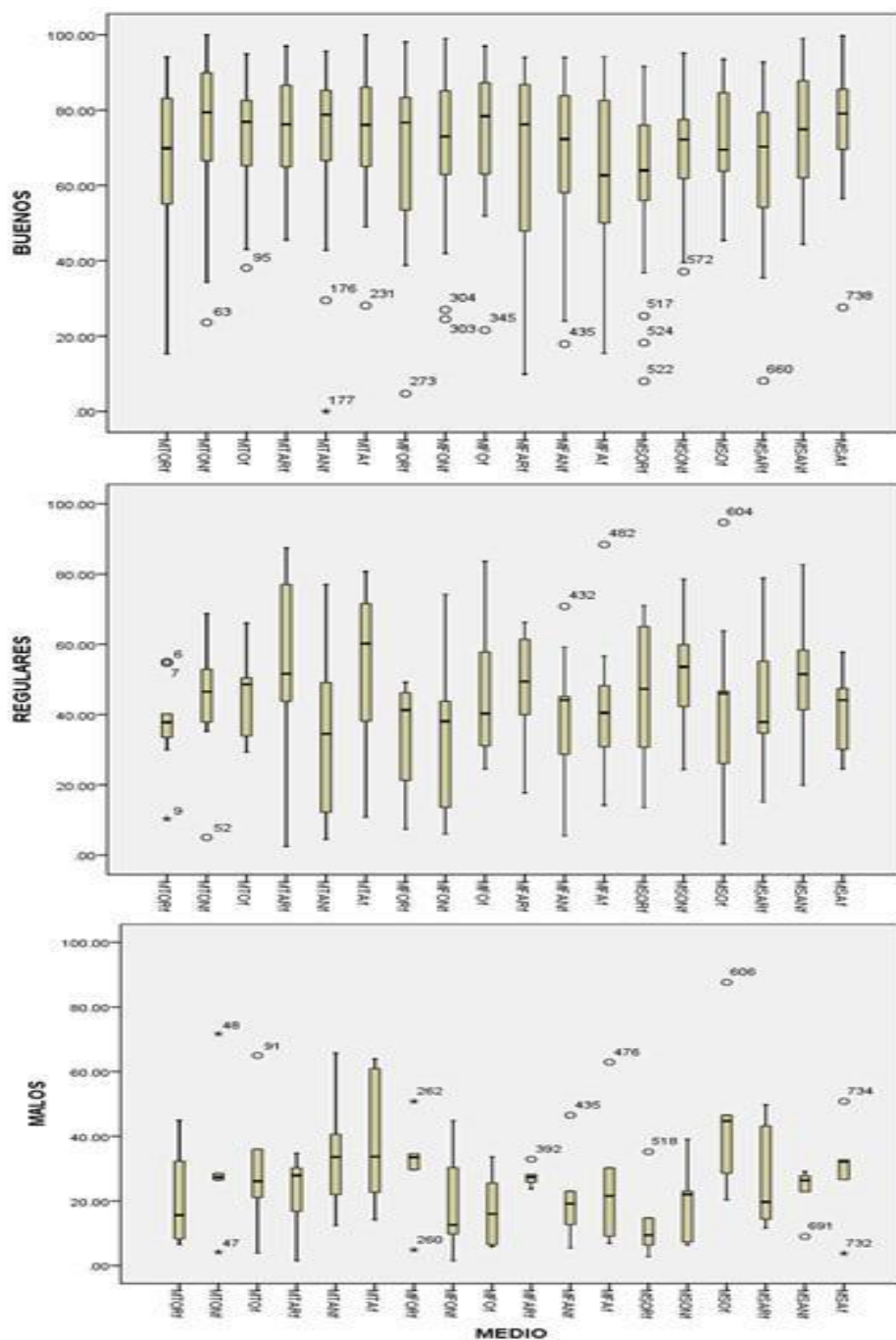


Fig. N° 15. Distribución de la viabilidad con azul de Tripán en muestras congeladas en forma de fragmentos categorizadas de acuerdo al criterio propuesto de este trabajo de investigación; como Buenas ($\geq 55\%$ de viabilidad, $n=22$), Regulares ($< 55\%$ de viabilidad, $n=11$) y Malas ($< 35\%$ de viabilidad, $n=11$) postdescongelamiento.

IV.5 CÉLULAS ESPERMATOGONIALES CONGELADAS EN FORMA AISLADA:

Se evaluaron 32 muestras postdescongelamiento las que fueron congeladas en forma de SSC aisladas, cuyo tiempo de permanencia a -196°C osciló entre 1 a 148 días (Anexo N°3) y la viabilidad fue evaluada con azul de Tripán postdescongelamiento (Anexo 5, Anexo 7, Fig. N°16 y Fig. N°17).

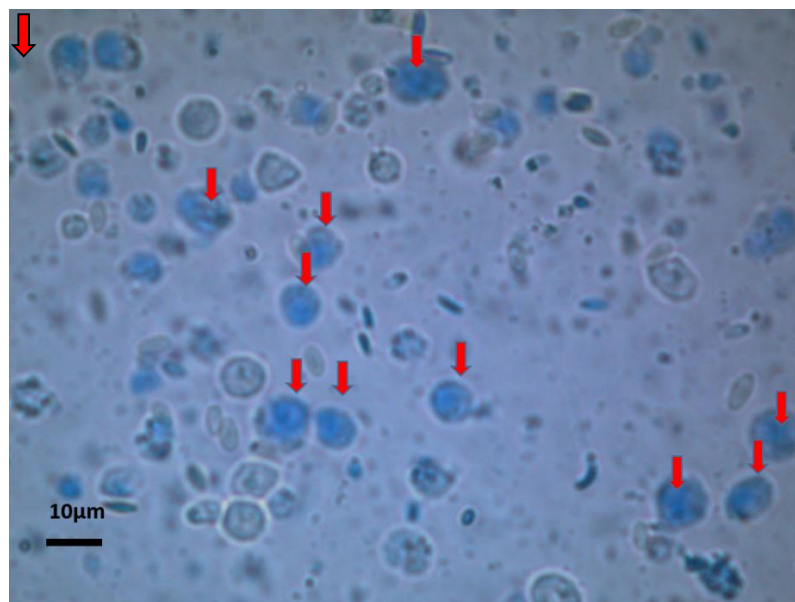


Fig. N°16. Viabilidad de Células espermatogoniales postdescongelamiento congeladas en forma aislada y evaluadas mediante el colorante azul de Tripán- Las flechas indican células muertas.

La mayor viabilidad promedio observada en las muestras totales (n=32) fue en el medio MTOR $45,36 \pm 3,57\%$ (observándose una viabilidad de 42,3% a los 166 días de criopreservación en MTOR vs 30,8% en medio MTO). En cambio, cuando se clasifica a las muestras de acuerdo a su viabilidad (Criterio propuesto por este trabajo de investigación) en Buenas ($\geq 45\%$ de viabilidad, n=16) y regulares ($< 45\%$, n=16); se observa que la mejor viabilidad en las muestras **buenas** fue el medio MFO donde se observó $54,24 \pm 4,45\%$ de viabilidad celular (Fig. 17). En las muestras **regulares** (n=17) se observa la mayor viabilidad promedio en el medio MTOR que asciende a $37,59 \pm 4,79$ de viabilidad comparado con MTON y MTO sin diferencias significativas ($p > 0,05$) (Tabla N°7), luego de permanecer 148 días de congelado a -196°C (muestra N°16) la viabilidad asciende a 42,3% en el medio MTOR (Anexos N°3 y N°5).

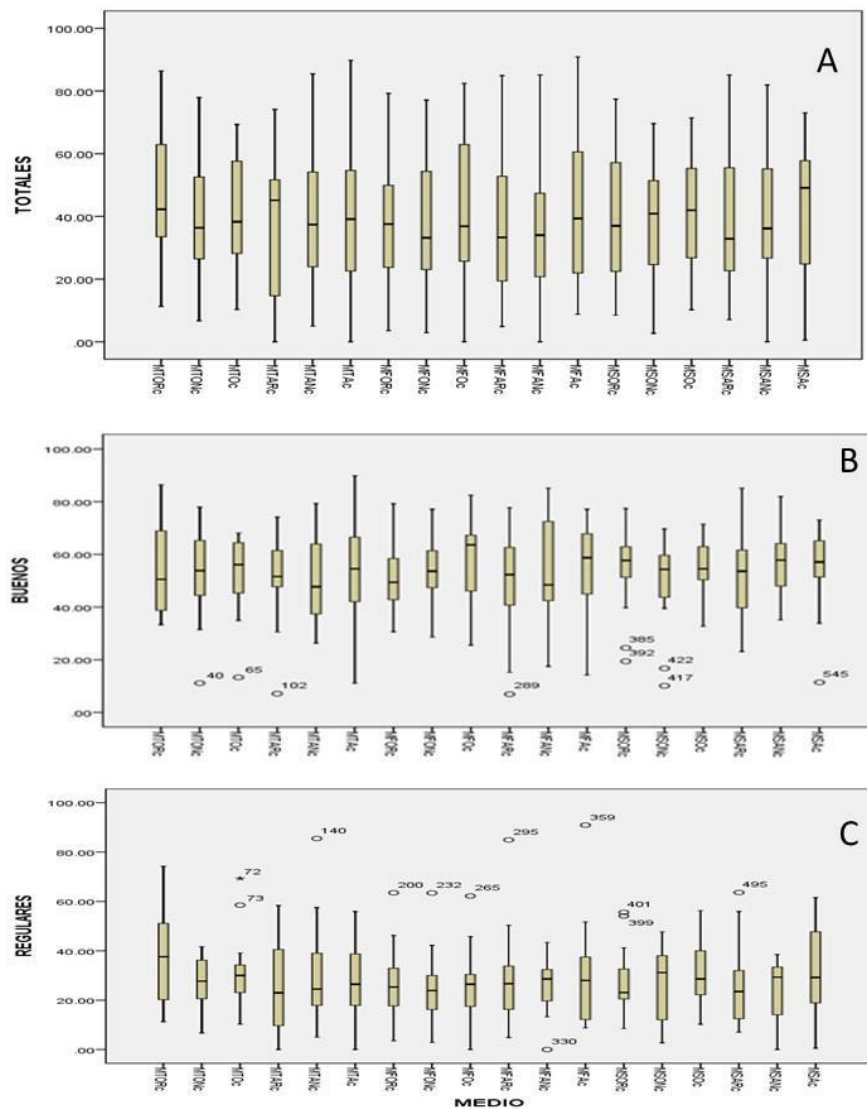


Fig. N° 17. Viabilidad postdescongelamiento de células espermatozonales de alpaca congeladas en forma aislada evaluadas con azul de Tripán en muestras Totales (A) ; Buenas (B) y Regulares (C) (pvalue >0,05) de acuerdo al criterio propuesto por este trabajo de investigación.

En las muestras Buenas, la media máxima de viabilidad fue de $57,24\% \pm 4,11$ en el medio MFO, sin mostrar diferencias significativas con los medios MFOR y MFON (pvalue >0,05) y en muestras tipificadas como Regulares la media máxima fue de $31,81\% \pm 4,27$ en el medio MSA sin mostrar diferencias significativas con los medios MSAR y MSAN

(pvalue >0,05). Asimismo, no existen diferencias significativas en relación al Medio MFOR ni MFON (p value >0,05), observándose un valor de 37,6% de células vivas postdescongelamiento en la muestra que permaneció 148 días en nitrógeno líquido a -196°C. Asimismo, no existe diferencias significativas en la viabilidad celular entre las muestras Totales, ni buenas ni regulares entre los medios MTOR, MTON, MTO ni entre los medios MTAR, MTAN, MTA ni entre los medios MFOR, MFON, MFO ni entre los medios MFAR, MFAN y MFA, ni en los medios MSOR, MSON y MSO, ni en los medios MSAR, MSAN, MSA ni en la media de viabilidad celular comparada entre los 18 medios de criopreservación (pvalue >0,05). (Anexos N°5 y 7).

IV.6 COMPARACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR POSTDESCONGELAMIENTO CON AZUL DE TRIPAN PROVENIENTE DE MUESTRAS CONGELADOS EN FORMA DE FRAGMENTOS Y EN FORMA AISLADA:

La viabilidad de las muestras congeladas como fragmentos (n=44) y células aisladas (n=32) fueron evaluadas con azul de tripán. Los fragmentos fueron congelados de dimensiones de 8mm x 2 mm x 2 mm con un peso aproximado de $22,7 \pm 2,24$ mg. Las muestras de fragmentos permanecieron a -196°C entre 1 y 166 días (Anexo N°2); observándose, con azul de Tripán, la viabilidad más alta postdescongelamiento de 95% (Muestra N°1) congelada durante 1 día a -196°C fue congelada en el medio MTON (Muestra N°01, anexo 2 y 4) y de 99% (muestra N°39, anexo 2 y 4) cuando los fragmentos fueron congelados durante 166 días en nitrógeno líquido a -196°C en el medio MSAN (p>0,05). Cuando se evaluó la viabilidad de las células congeladas en

forma aislada, con azul de Tripán, se observó que luego de 1 día a -196°C (Muestra N°1) se observa la viabilidad más alta de 68% en el medio MTOR (Anexos 3 y 5) y luego de 148 (Muestra N°16) y 116 días (Muestra N°17) se observaron viabilidades con azul de Tripán de 52,5% y 85,5% en el medio MSA y MTAN postdescongelamiento respectivamente (Anexo 3 y 5) sin mostrar diferencias significativas entre las muestras ($p>0,05$).

En la Tabla 7 se muestra comparativamente la viabilidad de las células espermatozonales posterior al descongelamiento de fragmentos en el cual se observa la media de viabilidad postdescongelamiento en 44 muestras congeladas en forma de fragmentos versus 32 muestras congeladas en forma aislada, mostrando el Error estándar en cada medio analizado, de acuerdo al Criterio propuesto por este trabajo de investigación en relación a la viabilidad postdescongelamiento como muestras Buenas con $\geq 45\%$ de viabilidad y regulares $<45\%$ de viabilidad.

Observamos que existe el mayor porcentaje de viabilidad ($75,81\pm 3,25$, cuyo valor ascendió a 58% en una muestra que permaneció congelada durante 151 días a -196°C) en las células espermatozonales provenientes de fragmentos descongelados en el medio MSA en relación a las células aisladas descongeladas ($54,67\pm 4,07$), en muestras Buenas ($p<0,05$). Asimismo, se observan diferencias significativas en la viabilidad celular postdescongelamiento cuando se compara la viabilidad celular postdescongelamiento congelados en forma de fragmentos y células aisladas, en los medios MTON, MTO, MTAR, MTAN, MTA, MTOR, MFOR, MFO, MFAR, MFAN, MSOR, MSON, MSO, MSAR, MSAN y MSA ($p\text{-value} < 0,05$). En muestras Buenas, se observa diferencia significativa en los medios MTOR, MTON, MTO, MTAR, MTAN, MTA, MTOR, MFOR, MFO, MFAR, MFAN, MSON, MSO, MSAR, MSAN y MSA

(pvalue <0,05). En las muestras tipificadas como regulares, se observa diferencia significativa en los medios MTON, MTO, MTAR, MTA, MTOR, MFO, MFAR, MFAN, MSOR, MSON, MSAR, MSAN y MSA (pvalue <0,05). (Fig. N° 15 y 16)

No obstante, en las muestras Totales al comparar la viabilidad entre los medios MTORf y MTORc no existe diferencias significativas (Tabla N° 7) entre ambos ($p=0,18$) y entre los medios MFAf y MFAc ($p=0,055$). En cambio, en los 14 medios restantes formulados y analizados en este estudio, si se observan diferencias significativas en la viabilidad (pvalue <0,05) entre las células espermatogoniales provenientes de fragmentos y las células espermatogoniales congeladas en forma aislada (**Tabla N° 7**).

Tabla N°7. Comparación de la viabilidad con azul de tripán postdescongelamiento de las células espermatozonales provenientes de fragmentos y células congeladas en forma aislada.

De acuerdo al criterio propuesto en este trabajo de investigación
(Totales, Buenos y Regulares)

MEDIOS	Media $\pm$ Error estándar								
	TOTALESf	TOTALESc	pvalue	BUENOSf	BUENOSc	pvalue	REGULARESf	REGULARESc	pvalue
1 MTOR	52,27 $\pm$ 3,80	45,36 $\pm$ 3,57	p=0,18	66,9 $\pm$ 4,38	54,24 $\pm$ 4,45	p<0,05	37,38 $\pm$ 4,45	37,59 $\pm$ 4,79	p=0,89
2 MTON	58,57 $\pm$ 3,83	39,34 $\pm$ 3,34	p<0,05	73,75 $\pm$ 4,58	52,49 $\pm$ 4,63	p<0,05	43,73 $\pm$ 5,89	27,75 $\pm$ 2,46	p<0,05
3 MTO	57,55 $\pm$ 3,45	41,41 $\pm$ 3,2	p<0,05	72,38 $\pm$ 3,44	52,76 $\pm$ 3,88	p<0,05	45,04 $\pm$ 4,26	31,36 $\pm$ 3,54	p<0,05
4 MTAR	60,14 $\pm$ 3,23	37,63 $\pm$ 3,89	p<0,05	75,67 $\pm$ 2,90	51,89 $\pm$ 4,33	p<0,05	53,05 $\pm$ 8,84	25,10 $\pm$ 4,45	p<0,05
5 MTAN	55,43 $\pm$ 4,43	39,47 $\pm$ 3,67	p<0,05	71,89 $\pm$ 4,72	50,77 $\pm$ 4,26	p<0,05	34,40 $\pm$ 8,09	29,48 $\pm$ 4,72	p=0,61
6 MTA	61,91 $\pm$ 3,61	39,19 $\pm$ 3,80	p<0,05	74,91 $\pm$ 3,51	53,02 $\pm$ 5,03	p<0,05	53,76 $\pm$ 7,50	26,89 $\pm$ 3,60	p<0,05
7 MFOR	54,25 $\pm$ 3,90	38,16 $\pm$ 3,37	p<0,05	67,90 $\pm$ 4,56	51,5 $\pm$ 3,61	p<0,05	32,48 $\pm$ 5,55	26,32 $\pm$ 3,60	p=0,23
8 MFON	54,48 $\pm$ 4,18	37,75 $\pm$ 3,65	p<0,05	71,53 $\pm$ 4,22	53,47 $\pm$ 3,69	p<0,05	33,26 $\pm$ 7,69	23,97 $\pm$ 3,54	p=0,32
9 MFO	59,02 $\pm$ 3,96	40,53 $\pm$ 3,87	p<0,05	73,87 $\pm$ 3,55	57,24 $\pm$ 4,11	p<0,05	46,13 $\pm$ 6,75	25,79 $\pm$ 3,55	p<0,05
10 MFAR	54,57 $\pm$ 3,67	38,03 $\pm$ 3,88	p<0,05	64,98 $\pm$ 5,30	48,91 $\pm$ 5,21	p<0,05	47,34 $\pm$ 5,37	28,40 $\pm$ 4,66	p<0,05
11 MFAN	54,25 $\pm$ 3,92	38,34 $\pm$ 3,65	p<0,05	68,00 $\pm$ 4,54	52,35 $\pm$ 5,29	p<0,05	40,05 $\pm$ 6,59	25,90 $\pm$ 2,59	p<0,05
12 MFA	52,23 $\pm$ 3,82	41,91 $\pm$ 4,07	p=0,055	63,12 $\pm$ 4,62	54,81 $\pm$ 4,86	p=0,20	41,73 $\pm$ 7,54	30,33 $\pm$ 4,94	p=0,125
13 MSOR	52,57 $\pm$ 3,97	39,84 $\pm$ 3,50	p<0,05	61,56 $\pm$ 4,66	54,11 $\pm$ 4,06	p=0,152	47,34 $\pm$ 5,37	27,27 $\pm$ 3,31	p<0,05
14 MSON	56,84 $\pm$ 3,66	37,69 $\pm$ 3,35	p<0,05	70,36 $\pm$ 3,30	48,76 $\pm$ 4,35	p<0,05	50,43 $\pm$ 5,66	28,03 $\pm$ 3,71	p<0,05
15 MSO	59,57 $\pm$ 3,54	41,47 $\pm$ 3,04	p<0,05	72,17 $\pm$ 2,69	54,15 $\pm$ 2,94	p<0,05	42,40 $\pm$ 8,89	30,26 $\pm$ 3,23	p=0,169
16 MSAR	53,70 $\pm$ 3,56	38,09 $\pm$ 3,68	p<0,05	65,55 $\pm$ 4,11	51,08 $\pm$ 4,52	p<0,05	44,73 $\pm$ 6,52	26,64 $\pm$ 4,01	p<0,05
17 MSAN	60,66 $\pm$ 3,64	39,31 $\pm$ 3,81	p<0,05	73,49 $\pm$ 3,55	57,17 $\pm$ 3,59	p<0,05	49,71 $\pm$ 6,24	23,51 $\pm$ 3,13	p<0,05
18 MSA	59,20 $\pm$ 3,66	42,59 $\pm$ 3,55	p<0,05	75,81 $\pm$ 3,25	54,67 $\pm$ 4,07	p<0,05	40,55 $\pm$ 3,78	31,81 $\pm$ 4,27	p<0,05

Los datos son expresados como media% $\pm$ Error estándar. Prueba de Contraste - Kruskal Wallis, considera diferencia significativa p<0,05. TOTALESf: Media porcentual de la Viabilidad post descongelamiento en Muestras totales provenientes de fragmentos congelados. TOTALESf: Media porcentual de la Viabilidad de Muestras totales provenientes de células congeladas en forma aislada. BUENOSf: Media porcentual de la Viabilidad post descongelamiento en Muestras Buenos provenientes de fragmentos congelados. BUENOSf: Media porcentual de la Viabilidad de Muestras Buenos provenientes de células congeladas en forma aislada. REGULARf: Media porcentual de la Viabilidad post descongelamiento en Muestras regulares provenientes de fragmentos congelados. REGULARf: Media porcentual de la Viabilidad post descongelamiento en Muestras regulares provenientes de células congeladas en forma aislada

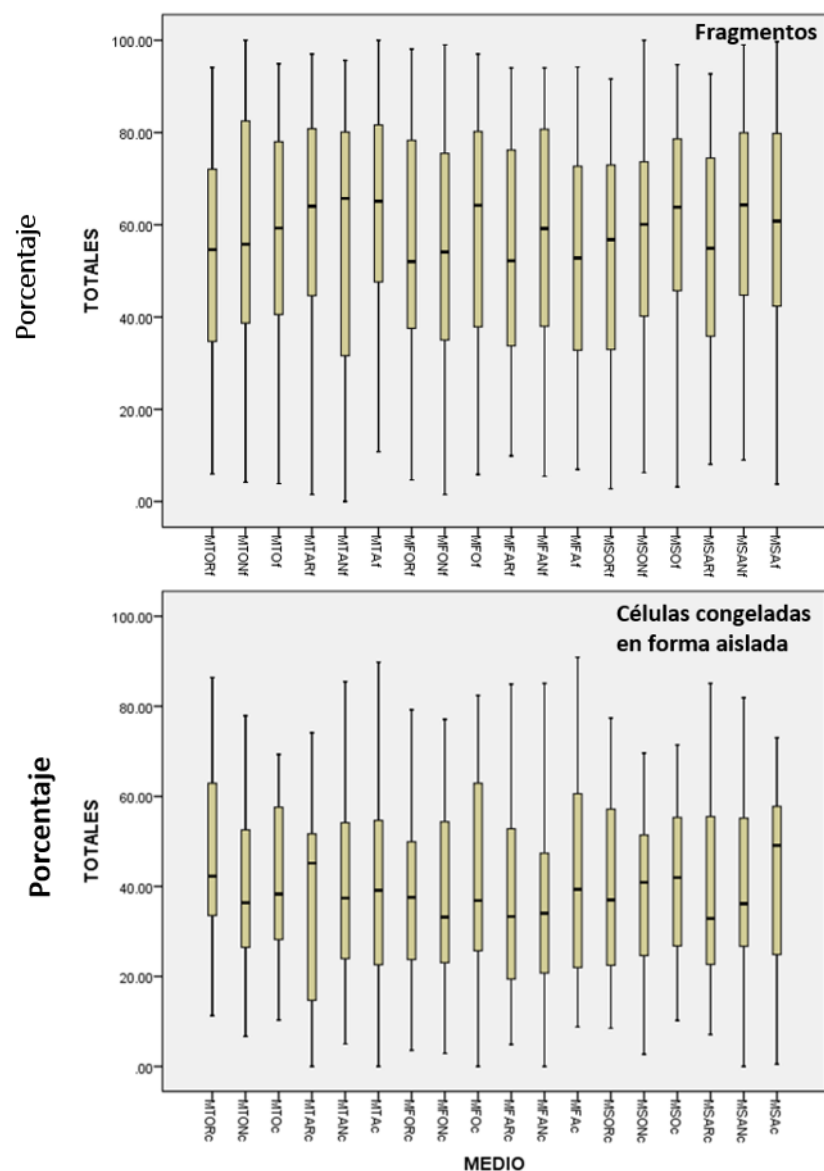


Fig. N°18. Comparación de la viabilidad celular en muestras Totales entre células congeladas en fragmentos y en forma aislada (Azul de Tripán)

El porcentaje de viabilidad postdescongelamiento es mayor en las muestras de SSC provenientes de fragmentos que de células congeladas en forma aislada (Fig. N°18) siendo el porcentaje promedio $\pm$ EE de viabilidad más alto ($75,81\% \pm 3,25$). En las muestras **Buenas** provenientes de fragmentos descongelados (Fig. N°19) observamos

diferencia significativa en el medio MSAf en relación a las muestras congeladas en forma aislada MSAc ($54,67\% \pm 4,07$) con $p\text{value} < 0,05$.

Por otra parte, el porcentaje más alto observado en las células aisladas descongeladas en las muestras Buenas es en el medio MFOc ($57,24\% \pm 4,11$) y que en fragmentos el MFOf asciende a $73,87\% \pm 3,55$ ($p\text{value} < 0,05$) (Tabla N°7, Fig. N°18).

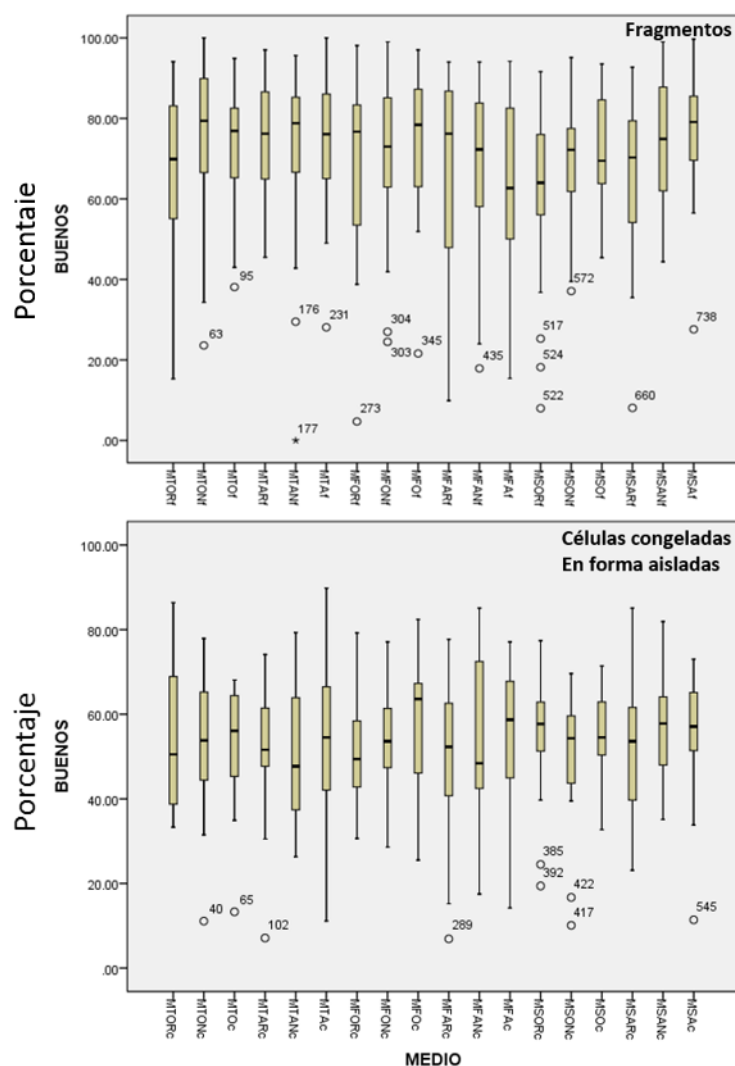


Fig. N°19. Comparación de la viabilidad celular en células congeladas en fragmentos y en forma aislada en muestras Buenas (Azul de Tripán) Media $\pm$ EE.

IV.7 DETERMINACION DE sDBA+, wDBA+, DBA-, sMITOSENSE+, wMITOSENSE+ y 7AAD+ POSTDESCONGELAMIENTO.

IV.7.1 DESCONGELAMIENTO DE FRAGMENTOS

Mediante citometría de flujo se utilizó una muestra conteniendo 1'000,000 de células espermatogoniales de alpaca postdescongelamiento procedentes tanto de fragmentos, así como de suspensiones celulares postdescongelamiento y se analizaron 10,000 células de acuerdo a los criterios preestablecidos donde se puede observar entre 500 y 1000 células madre espermatogoniales (sDBA+). La sonda DBA identificó a las SSC “*strong DBA+*” (sDBA), SSC en diferenciación temprana tipificadas como “*weakly DBA+*” (wDBA+) y células redondas negativas a DBA que son diferenciadas (DBA-) (Fig. N° 20).

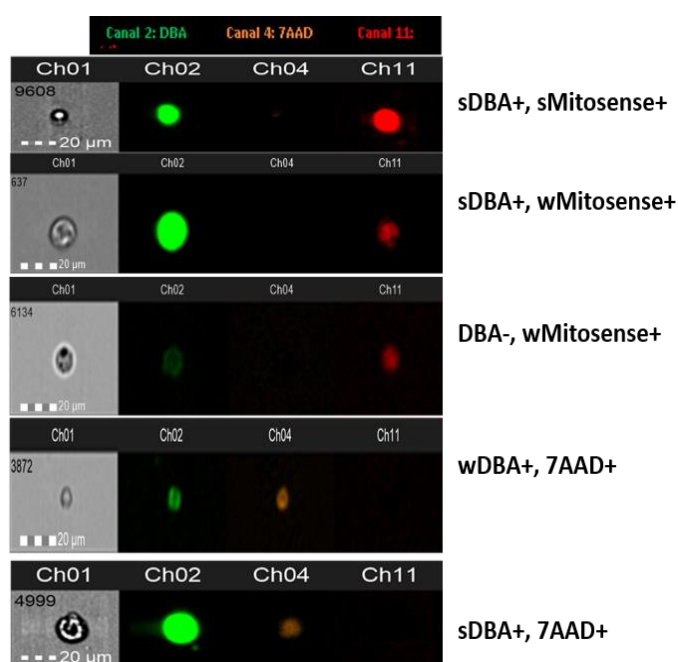


Fig. N°20: Células madre de alpaca postdescongelamiento evaluadas con DBA y FlowCollect™ Mitopotential red Kit mediante CF. Arriba: Ch01: Canal 1 Observación contraste de fase. Ch02: Canal 2, DBA positivo. Ch04: Canal 4 7AAD, Ch11:

Mitosense. Caracterizadas con sDBA+ (SSC), wDBA+ (SSC en diferenciación temprana), DBA- (célula diferenciada), sMitosense+ (Con alto potencial mitocondrial), wMitosense+ (En apoptosis temprana) y 7AAD+ (Necrosis).

Se evaluaron 8 muestras mediante CF en forma de fragmentos y 8 muestras en forma de células aisladas con los 18 medios crioprotectores. Los datos obtenidos de la evaluación en el citómetro para cada lectura fueron analizados con el software IDEAS, lo que produjo información a través de 144 gráficos para Fragmentos (Anexo 6) y 144 gráficos para células (anexo 7). Células frescas espermatozonales aisladas fueron usadas como control positivo del marcador Mitosense y células frescas expuestas a UV fueron usadas como control positivo del marcador de Necrosis (7AAD+). En la Fig. N°20 y Fig. N°21 se puede observar la el área analizada y los histogramas de intensidad de los fluorocromos DBA (sDBA+, wDBA+, DBA), 7AAD (7AAD+ y 7AAD-) y D y Mitosense (sMitosense+, wMitosense+ y 7AAD+).

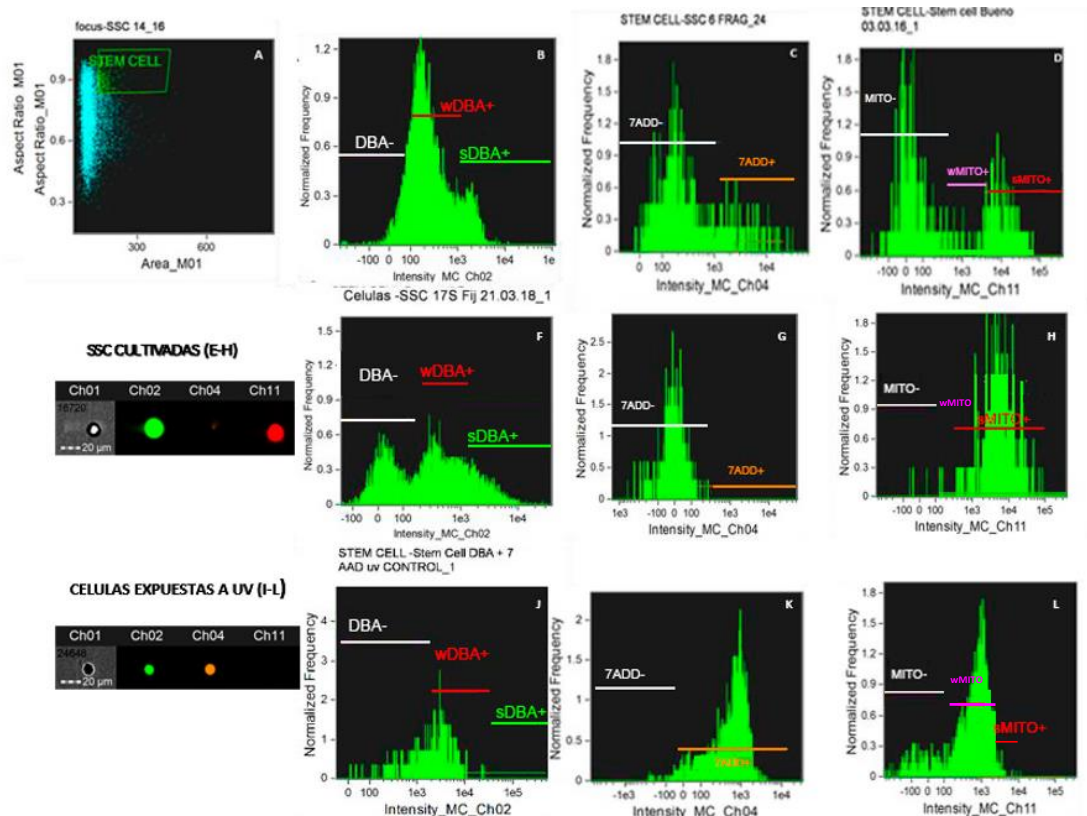


Fig. N°21: ARRIBA: Células descongeladas (A-D): A) Área analizada mediante CF. **B)** Histograma de la intensidad de DBA donde se puede observar las células sDBA+, wDBA+ y DBA- (Canal 2). **C)** Histograma de la intensidad de 7AAD donde se observan 7AAD+ y 7AAD- (Canal 4) **D)** Histograma de la intensidad de la sonda Mitosense como: sMito+, wMITO+ y MITO- (Canal 11). **CENTRO: Células cultivadas (E-H): E)** SSC cultivadas con alto potencial mitocondrial (Control positivo Mitosense). **F)** Histograma DBA, **G)** Histograma 7AAD, **H)** Histograma Mitosense. **ABAJO: Células expuestas a UV (I-L). I)** positiva a 7AAD+ (Necrosis), **J)** Histograma DBA, **K)** Histograma 7AAD (Control positivo a 7AAD), **L)** Histograma Mitosense.

Cuando se incluyen las muestras Totales (n=8), congeladas en forma de fragmentos (Fig. N°22, Anexo N°9), no se observa diferencia significativa en el porcentaje de: sDBA+, wDBA+, DBA-, sMitosen, wMitosen ni 7AAD+, ni cuando se comparan los porcentajes entre Grupo 1: MTOR, MTON, MTO; ni entre Grupo 2: MTAR, MTAN, MTA; ni entre Grupo 3: MFOR, MFON, MFO; ni Grupo 4: MFAR, MFAN, MFA; ni en Grupo 5: MSOR, MSON, MSO, ni en Grupo 6: MSAR, MSAN, MSA; ni entre los 18 medios utilizados (pvalue >0,05).

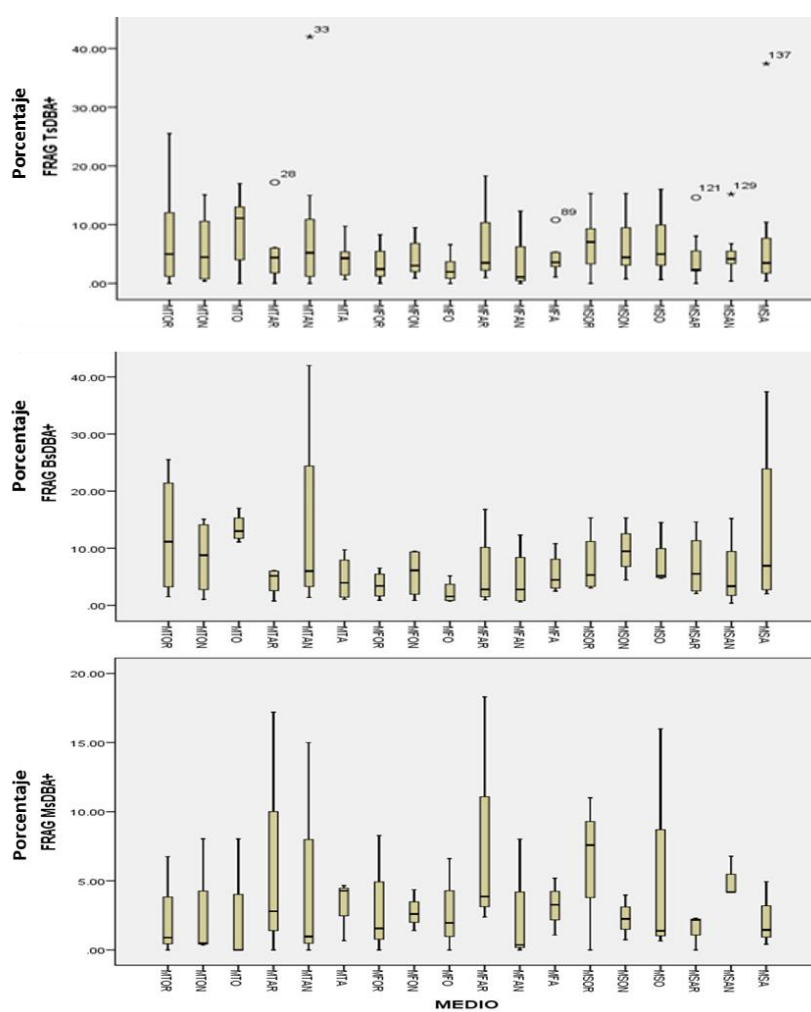


Fig. N°22. Distribución porcentual de las sDBA+ proveniente de Fragmentos descongelados en muestras Totales (FRAGTsDBA+), Buenas (FRAG BsDBA+) y Malas (FRAG MsDBA+) (pvalue >0,05).

Por otro lado, cuando las muestras son agrupadas como **Buenas** (Con alto potencial de actividad mitocondrial >50% porcentaje de células sMitosen+ postdescongelamiento) provenientes de Fragmentos (**n=4**) no se observa diferencia significativas ($p>0,05$) en sMitosen; en cambio si existe diferencia significativa en el porcentaje de células en apoptosis temprana (wMitosen+) entre los medios del Grupo 3: MFOR($19,77\%\pm 7,04$), MFON ($13,27\%\pm 5,09$) y MFO ($35,0\%\pm 2,86$), lo que indica que el menor porcentaje de apoptosis temprana es en presencia de maca JUVENS, siendo el menor porcentaje presentado teniendo como suplemento en el medio de criopreservación MFON con presencia de Maca negra JUVENS con un pvalue $<0,05$ (Anexo N°10). Cuando contrastamos y comparamos los ACP permeables DMSO vs DMA sólo se observa diferencia significativa en el porcentaje wMitosen+ entre MFON ($13,27\pm 5,09$) y MFAN ($31,45\pm 6,97$) (pvalue $<0,05$) siendo MFO ($35\pm 2,86$) y MFA ($28,6\pm 3,77$), siendo menor el porcentaje de apoptosis temprana en el medio MFOR. Por otra parte, se ha observado diferencia en el porcentaje de células sDBA+ proveniente de fragmentos descongelados en los medios MTO ($13,52\pm 1,27\%$), MFO ($2,27\pm 1,01$) y MSO ($7,41\pm 2,37$) (pvalue $<0,05$).

En cambio, en las muestras de animales considerados como **Malas** (**n=4**) clasificadas de acuerdo al porcentaje de sMitosen+ ($<50\%$) postdescongelamiento (Anexo N°11), en las células provenientes de fragmentos descongelados, observamos que si existe diferencia significativa en el porcentaje de 7AAD+ (necrosis) en el Grupo 5: MSOR, MSON y MSO así como en el grupo 6: MSAR, MSAN y MSA (pvalue $<0,05$). Se ha observado diferencias significativas entre los porcentajes de células 7AAD+ (necrosis) obtenido en los medios MFOR y MFAR así como entre MSOR y MSAR (pvalue $<0,05$).

Asimismo, Se ha encontrado diferencia significativa en los porcentajes de sDBA+ entre las células congeladas en los medios MSON y MSAN (pvalue<0,05).

IV.7.2 DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS AISLADAS:

Cuando se analizan **Todas** (Anexo N°12) las muestras de células agrupadas (n=8) se observa diferencia en el porcentaje de SSC en diferenciación temprana (wDBA+) en los medios MFOR vs MFAR, en DBA- en las células congeladas en los medios MFON vs MFAN (pvalue<0,05). Asimismo, se observa diferencia en las células en apoptosis temprana (wMitosense+) en las células congeladas en el medio MTON vs el medio MTAN (pvalue <0,05).

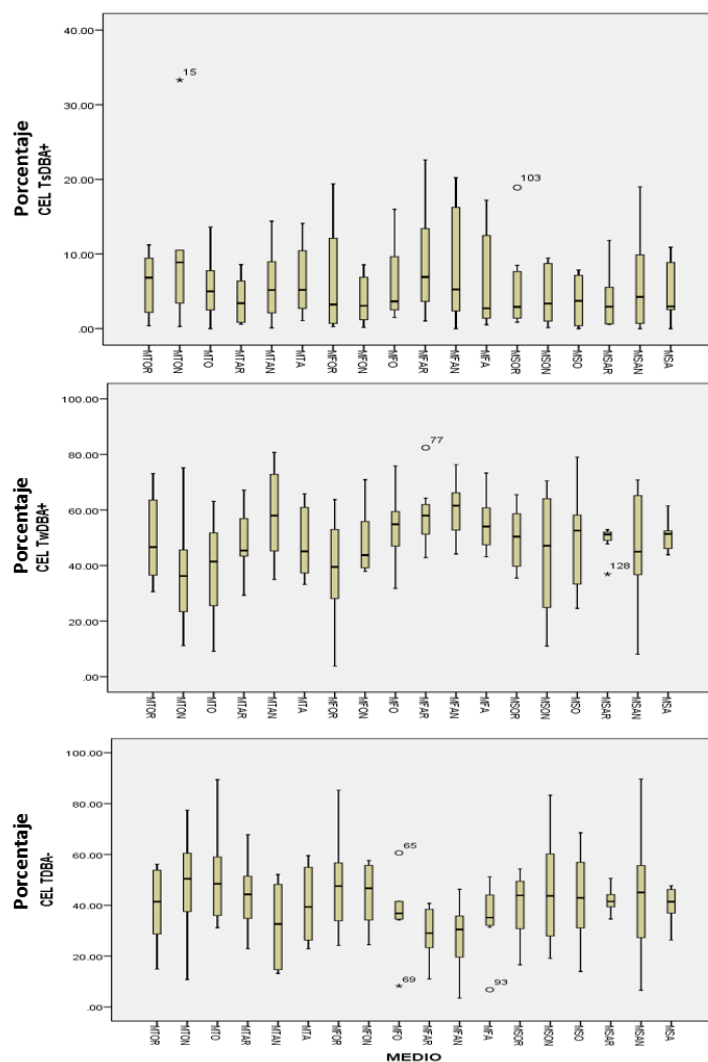


Figura N°23. A) Porcentaje de SSC (TsDBA⁺), B) SSC en diferenciación temprana (TwDBA⁺) y C) células espermatogoniales redondas diferenciadas (TDBA⁻) en Todas las muestras congeladas en forma aislada. Se expresa en Media $\pm$ EE. MTOR, MTON, MTO (p value >0,05), MTAR, MTAN, MTA (p value >0,05), MFOR, MFON, MFO (p value >0,05), MFAR, MFAN, MFA (p value >0,05), MSOR, MSON, MSO (p value >0,05), MSAR, MSAN, MSA (p value >0,05).

Por otro lado, en las muestras consideradas **Buenas** sólo se observa diferencia significativa en los porcentajes de wDBA+ y DBA- en los medios MFOR vs MFAR (pvalue <0,05) (Fig. N°22, Anexo N°13).

En las muestras consideradas como **Malas** (Anexo N°14) no existe diferencias significativas entre los Grupos 1 al 6, ni entre los 18 medios de criopreservación (pvalue >0,05).

IV.7.3 DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS AISLADAS vs FRAGMENTOS:

En las muestras Totales (Fig. N°24, Anexo N°15), Buenas (Fig. N°25, Anexo N°16) y Malas (Anexo N°17), proveniente de fragmentos y de células aisladas postdescongelamiento no se observaron diferencias en relación a las células sDBA+ (Anexo 15) entre los medios de los Grupos 1(MTOR-MTON-MTO), Grupo 2(MTAR-MTAN-MTA), Grupo 3(MFOR-MFON-MFO), Grupo 4(MFAR-MFAN-MFA), Grupo 5(MSOR-MSON-MSO), ni en los medios del Grupo 6 (MSAR-MSAN-MSA) (p>0,05). En cambio, si existe diferencia significativa (p<0,05) entre las células vs fragmentos en las células en diferenciación temprana (TwDBA+) en el medio MTON, MTO, MTAR, MFOR, MFA,MSOR y MSAN observándose un mayor porcentaje de células wDBA+ en las células provenientes de fragmentos postdescongelamiento (Anexo 15) observándose un nivel máximo de células wDBA+ en el medio MSAN conteniendo maca negra JUVENS observándose 71,23±3,24% en células provenientes de fragmentos descongelados en comparación a las células congeladas en forma aislada donde se observa 46,58±7,41% de wDBA+. Asimismo, se observa diferencia significativa en las células DBA- (p<0,05) en los medios MTO, MSOR,MSO, MSAR, MSAN y MSA con

un mayor porcentaje en las células congeladas en forma aislada, observándose el nivel más alto en el medio MTO de $50,94 \pm 6,76\%$ postdescongelamiento. No se observa diferencia significativa entre las células con alto potencial de membrana mitocondrial, apoptosis temprana o necrosis (Anexo 15).

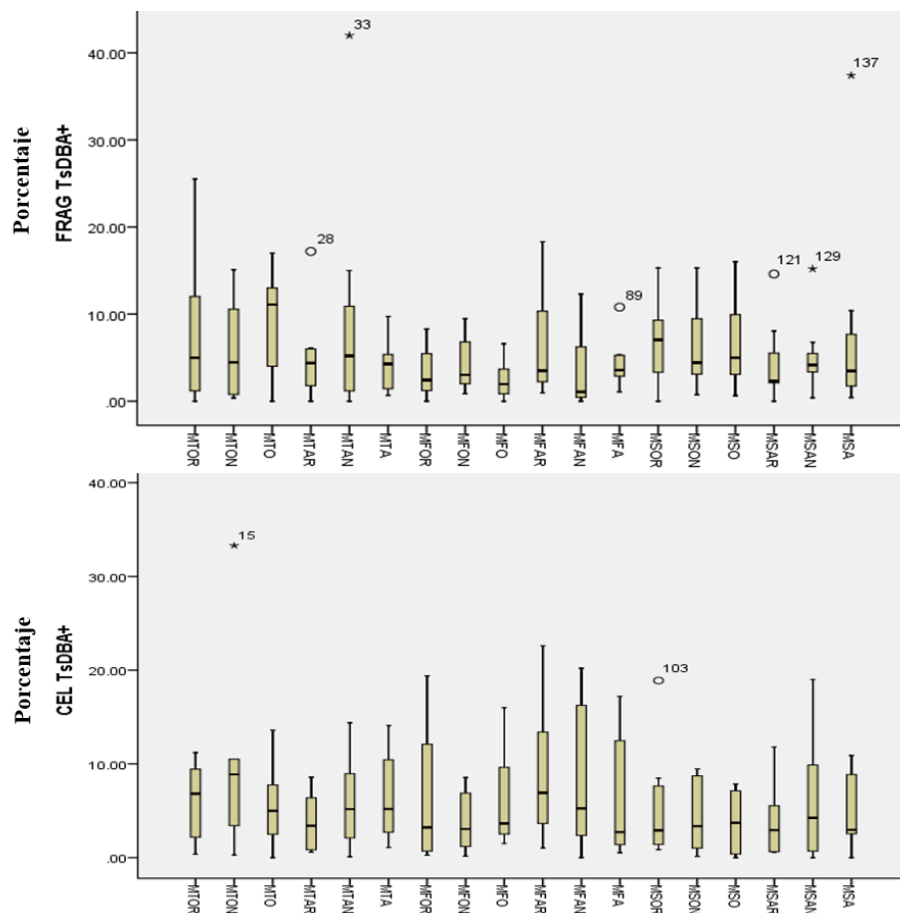


Fig. N°24. Porcentaje ($X \pm EE$) de células TsDBA+ en fragmentos (FRAG TsDBA) y en células congeladas en forma aislada (CEL TsDBA+) evaluadas mediante CF.

El porcentaje de SSC (Frag BsDBA+) es mayor en las células proveniente de fragmentos descongeladas (Anexo N° 16, Fig. N°24). Por otro lado, en las células BwDBA+ se observa que existe diferencia significativas en el Grupo 3: MFOR (33,80 ± 4,96%)-MFON(44,42 ± 5,63%)-MFO (53,50 ± 1,71%) (pvalue<0,05) (Anexo 16, Fig. N°26).

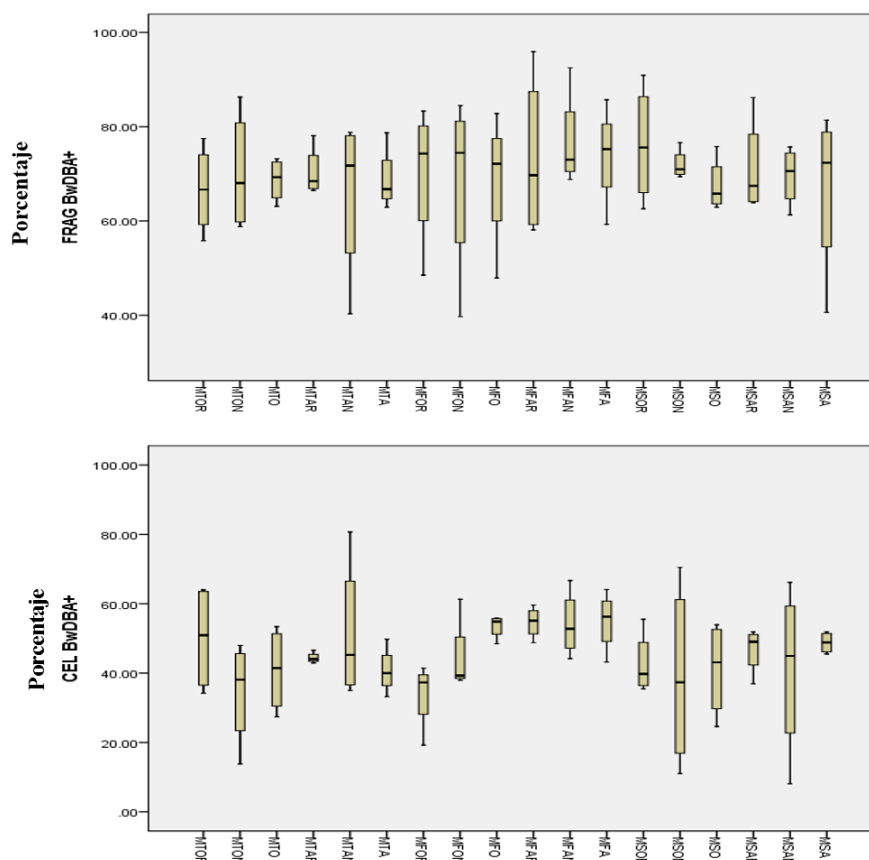


Fig. N°26. Porcentaje ($X \pm EE$) de células BwDBA+ en fragmentos (FRAG BwDBA) y en células aisladas (CEL BwDBA+) evaluadas mediante CF postdescongelamiento.

Por otra parte, al comparar entre fragmentos y células congeladas en forma aislada en las células BwDBA+ (Fig. N°26, Anexo 16) se observa diferencias significativas en los medios: MTON, MTO, MTAR, MTA, MFOR, MFON, MFAR, MFAN, MFA, MSOR, MSON, MSO, MSAR, MSAN siendo mayor los porcentajes de células madre en diferenciación temprana (BwDBA+) en fragmentos (pvalue<0,05).

The figure consists of two vertically stacked box plots. The top plot is titled 'FRAG BDBA+' and the bottom plot is titled 'CEL BDBA+'. Both plots share the same x-axis, labeled 'MEDIO', with 15 categories: H2O, H2O-N, HFO, HFO-N, HFO-NH, HFO-NH-N, HFA, HFA-N, HFA-NH, HFA-NH-N, HSO, HSO-N, HSO-NH, HSO-NH-N, and HSA. The y-axis for both plots is labeled 'Porcentaje' (Percentage). The top plot's y-axis ranges from 0.00 to 60.00, while the bottom plot's y-axis ranges from 0.00 to 100.00. Each box plot shows the median (horizontal line inside the box), the interquartile range (the box itself), and the full range of the data (the whiskers). The data indicates that for most media, the percentage of FRAG BDBA+ is lower than the percentage of CEL BDBA+, and both generally increase with the BDBA+ value of the media, though with significant variability.

IV.8 POTENCIAL MITOCONDRIAL POSTDESCONGELAMIENTO DETERMINADA MEDIANTE CF CON LAS SONDAS MITOSENSE Y 7AAD:

Mediante el análisis dual de los fluorocromos del Mitopotential Red Kit (MITOSENSE y 7AAD) se pudo discriminar a las células saludables con alto potencial de membrana mitocondrial como células vivas (Live), a las células con bajo potencial mitocondrial como células que han iniciado apoptosis celular (Early apop) y células en en necrosis (Dead) positivas a 7AAD (Fig. N°28).

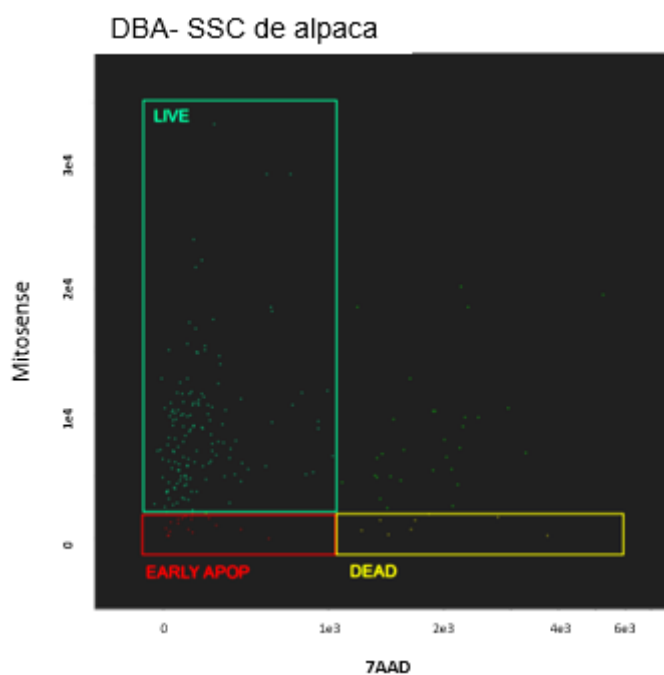


Fig. N°28. Análisis de Dot Plot de Mitosense y 7AAD en células espermatogoniales postdescongelamiento mostrando tres poblaciones celulares de acuerdo a la intensidad de sMitosense+ (Live), wMitosense+(Early apoptosis) and 7AAD+ (Dead, Necrosis).

Se realizó la clasificación de las muestras como Totales (TsMitosense+), Buenas (BsMitosense) y malas (MsMitosense) de acuerdo a su potencial mitocondrial tanto para fragmentos (Anexo N°9) como para células aisladas (Anexos N°12).

En fragmentos testiculares totales, no existe diferencias significativas ($pvalue > 0,05$) entre el porcentaje de TsDBA+, TwDBA+ ni DBA-, TsMitosense+, TwMitosense+ ni T7AAD+ en los 18 medios evaluados, cuando se analizan de a tres (MTOR-MTON-MTO, MTAR-MTAN-MTA, MFOR-MFON-MFO, MFAR-MFAN-MFA, MSOR-MSON-MSO, MSAR-MSAN-MSA) (Anexo 15).

Por otro lado, se observó el porcentaje más alto de células sMitosense+ en presencia de Dimetilsulfóxido, trehalosa y suplementado con Maca negra (Medio MTON) en las muestras totales y Buenas, siendo en las Muestras Totales, el porcentaje medio $\pm$ Error estandar más alto de $36,85\% \pm 10,30$ (TsMitosense+); $40,78\% \pm 9,68$ (TwMitosense+) y $16,37\% \pm 15,63$ (T7AAD+) (Anexo N° 15) en células procedentes de fragmentos desongelados. Asimismo, cuando analizamos las muestras **Buenas** ($>50\%$ de potencial de membrana mitocondrial activo en al menos uno de los medios evaluados) se observa de igual forma que el porcentaje más alto de células con un alto potencial de membrana mitocondrial se encuentra en el medio MTON el cual asciende a $57,20\% \pm 9,57$ (BsMitosense+), $23,7 \pm 23,7\%$ (BwMitosense+) y $11,15\% \pm 5,38$ (B 7AAD+) con $pvalue > 0,05$ (Anexo N°16). En las muestras Malas el porcentaje más alto de BsMitosense en fragmentos asciende a $22,0\% \pm 11,30$ (MsMitosense+) en el medio MSAR ($pvalue > 0,05$), (Anexo N°17).

Por otro lado, en apoptosis temprana BwMitosense (Frag) postdescongelamiento en muestras **Buenas**, se observa que el porcentaje de células en apoptosis temprana en el medio MFOR es $19,77 \pm 13,27$ y MFON $13,28 \pm 5,09$ existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) en relación al medio MFO ($35 \pm 2,86$) lo que sugiere un rol protector de maca

Roja y negra a la apoptosis temprana en células provenientes de fragmentos congelados. De igual forma, al comparar la apoptosis temprana BwMitosense+(Cell) en células congeladas en forma aislada, en muestras **Buenas** observamos que existe diferencias significativas entre MFOR(17,98±5,88), MFON (23,47±8,66) con MFO (19,15±3,48) siendo menor en presencia de Maca roja.

No existe diferencias significativas entre muestras TsMitosense+ y BsMitosense ni entre TsMitosense+ y las células MsMitosense tanto en células proveniente de fragmentos como de células aisladas ($p>0,05$) (Figuras N°26 y 27).

En cambio, en muestras de fragmentos existe diferencias significativas entre las muestras BsMitosense+ y MsMitosense+ en el medio MTOR ($53,77 \pm 2,55 \%$ y $10,16 \pm 5,83 \%$), MTAN ($49,88 \pm 4,77\%$ y $7,9\% \pm 4,24$), MFOR ($51,18 \pm 10,63\%$ y $17,43 \pm 11,22 \%$), MFON ($55,10 \pm 5,37 \%$ y $12,78 \pm 6,99\%$), MFO ($40,45 \pm 5,70\%$ y $7,08 \pm 2,53\%$), MFAR ($48,18 \pm 9,51\%$ y $8,24 \pm 4,68\%$), MFAN ($40,55 \pm 5,26\%$ y $12,17 \pm 7,09\%$), MFA ($47,28 \pm 8,40\%$ y $8,07 \pm 4,38\%$), MSON ($48,53 \pm 10,46\%$ y $12,41 \pm 5,19\%$) y MSAN ($45,85 \pm 5,21\%$ y $13,81 \pm 4,68\%$) respectivamente ($p\text{value} < 0,05$) (Fig. N°28, Anexos N° 16 y 17).

Por otro lado, en células proveniente de fragmentos descongelados categorizadas (de acuerdo a la propuesta de este trabajo) como muestras **Buenas** se observó el mayor porcentaje de BsMitosense+ (Frag) el cual fue $57,20 \pm 9,57\%$ en el medio MTOR sin mostrar diferencia significativa con MTOR ni MTO ($p\text{value} > 0,05$) (Anexo N° 16) ni con los otros medios del estudio.

En células aisladas (Fig. N°30, Anexo 16), el mayor valor de media $\pm$ EE de BsMitosense (Cell) observada fue de $63,68 \pm 8,90\%$ en el medio MSON sin mostrar diferencias significativas con MSOR ni en MSO ($p>0,05$). Asimismo, no se observó diferencias

significativas entre Fragmentos (Fig. N°28) y células aisladas (Fig. N°30) en medio MSON ($p>0,05$).

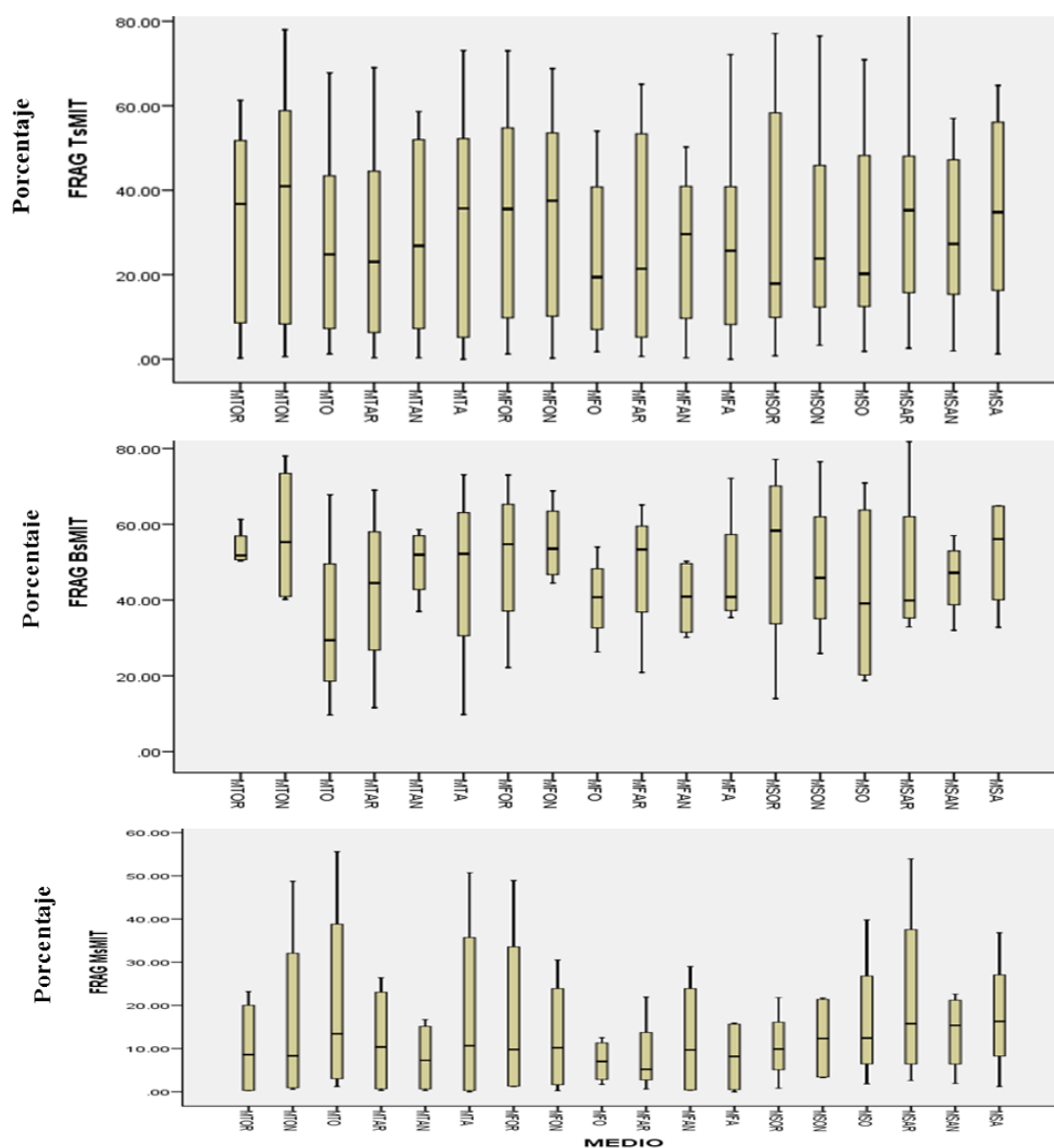


Fig. N°29. Distribución porcentual de células con un alto potencial de membrana mitocondrial en las muestras provenientes de fragmentos postdescongelamiento en muestras Totales (FRAG TsMIT), Buenas (FRAG BsMIT) y Malas (FRAG MsMIT) ($pvalue >0,05$).

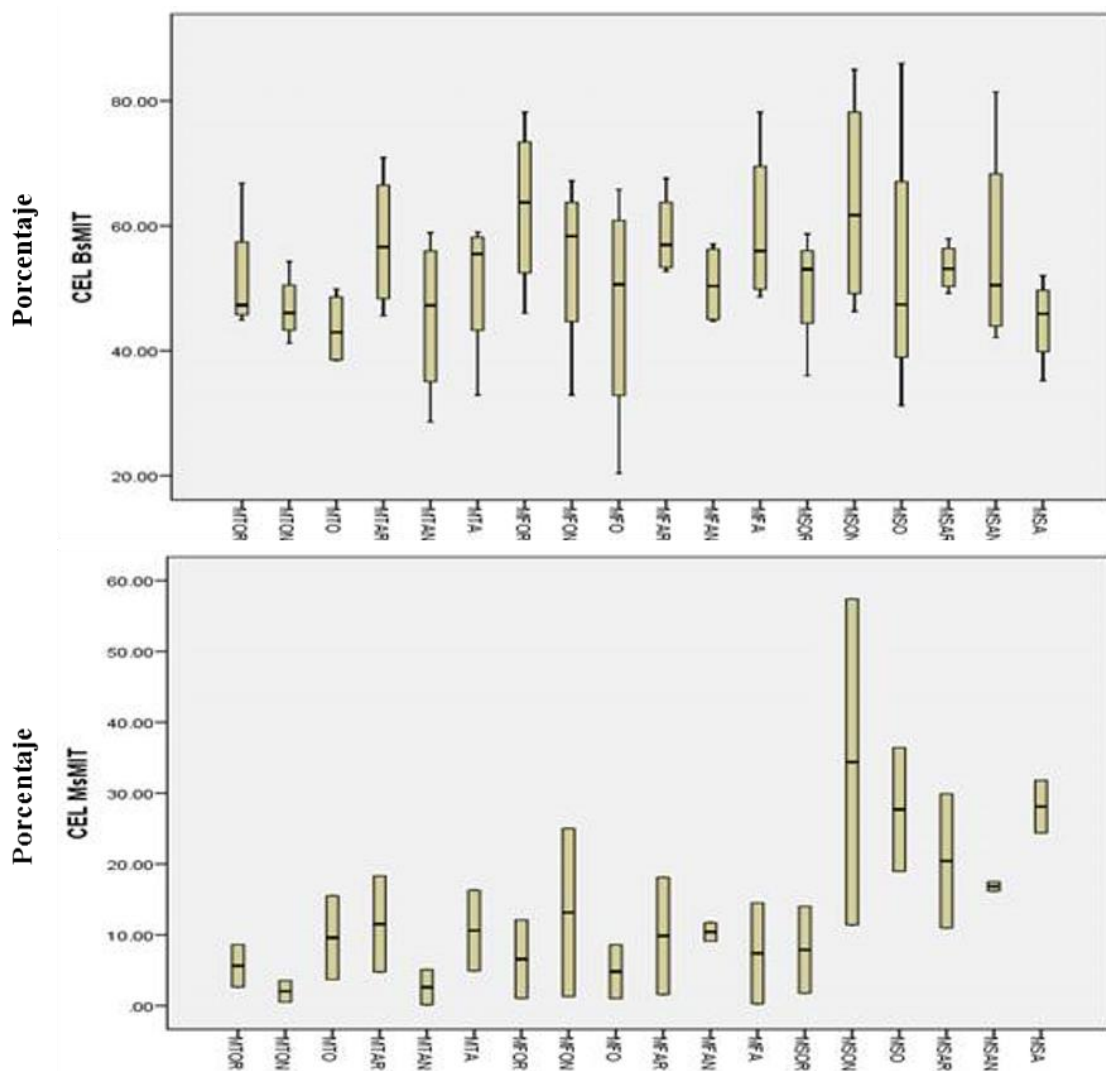


Fig. N°30. Alto potencial de membrana mitocondrial en las células congeladas en forma aislada postdescongelamiento en muestras Totales (CEL TsMIT), Buenas (CEL BsMIT) y en muestras Malas (CEL MsMIT).

IV.8.1 COMPARANDO LOS TIPOS DE MACA JUVENS (ROJA – NEGRA) VS CONTROL (SIN MACA)

En muestras **buenas**, en BsMitosen (Cell) en el medio MFOR ($62,93 \pm 6,88\%$), MFON ($54,20 \pm 7,44\%$) y MFO ($46,85 \pm 9,76\%$) se observa diferencia significativa ($pvalue < 0,05$) entre MFOR y MFO así como entre MFON y MFO. En muestras **malas**, las células provenientes de FRAG M 7AAD+ entre los medios MSOR ($21,56 \pm 1,76\%$),

MSON ($27,03 \pm 5,80\%$) y MSO ($13,78 \pm 0,03\%$) existe diferencia significativa ($p < 0,05$); así como entre los medios MSAR ($6,70 \pm 2,39\%$), MSAN ($22,5 \pm 1,67\%$) y MSA ($19,55 \pm 3,82\%$) con $p\text{value} < 0,05$.

Por otro lado, al comparar sDBA+, WDBA+, DBA-, sMitosen+, wMitosen+ y 7AAD postdescongelamiento entre las células congeladas en forma aislada y Fragmentos testiculares observamos que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$).

IV.8.2 COMPARANDO LOS MEDIOS CON ACP PERMEABLES (DMSO VS DMA) EN FRAGMENTOS Y CÉLULAS AISLADAS POSTDESCONGELAMIENTO EVALUADAS MEDIANTE CF:

No existe diferencias en las SSC ni en el potencial de membrana mitocondrial en células provenientes de fragmentos MTOR vs MTAR, MTON vs MTAN, MFO vs MFA, ni MSO vs MSA en muestras Totales, Buenas y Malas ($p > 0,05$). En las células congeladas en forma aislada en los medios MTOR vs MTAR, MFO vs MFA, ni MSO vs MSA, MTO vs MTA, ni en el medio MFON vs MFAN, ni en los medios MSOR vs MSAR, ni en MSON vs MSAN en muestras Totales, Buenas y Malas ($p > 0,05$).

En las muestras **Buenas** proveniente de fragmentos se observó que el porcentaje de las BsDBA+ en el medio MTO es de $13,52\% \pm 1,27$ en relación al $4,68\% \pm 2,01$ en el Medio MTA; en Muestras **Malas** (MsDBA+) se observa $2,96\% \pm 2,55$ en el medio MSON y $5,32\% \pm 4,86$ en el medio MSAN mostrando diferencias significativas en ambos casos ($p < 0,05$). Por otra parte, en muestras **Buenas** postdescongelamiento a partir de fragmentos congelados se observa que el porcentaje de células en apoptosis temprana

(BwMitosense+) en el Medio MFON es $13,27\% \pm 5,09$ y en el Medio MFAN es $31,45\% \pm 6,97$ siendo menor en el medio que contiene DMSO ($pvalue < 0,05$).

En muestras congeladas en forma aislada **Totales** TwDBA+ se observa diferencias significativas en en los medios MTON ($37,10\% \pm 7,13$) vs MTAN ($58,47\% \pm 5,84$) y en los medios MFOR ($38,57\% \pm 6,92\%$) vs MFAR ($58,47 \pm 4,16\%$) (Tabla N°14) y en las muestras **Buenas** (BwDBA+) en el medio MFOR ($33,80\% \pm 4,96$) vs MFAR ($54,65\% \pm 2,28$) Tabla N° 15, con $pvalue < 0,05$.

IV.8.3 COMPARANDO LOS MEDIOS CON ACP NO PERMEABLES (FRUCTOSA, TREHALOSA Y SUCROSA) EN FRAGMENTOS Y EN CÉLULAS AISLADAS POSTDESCONGELAMIENTO MEDIANTE CF:

No se observa diferencia en las muestras **Totales** entre los medios MTOR, MFOR y MSOR ni entre los medios MTON, MFON, MSON ni entre los medios MTA, MFA y MSA ($pvalue > 0,05$). En cambio, en el medio MTO-MFO-MSO ($13,52 \pm 1,27\%$, $2,27 \pm 1,01\%$ y $7,41 \pm 2,37\%$ respectivamente) existen diferencias significativas en las células BsDBA+ y los FragBsDBA+ ($pvalue < 0,05$). Se destaca el mayor porcentaje de SSC en el medio MTO congelado en fragmentos en las muestras buenas ($13,52 \pm 1,27\%$). En las células aisladas Cel BwDBA ($p < 0,05$), de igual forma existe diferencias entre MTAR-MFAR-MSAR en relación a las Cel TDBA-, Cel BwDBA+, Cel B DBA- y Frag M7AAD+ ($p < 0,05$). Asimismo, se observa la diferencia significativa de la MwMIT en los medios MTAN ($81,4 \pm 3,70\%$), MFAN ($69,48 \pm 5,75\%$) y MSAN ($58,73 \pm 2,49\%$) ($p < 0,05$).

IV.8.4 COMPARACION ENTRE EL TIPO DE MUESTRA CONGELADA (CELULAS Y FRAGMENTOS)

Cuando comparamos el potencial de membrana mitocondrial de las SSC proveniente de fragmentos y células observamos que las SSC congeladas en forma aislada presentan un mayor potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento que las SSC proveniente de fragmentos testiculares descongelados.

Asimismo, se puede apreciar (Anexo N° 16) que también existe diferencias significativas en relación a la apoptosis temprana entre fragmentos y células congeladas siendo menor el porcentaje de apoptosis en las SSC congeladas en forma aislada ($p < 0,05$), lo que se pone en evidencia en el medio MFO observándose $35 \pm 2,86$ (BwMitosense+frag) vs $19,15 \pm 3,48$ (BWMitosense+(Cell)) (anexo 16). Por otra parte, se observa que el mejor porcentaje de SSC con mitocondria activa se observa en el medio MTONf (en fragmentos) y en el Medio MSON en células (MSONc), la diferencia entre estos es el agente crioprotector no permeable que en el primer caso es trehalosa y en el segundo caso es Sucrosa y en las tasas de enfriamiento. No obstante, se puede apreciar que el porcentaje de SSC con mitocondria activa es mejor en las SSC congeladas en forma aislada que en los fragmentos al comparar los medios de criopreservación. Ambos medios poseen Maca negra como suplemento natural y ejercen la actividad antioxidante en un sistema de estrés osmótico y térmico que se genera durante la criopreservación.

Al analizar el potencial de actividad mitocondrial asociado a muestras de buenas y de regular calidad (Fig. 31 y Fig. 32), observamos una media $\pm$ EE de $63,68 \pm 8,90\%$ con un alto potencial de membrana mitocondrial detectada con la sonda Mitosense mediante CF, en muestras Buenas, lo que indica que el medio MSON es el mejor medio para las SSC aisladas en presencia de Maca negra (Fig. N° 31).

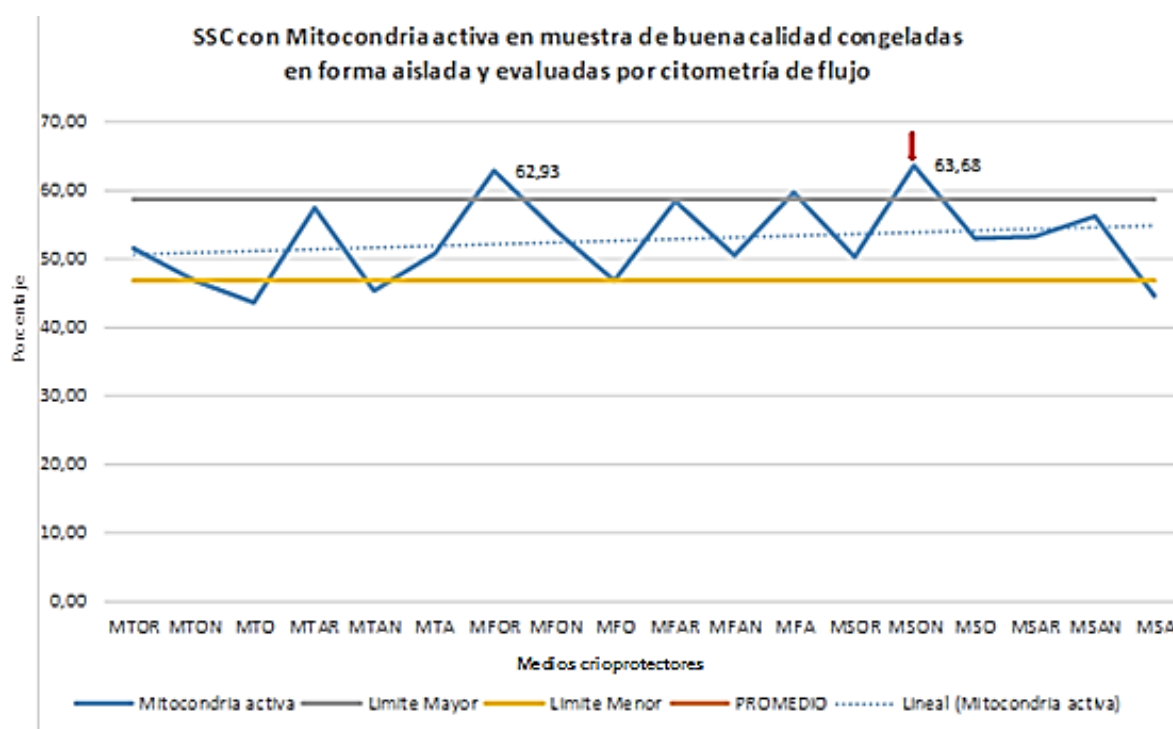


Fig. N° 31. En el análisis comparativo de los porcentajes promedios de SSC con alto potencial de membrana mitocondrial en los medios de criopreservación en el Medio MSON se destaca el valor máximo (Flecha) ($p < 0,05$).

Por otro lado, cuando analizamos las SSC congeladas en el Medio MSON asociadas a las muestras regulares observamos un mayor porcentaje de SSC con mitocondria activa llegando a $34,40 \pm 32,52\%$ (Anexo 14) en relación a todos los medios criopreservantes analizados (Fig. N°32). Lo que demuestra que tanto en muestras de buenas y de regular calidad el medio MSON (ACP DMSO, Sucrosa y Maca negra) es el mejor medio crioprotector para las SSC de alpaca congeladas en forma aislada.

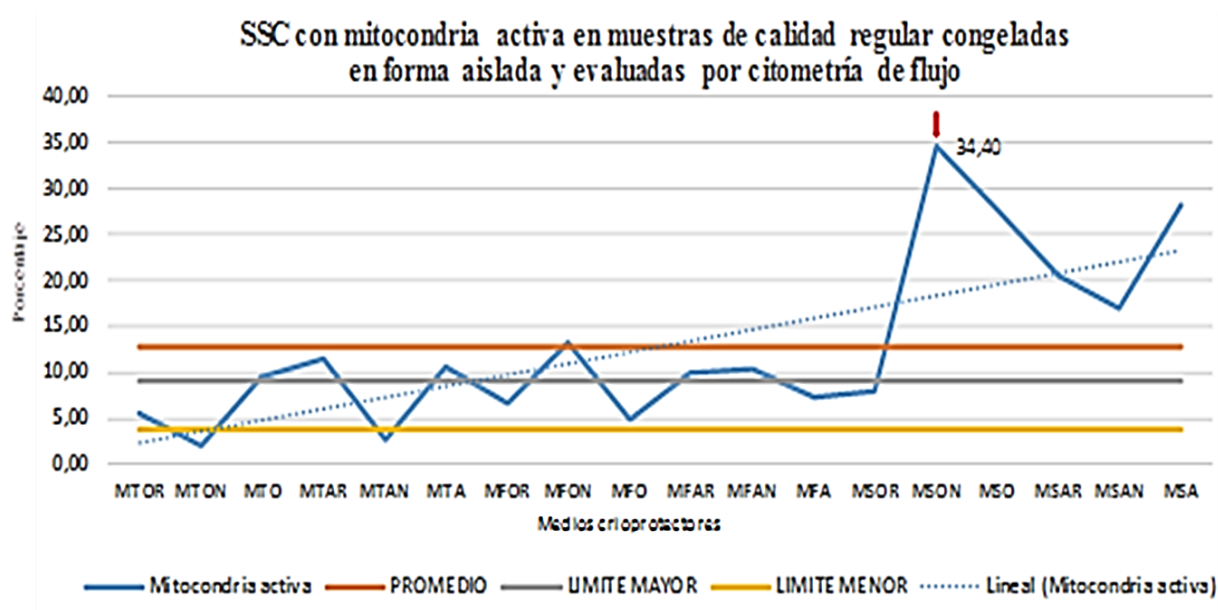


Fig. N°32. Se aprecia que el medio MSON es el medio de criopreservación que muestra un mayor porcentaje de SSC con mitocondria activa en muestras consideradas regulares en relación a su límite mayor y menor.

IV.9 CULTIVO IN VITRO DE CÉLULAS ESPERMATOGONIALES POSTDESCONGELAMIENTO

Tres muestras de células congeladas en suspensión celular en el medio MSON fueron cultivadas *In vitro* postdescongelamiento y evaluadas mediante CF donde se determinó que $1,46 \pm 0,34\%$ de las células fueron sDBA postdescongelamiento. Luego de 15 días de cultivo se observó que las células sDBA+ incrementaron a $4,0 \pm 1,0\%$ de células. Con una viabilidad demostrada por el alto potencial de membrana mitocondrial $72,36 \pm 17,09\%$ sMitosen+ . En cambio, luego de inducir la diferenciación celular hacia línea germinal masculina se observó que el porcentaje de las células sDBA+ se redujo a $0,0 \pm 0,84\%$, y se incrementó el porcentaje de células DBA- a $83,0 \pm 2,06\%$ lo que indica

que han iniciado la diferenciación temprana. Por lo que con este experimento se demuestra que las células congeladas en forma aislada en el medio MSON son capaces de proliferar y diferenciar *In vitro* (Tabla N°8, Fig. N°33). La calidad de la muestra postdescongelamiento dependerá de la calidad inicial de las muestras de los animales del cual proceden.

Tabla N° 8. Proliferación y diferenciación de células aisladas congeladas en medio MSON postdescongelamiento evaluadas mediante CF

Tipo de Células	Descongelada inicial	Proliferación	Diferenciación
sDBA+	1,46 ± 0,34	4 ± 1,0	0 ± 0,85
wDBA+	8,8 ± 2,27	44,43 ± 6,94	2,85 ± 2,06
DBA-	84,2 ± 2,98	51,56 ± 6,85	83 ± 8,41
sMITO+	ND	72,4 ± 8,58	85 ± 9,61
wMITO+	ND	22,23 ± 9,62	11,1 ± 9,61
7AAD+	ND	0	0

Los datos son expresados en Media±EE

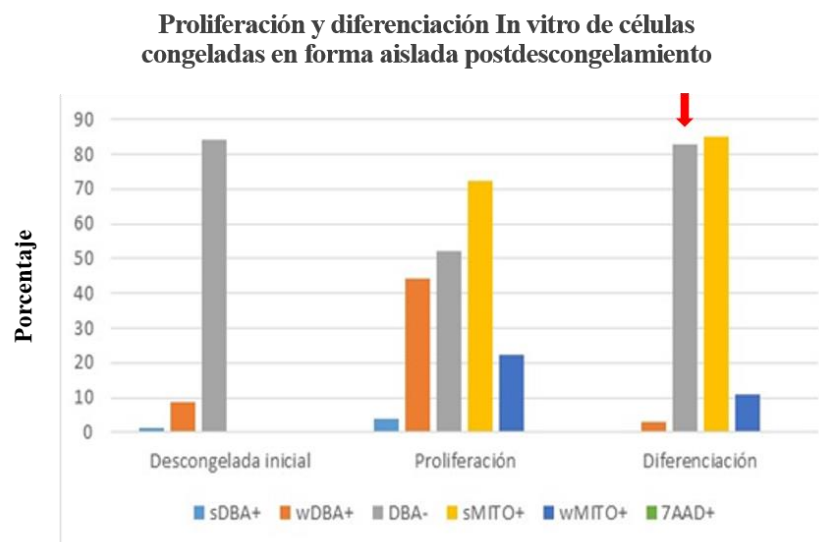


Fig. N°33. Proliferación y diferenciación In vitro de muestras congeladas en forma aislada postdescongelamiento congeladas en medio MSON. La flecha indica el aumento de células diferenciadas luego de inducir la diferenciación celular.

V. DISCUSIÓN

Se tiene conocimiento que las alpacas se caracterizan por tener deficiencias reproductivas que impactan en la productividad de la fibra, sin embargo, actualmente se logra trabajar con una población de alpacas élite para la producción de fibra de calidad. Esta producción podría incrementarse, si conseguimos conservar el material genético de los reproductores con las características de fibra deseadas. En ese sentido, los resultados obtenidos han logrado la estandarización de protocolos de aislamiento, identificación molecular y criopreservación de fragmentos testiculares y de SSC aisladas (suspensión celular) proveniente de machos de alpaca adultos.

El colorante azul de Tripán conocido también como azul de diamina es un colorante derivado de toluidina que posee la capacidad de identificar células vivas de muertas por el principio de exclusión, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas intactas a diferencia de lo que ocurre cuando las células están muertas y sus membranas están rotas por lo que ingresa el colorante y se colorea de azul (137). Adicionalmente se ha podido determinar que al comparar la viabilidad de células de hibridoma con azul de tripán en cultivos tempranos la densidad de células viables no fueron significativamente diferentes; pero a medida que el cultivo envejecía, el ensayo de exclusión con colorante azul tripán sobreestimó significativamente la viabilidad celular, subestimando así la densidad celular no viable y produciendo una estimación errónea de la viabilidad global del cultivo (138) Debido a que este colorante identifica sólo las células que se encuentran en necrosis ya que poseen las membranas tanto plasmática como nuclear rotas se pone en evidencia sus limitaciones en la identificación de células en apoptosis debido a que aún esta célula mantiene sus membranas intactas, por lo que fue necesario utilizar otra estrategia en la identificación de células de acuerdo al nivel del potencial mitocondrial. Debido a que las sondas fluorescentes son más

estables después de la absorción por las células, la viabilidad fue determinada inicialmente con azul de Tripán y con Mitosense para identificar el potencial de actividad mitocondrial en las SSC postdescongelamiento asociada a la lectina DBA que identifica a las SSC.

Asimismo, con marcadores moleculares; así como con el uso de CF, con la sonda fluorescente DBA, sonda que tipifica a las espermatogonia tipo A ó SSC en varias especies se pudo identificar a las SSC de alpaca en individuos adultos; de igual forma a lo observado en bovinos, humanos y búfalo (97), (139), (140), (141), (142), a diferencia de lo que ocurre en cerdos ya que el reconocimiento de las SSC por el DBA identifica a los gonocitos y espermatogonias primitivas en la etapa neonatal y esta capacidad se va perdiendo progresivamente con la edad (143), en cambio en el ovino la lectina DBA no es capaz de identificar ningún estado de la línea germinal masculina (144). Asimismo, esta lectina (DBA) ha sido usada como un marcador de las SSC de bovino durante la criopreservación (97, 98), de forma similar, a nuestro estudio en que la lectina DBA fue usada como marcador para identificar la población de SSC de alpaca postdescongelamiento como una herramienta en la caracterización de la población de SSC de las SSC en diferenciación temprana en alpaca postdescongelamiento; tanto en SSC provenientes de fragmentos testiculares (biopsias) así como en las congeladas en forma de suspensión celular, con resultados favorables ya que las SSC de machos de alpaca adulta pueden ser identificadas, por CF, con la sonda fluorescente DBA y su calidad a través de los cambios en la actividad mitocondrial de las SSC identificando las SSC con membrana mitocondrial intacta (con alto potencial de membrana testicular), las SSC con disminución de la actividad mitocondrial (SSC en apoptosis temprana) y las que están en necrosis luego del descongelamiento.

La unión de la lectina DBA y la co-expresión de la ubiquitina carboxilo terminal hidrolasa 1 (UCH1) corroboran la identificación tanto de los gonocitos de testículos neonatales y en las espermatogonias en bovinos adultos (140). Los marcadores moleculares pueden potencialmente ser de gran ayuda en la identificación de SSC de animales adultos (145). En nuestro estudio, se evaluaron marcadores de superficie e intracitoplasmáticos candidatos para las SSC de alpaca mediante PCR entre los que se encuentran Integrina β 1, THY1, ZBTB16, CD9, y marcadores de diferenciación como Receptor C-Kit, Oct $^{3/4}$ y NgN3; de estos se han podido amplificar: Integrina β 1, ZBTB16 y Ngn3 cuyos marcadores identifican la presencia de SSC y células en diferenciación; las que fueron evidenciadas en las células espermatogoniales aisladas y proliferadas posterior a un plaqueo diferencial in vitro, de forma similar a lo descrito en la identificación de antígenos asociados a SSC en ratón (70). ZBTB16 también conocido como PLZF, es un marcador intracelular, represor transcripcional que se une al ADN a través de sus dominios de dedos de zinc y su función está dirigida a reprimir la transcripción mediante el reclutamiento de histonas desacetilasas a través de su dominio POZ (146). La mutación de PLZF es responsable de la infertilidad masculina con pérdida progresiva de células germinales (147); asimismo en ratones Knock out para PLZF (148) se observa la pérdida de células germinales lo cual fue consistente con un defecto en el mantenimiento de SSC. Por otra parte, en un transplante de células germinales de ratones Knock out para PLZF las SSC transplantadas no logran colonizar los testículos de los receptores. PLZF ó ZBTB16 se expresa específicamente en espermatogonias no diferenciadas (149); por lo que puede ser utilizado como marcador de espermatogonias indiferenciadas o SSC de forma similar a lo obtenido en nuestros resultados en relación a ZBTB16 como un marcador molecular de la presencia de las SSC en fragmentos o células aisladas precongelmiento en alpacas.

Por otra parte, NgN3 es un candidato para conducir la diferenciación de SSC, está regulado por los factores de transcripción que promueven la diferenciación de SSC como STAT3, SOX3, SOHLH1 y SOHLH2 (150) y además es regulado negativamente por el factor de mantenimiento SSC denominado factor neurotrópico de la línea celular glial (GDNF) para evitar que NgN3 promueva la diferenciación prematura de SSC (149). En nuestros resultados, se observa la expresión de NgN3 por lo su expresión está induciendo la diferenciación en las SSC de alpaca presentes en la suspensión celular. En cambio, OCT 4 no se expresa en las SSC de alpaca lo que ha sido observado de forma similar a lo observado en otras especies animales, donde se observan niveles muy bajos de expresión de OCT-4 en SSC en comparación con células madre embrionarias (151). Por lo tanto, OCT-4 no puede servir como un buen marcador para el enriquecimiento de los SSC (151), ya que la forma de promover o conferir la capacidad de autorrenovación difiere entre las especies (152).

En las células espermatogoniales provenientes de fragmentos testiculares descongelados se observó que el promedio de viabilidad, con el colorante de exclusión azul de Tripán, fue de $61,91 \pm 3,6\%$ en el Medio MTA (Medio de criopreservación con ACP permeable Dimetilacetamida y ACP no permeable Trehalosa), en cambio en SSC congeladas en forma aislada se obtuvo el valor promedio más alto de viabilidad en el medio MTOR (Medio de criopreservación con ACP permeable Dimetilsufóxido y ACP no permeable Trehalosa y Maca roja), cuyo valor es de $45,4 \pm 3,6\%$ postdescongelamiento .

Se ha demostrado que al congelar biopsias testiculares de ratón, conejo, hámster y mono (92), (153) bajo condiciones termocontroladas con DMSO, Sucrosa y Suero sintético humano, existe una recuperación limitada de la espermatogénesis en alotransplantes y xenotransplantes postdescongelamiento proveniente de animales adultos, en cambio, en los injertos de roedores inmaduros se observa una espermatogénesis completa.

Asimismo, se observa que las células de Leydig son funcionales luego del descongelamiento ya que se observan concentraciones de andrógenos en los injertos que recibieron tejido fresco y ligeramente más bajos niveles en los ratones que recibieron tejido descongelado (153). En cambio, (92), demostraron que luego del trasplante de tejido testicular de ratón y conejo se produjo espermatogénesis completa; produciendo descendencia solo en el ratón postdescongelamiento. Asimismo, en cerdos se ha demostrado que posterior al descongelamiento de biopsias testiculares el xenotrasplante muestra espermatogénesis completa (154) y en humano la criopreservación de las células espermatozonales posterior a un largo cultivo proliferativo demuestra que puede ser utilizada esta tecnología para conservar la fertilidad humana (155). Se ha descrito que es posible criopreservar células madre espermatozonales por largos períodos de tiempo; en el ratón se congelaron entre 4 a 156 días lográndose restablecer la espermatogénesis completa en ratones infértiles, que recibieron el trasplante de éstas, (95), lo cual concuerda con nuestros periodos de congelamiento a -196°C donde las SSC de alpacas permanecieron entre 1 a 166 días (fragmentos) y en células aisladas entre 1 y 148 días (aproximadamente 5 meses) con una actividad mitocondrial conservada lo que indicaría potencialmente la conservación de las SSC de alpacas con los protocolos de congelamiento establecidos en este trabajo, por otra parte se logró proliferar e inducir la diferenciación temprana de las SSC de alpaca postdescongelamiento evidenciado por los signos de diferenciación temprana por citometría de flujo. Por otra parte, se ha observado crías nacidas al transplantar las SSC de ratón almacenadas durante 14 años a -196°C (192) lo que pone en evidencia la utilidad de la criogenia durante largos periodos de tiempo para la conservación y utilización posterior de las SSC aplicable para animales como la alpaca.

Nuestros resultados demuestran que el congelamiento lento realizado en tejido testicular de alpacas adultas en forma de fragmentos en DMA+Trehalosa (MTA) producen una muestra de SSC postdescongelamiento con una viabilidad de $61,91 \pm 3.6\%$ como un reservorio de células madre testiculares y de espermatozoides de alpaca las que posteriormente al descongelamiento pueden ser transferido a otros individuos o utilizar las SSC en sistemas de proliferación y diferenciación *in vitro* para ser usados en biotecnologías reproductivas de alta complejidad como Fecundación In vitro o Inseminación intracitoplasmática (ICSI). En los resultados de nuestro trabajo se ha observado que luego del las SSC de alpaca disminuyen pero a pesar de esto, reinician su actividad proliferativa e incluso pueden iniciar la diferenciación celular temprana In vitro lo que confirma la calidad de los protocolos de criopreservación obtenidos en este trabajo de investigación lo que puede ser evidenciado por la disminución de las células sDBA+ luego del descongelamiento y que al ser inducidas a la diferenciación con testosterona se observa un aumento de células espermatogoniales redondas que inician la diferenciación temprana (wDBA+) y un aumento de las células redondas diferenciadas que son negativas a DBA- Incluso con la finalidad de mejorar nuestros resultados hemos diseñado la estrategia de realizar una proliferación celular In vitro de las células espermatogoniales aisladas previo a la criopreservación y hemos conseguido resultados postdescongelamiento que se asemejan a las células frescas ([156](#)), cuando son congeladas en forma aislada y previamente se ha realizado el incremento de las SSC mediante cultivo e inducción de proliferación celular In vitro per congelamiento en SSC de alpacas ([157](#)).

En humano, se observó que luego del descongelamiento de biopsias testiculares ó suspensiones celular existe la misma cantidad de SSC recuperadas independientemente si fueron crioconservadas como tejidos testiculares o como suspensiones de células

individuales (158). En cambio, otro estudio (41), ha demostrado que las poblaciones de células madre SSEA-4 humanas adultas y fetales poseen una sensibilidad diferencial a la criopreservación en función de si son crioconservadas lentamente bajo la forma de tejidos testiculares o bajo la forma de células individualizadas. La recuperación de las SSC humanas fue significativamente más alta en la criopreservación de suspensión celular (19%) en comparación con la criopreservación de tejidos (13%) proveniente de testículos adultos, en cambio en testículos neonatales no se observó diferencia entre la cantidad de SSC proveniente de tejido testicular vs suspensiones celulares. Por lo que la conservación óptima de los SSC humanos depende de la edad del paciente, el tipo de muestras criopreservadas y las aplicaciones terapéuticas posibles, con el colorante azul de Tripán mostraron una viabilidad que asciende a $80 \pm 3\%$ (Fragmentos) y $67 \pm 4\%$ (SSC aisladas: suspensiones celulares) (41), de forma similar en nuestros resultados la viabilidad con azul de Tripán en muestras de células espermátogoniales buenas postdescongelamiento fue mayor en células proveniente de fragmentos ($75,81 \pm 3,25\%$) y en suspensiones celulares fue menor ($57,24 \pm 4,11\%$). En cambio, al analizar la calidad de las SSC por citometría de flujo se observa una mayor población de SSC congeladas en MSON en forma aislada con mitocondria intacta y saludable ($63,68 \pm 17,82\%$) que en la calidad de las SSC proveniente de fragmentos testiculares descongelados ($57,20 \pm 19,14\%$) revelada con la sonda Mitosense que detecta las SSC con alto potencial de membrana mitocondrial, nuestros resultados son compoarables con los de otras especies, en los que se ha demostrado incluso que con viabilidades de 40% pueden generar una epermatogénesis completa luego de ser tranplantados (95). Por otra parte, se han analizado varios trabajos en relación a la criopreservación de SSC en varias especies, a la modalidad de acción de los crioprotectores, la metodología de congelamiento, lento vs vitrificación, la edad del cual proviene la muestra, asociado al

número de células recuperadas y la viabilidad de las SSC posdescongelamiento, lo que refleja se ha observado que aún falta más evidencia que nos lleve a realizar una aplicación de los conocimientos producidos en animales a ser aplicados en el manejo reproductivo y tratamiento de infertilidad ([159](#)), ([160](#)), ([103](#)).

Durante el congelamiento en este trabajo, hemos usado SSC de alpacas adultas bajo dos tipos de muestras: 1) suspensiones espermáticas obtenidas mediante el uso de dos digestiones enzimáticas de forma similar a lo planteado por ([97](#)) y por otro lado 2) fragmentos testiculares o biopsias evitando la rete testis en cortes longitudinales. Al respecto, se ha observado que la dimensión física macroscópica del tejido es un punto crítico en un protocolo de crioconservación ([103](#)) ya que el tamaño de la muestra puede influir en la distribución equitativa y difusión rápida de entrada y salida de los ACP así como de las tasas de distribución de temperatura uniformes en toda la extensión del tejido, lo cual debe ser tomado en cuenta para evitar el criodañó durante el proceso de congelamiento y descongelamiento ([161](#)), ([162](#)). En ratones, se ha evidenciado que al congelar testículos enteros se observan mejores resultados postdescongelamiento cuando la túnica albugínea es cortada en comparación si ésta está intacta ([163](#)). En rata inmadura, se ha observado que en fragmentos de 7,5 mg produce mejores muestras posdescongelamiento en comparación a cuando se congela fragmentos de 15 mg ([164](#)); en cambio cuando se congeló fragmentos de tejido testicular de cerdo (5, 15, 20 o 30 mg) no se afectó la viabilidad celular en la muestra postdescongelamiento ([154](#)). En niños prepúberes ([165](#)), la crioconservación de tejido testicular, con fragmentos de tamaños variables (2-9 mm³) no mostró diferencias en la viabilidad postdescongelamiento ([91](#)), ([166](#)), ([86](#)), ([167](#)). Asimismo, ([168](#)) evaluaron el efecto del antioxidante N-acetilcisteína y de Testosterona sobre el congelamiento de fragmentos de 1 x 1 x 3 mm de tejido testicular humano de prepúberes, sin mostrar diferencia en la

viabilidad ni en apoptosis ni en el xenotransplante posdescongelamiento. Nuestros resultados sustentan que el uso de fragmentos testiculares de alpaca, sin túnica albugínea, de 8 x 2 x 2 mm ($X \pm SD$: $22,7 \pm 2,2$ mg) muestra una alta viabilidad ($61,91 \pm 3,61\%$), con azul de tripán y $57,20 \pm 19,14\%$ de las SSC provenientes de fragmentos poseen membrana mitocondrial intacta postdescongelamiento, los que asociadas a la presencia de espermatozoides de buena calidad, indica que el tamaño elegido del fragmento testicular fue el adecuado para conservar las células espermatogoniales de alpaca.

En los medios de criopreservación para las SSC se utilizan ACP permeables como Dimetilacetamida y Dimetilsufóxido, entre otros y ACP no permeables como Trehalosa. El DMSO es un ACP permeable a las células y conserva mejor las espermatogonias que PROH (Propilen glicol) o Glicerol ([169](#)), de forma similar a nuestros resultados en SSC congeladas y descongeladas en forma aislada en el medio MSON (posee DMSO como ACP permeable + ACP no permeable + Maca Negra), tenemos el mayor porcentaje de SSC vivas ($63,68 \pm 17,82\%$) con membrana mitocondrial intacta posdescongelamiento. Se ha descrito, que DMSO podría inducir la mutación de genes si son utilizados en alta concentración a 37°C ([170](#)) por lo que usarlo junto con ACP no permeables como trehalosa o sucrosa promueve la conservación de la calidad de las SSC posdescongelamiento ([171](#)). Se ha demostrado que la sucrosa es un ACP significativamente mejor que la trehalosa para mantener la integridad de la membrana celular y del acrosoma durante el proceso de estrés osmótico y térmico ejercida sobre la célula durante una criopreservación lenta en espermatozoides de toro ([172](#)). Por otra parte, se ha determinado que en constructos, realizados por ingeniería de tejidos (TEC), producidos para la criopreservación de tejidos muestran una viabilidad celular postdescongelamiento de $54,37 \pm 1,2\%$ con el ACP permeable a una concentración de

10% de DMSO, $45 \pm 4,7\%$ con 40 mM de trehalosa y llega a $73 \pm 1,9\%$ cuando criopreservan con trehalosa, ectoína, dimetilsulfóxido y soluciones antioxidantes (173). En nuestro estudio, se evidencian resultados similares en relación a la viabilidad de células espermatozonales descongeladas provenientes de fragmentos testiculares congelados con una promedio $\pm$ EE evaluados con azul de tripán, se observa que la mayor viabilidad ($61,91 \pm 3,61$) es observada en el Medio MTA (ya que al descongelar fragmentos con trehalosa 200 mM y Dimetilacetamida (1,15M). En cambio, al analizar por citometría de flujo, la viabilidad de las SSC posdescongelamiento en el medio MTON (Dimetilsulfoxido (1,30 M) + Trehalosa 200 mM + Maca Negra 20mg/ml) con la sonda fluorescente Mitosense revela que el $57,20 \pm 19,14\%$ poseen SSC con un alto potencial de membrana mitocondrial.

En cambio, en las células espermatozonales congeladas en forma aisladas, proveniente de alpacas adultas de buena calidad, observamos que el porcentaje de SSC con mitocondria activa e intacta fue de $63,68 \pm 17,82\%$ en el medio MSON mediante CF, cuando el medio de criopreservación contienen 1,30 M de DMSO suplementado con Maca negra (20mg/ml) y Sucrosa (200 mM). Por otra parte, en nuestro estudio se evaluó también el efecto de la sucrosa como ACP no permeable en el medio evidenciándose el porcentaje más alto de viabilidad con azul de tripán. Entre los medios analizados con sucrosa, se observa un porcentaje de viabilidad de $60,22 \pm 3,6\%$ de las SSC en el medio MSAN (Sucrosa 200 mM)+ Dimetilacetamida (1,15M) + Maca Negra 20mg/ml), en este caso usamos a la Maca negra como un suplemento natural. El rol de la sucrosa fue evaluada en el congelamiento de SSC de cerdo en presencia de concentraciones crecientes de Sucrosa (70, 140, 210 y 280 mM) determinándose que la viabilidad fue mayor cuando las SSC de cerdo fueron congelados en 210 mM de sucrosa (51), lo que corrobora nuestros resultados en el congelamiento de SSC de alpaca, en forma aislada,

con el ACP permeable DMSO y el ACP no permeable Sucrosa (200mM) mostrando los mejores resultados en la viabilidad de SSC de alpaca posdescongelamiento congeladas en forma aislada. La alta osmolalidad de los medios hipertónicos confiere una protección significativa contra el daño producido por el enfriamiento rápido, siendo la sucrosa significativamente mejor que la trehalosa (172). La Sucrosa incrementa la viabilidad de SSC de porcino después de la criopreservación participando en la deshidratación celular producida por una alta osmolalidad de los medios de criopreservación tanto en los espermatozoides (172) ó SSC que se enfrentan a un ambiente hipertónico, producido por la criopreservación, las SSC son protegidas induciendo una inhibición de la apoptosis celular (51).

La inclusión de antioxidantes en el medio de criopreservación mejora la eficacia de la criopreservación (174, 175), en forma conjunta a los ACP como el DMSO, mejoran significativamente el descongelamiento conservando la actividad mitocondrial y la capacidad de proliferación de SSC de ratón (53) por lo que el uso de antioxidantes citoprotectores complementarios a los ACP mejorarían la calidad de las SSC posdescongelamiento. En este sentido, se ha involucrado a la Maca como un antioxidante natural que protege al ADN del estrés oxidativo en condiciones *In vitro* (176) y condiciones in vivo (177). La función citoprotectora de la Maca (1 mg/ml) protegió a los macrófagos RAW 264.7 de la apoptosis inducida por peroxinitrito ($P < 0.01$) frente a la exposición con H_2O_2 (1 mM). Se demuestra que maca destruye los radicales libres y protege las células contra el estrés oxidativo lo que indica que contiene fitoquímicos capaces de extinguir fisiológicamente las células de inflamación crónica, y combatir el estrés oxidativo (19). En nuestro estudio, hemos utilizado dos variedades del extracto hidroalcohólico de Maca atomizada comercial JUVENS y de acuerdo al color de su hipocótilo (Roja y Negra. Por sus propiedades antioxidantes, hemos utilizado

la Maca atomizada Juvens a una concentración de 20 mg/ml (debido a que no ejerce un efecto negativo durante el periodo de estabilización a 4°C, previamente evaluado en este trabajo de investigación, en el medio de criopreservación; en nuestros resultados se demuestra que la maca conserva la función mitocondrial en las SSC congeladas en forma de fragmentos en presencia de Maca Roja y Maca Negra con respecto al control.

Asimismo, en fragmentos se puede observar que el medio de criopreservación en el que se conserva mejor la actividad mitocondrial ($57,20 \pm 19,14\%$) es en el medio MTON (DMSO, Trehalosa y Maca negra) cuando las muestras son **buenas**; pero al evaluar las Muestras malas la actividad mitocondrial se reduce a $16,50 \pm 11,27\%$ en el mismo medio. Por otra parte; cuando se contrasta el porcentaje de SSC congeladas en forma aislada observamos que las SSC con alto potencial mitocondrial (Bsmitsense+(Cell) en muestras Buenas ascienden a $63,68 \pm 17,82\%$ en el medio MSON (DMSO, Sucrosa y Maca negra), sin mostrar diferencias significativas ($p > 0,05$) (Anexo 16), en cambio, al contrastarla con las Msmitsense+ en muestras malas se observa diferencia en el porcentaje de SSC postdescongelamiento en células congelados en el Medio MSON mostrando el mayor valor en las células Msmitsense+(Cell), lo que indicaría que el medio MSON es el medio que rescataría el mayor porcentaje de células aún en muestras de mala calidad demostrando su rol potencial en el rescate y conservación de alpacas. Nuestros resultados sugieren que en la Maca negra existen metabolitos con actividad antioxidante capaces de proteger a las mitocondrias de las SSC lo que mantiene la función mitocondrial responsable de la producción de ATP semejante a lo encontrado por (19), en que se incrementa la producción de ATP en los macrófagos expuestos a oxidantes en presencia de Maca.

Por otra parte, en estudios sobre la relación del color del hipocótilo y la diferenciación metabólica de la función de la Maca se realizó a través de resonancia magnética

nuclear evaluando el color del hipocótilo (amarilla, rosada, violeta y plomo), en variedades de maca previamente cultivadas y nunca cultivadas de diferentes localidades del Perú (Patalá 4086 msnm en Junín y Alpacayán 4130 msnm en Cerro de Pasco). Los resultados del estudio demuestran que de los 16 metabolitos observados en la resonancia magnética nuclear, la señal de sucrosa puede identificarse fácilmente debido a que el nivel de este metabolito se aprecia fuertemente en relación a otros metabolitos y si se compara la cantidad de sucrosa en relación al color del hipocótilo y si ha sido o no cultivada, los niveles de expresión de sucrosa como metabolito están incrementados en todos los colores de hipocótilo analizados de Patalá: en amarilla (10004,13), violeta (8767,62), ploma (10732,41) y rosada (9485,29); y en Alpacayán: en amarilla (11042,37), violeta (11743,20), ploma (12067,29) y rosada (10757,16), cuando la maca ha sido cultivada 2 a 3 años antes. Este estudio sugiere que el lugar de siembra es lo más importante y que los colores de hipocótilo tienen menor importancia (84). Por otra parte, se ha evaluado los componentes de Maca roja y negra en extractos de maca seca en spray los que fueron realizados con resonancia magnética nuclear, donde se ha descrito la presencia de 16 componentes, entre los que destaca la Sucrosa entre todos los metabolitos observados, la que esta presente en mayor cantidad en la maca negra (1632,36) que en la maca roja (1368,35) y que al ser administrados en pacientes por vía oral mejoran los parámetros de la calidad de vida diferencialmente en relación al color del hipocótilo, probablemente las diferencias sean dependientes de la composición química de las dos variedades de maca analizadas (178), este producto corresponde al usado en este trabajo de investigación. En relación a la coloración del hipocótilo, en contraste con (84), nuestros resultados confirman que si existe diferencia en el mecanismo de acción de la maca en relación al color del hipocótilo semejante a lo observado por (178). En nuestro estudio, la presencia de maca negra, en el medio de

criopreservación, incrementó el porcentaje de viabilidad y de actividad mitocondrial en las SSC congeladas en forma aislada en el medio MSON y en fragmentos testiculares en el medio MTON conservando la actividad mitocondrial en presencia de trehalosa ó sucrosa cuando estos azúcares fueron suplementados con Maca negra. Debido a la presencia de sucrosa como mayor metabolito en la Maca podemos proponer que la sucrosa estabiliza a las SSCs durante el congelamiento y descongelamiento como ACP no permeable asociado al ACP permeable DMSO.

La criopreservación induce apoptosis y necrosis celular durante el congelamiento o descongelamiento los resultados demuestran que las vías intrínseca y extrínsecas mediadas por caspasas y la cascada proteolítica de calpaína fueron activadas después de la criopreservación y que esta activación puede jugar un rol importante en el proceso de muerte celular inducida por la criopreservación; se han utilizado inhibidores de caspasas z-VAD-FMK, reduciendo la apoptosis inducida por criopreservación mostrando efectos benéficos sobre las células madre mesenquimales provenientes de cordón umbilical (179). Por otro parte, las estrategias actuales se enfocan en minimizar las acciones dañinas de los factores estresantes fisicoquímicos, así como la ruptura de las membranas celulares asociadas con la formación de cristales de hielo extra e intracelular que ocurre durante el proceso de congelamiento y descongelamiento. Sin embargo, este proceso de muerte celular puede ser inhibido significativamente con HypoThermosol® como medio de preservación y de la modulación de la muerte celular ofreciendo mejoras en los protocolos de criopreservación en sistemas biológicos más complejos y/o frágiles tejidos modificados genéticamente como en órganos humanos y en células madre (180). Asimismo, se usó CryoStor CS 5 en conjunto con un inhibidor apoptótico Inhibidor V Caspasa I, lo que llevó a una regulación de la apoptosis durante la criopreservación (181),

de forma similar en fibroblastos humanos, queratinocitos hepatocitos y células renales con HypoThermosol (182).

La disponibilidad de métodos de prueba citométricos rápidos y simplificados para evaluar los cambios mitocondriales, la apoptosis y la muerte celular. Los estudios que evalúan el cambio del potencial de membrana mitocondrial y los marcadores de apoptosis y muerte celular que permitan una fácil identificación del efecto de un compuesto o de un protocolo de congelamiento sobre la actividad mitocondrial (183). En nuestro estudio, utilizamos el FlowCelect Mitopotential Red Kit en cuyo kit se encuentran asociados dos fluorocromos el Mitosense, cuyo marcador detecta el potencial de actividad mitocondrial en dos subestados (con membrana mitocondrial intacta y con reducción de la actividad mitocondrial (Apoptosis temprana) y la sonda Actinomicina D (7AAD) que detecta a las células en necrosis. Por otro lado, se congelaron células madre espermatogoniales en forma aislada posterior a una proliferación *In vitro* (156), donde se evidenció que luego del descongelamiento se observa $6,29\% \pm 1,17$ de sDBA+(SSC) que al compararlo con sDBA+ frescas ($7,66\% \pm 1,13$) no muestra diferencias significativas ($p > 0,05$) (157). Cuando las SSC de alpaca fueron proliferadas y criopreservadas el porcentaje de sMitosense+ fue de $77,14\% \pm 2,91$ no mostrando diferencias significativas en relación a las muestras frescas no congeladas ($p > 0,05$) (156), (157), con lo cual se demuestra, una ventaja comparativa al congelar las células de alpaca luego de someterlas a un periodo de proliferación *In vitro* usando el protocolo de criopreservación para células aisladas (157).

Por otro lado, con DBA es posible identificar a los residuos de α -N- acetilgalactosamina (GalNAc) y a los β -N- acetilgalactosamina (GalNAc) reactivos en la superficie de las membranas plasmáticas de los espermatozoides (184), (185), (186), (187) cuya función está involucrada en la interacción de gametos durante la fecundación. En este estudio se

usó DBA por su capacidad de reconocer a los residuos de α -N- acetilgalactosamina (GalNAc) altamente reactivos en la superficie de las membranas plasmáticas de las SSC observadas en varias especies (97), (119), (120), (121).

Varios sondas, entre la que se encuentra Actinomicina D (7AAD) se unen establemente al ADN de células no viables en necrosis. El factor principal que determina su uso es su exclusión en las células viables, el grado de exclusión de un colorante no vital está en función a su peso molecular, que impide su penetración a través de las membranas celulares, su hidrofobicidad que puede variar con el pH y fuerza iónica del colorante (113). Nuestros resultados, demuestran que en la población de las SSC se observa que con el flurocromo 7AAD se puede distinguir a las células necróticas que son positivas a 7AAD+ donde se une fuertemente al núcleo de las células en necrosis, la fluorescencia es captada por el canal 4 en el citómetro de flujo identificando las SSC de alpaca 7AAD+; en las muestras totales, buenas y malas no existen diferencias significativas en necrosis 7AAD+ ($p>0,05$). Asimismo, en SSC congeladas en suspensión no se observa diferencia significativa del porcentaje de células en necrosis; sin embargo si existen diferencias significativas en el porcentaje en células 7AAD+ proveniente de muestras Malas congelada en forma de fragmentos en el medio MSOR, MSON y MSO; asi como en MSAR, MSAN y MSA (Anexo 11). Los menores porcentajes de células provenientes de fragmentos en muestras Buenas se observan en el medio MFAR ($7,70\pm1,65$) y en células en el medio MFOR ($4,93\pm1,91$); lo cual concuerda con los resultados de (188) en SSC de ratón ya que postdescongelamiento en presencia de ACP permeable (DMSO al 10%) junto con diferentes concentraciones de ACP no permeable (Trehalosa a 50mM, 100mM y 200mM) se evidencia una baja tasa de necrosis celular. Por otro parte evaluaron las diferentes concentraciones de ACP no permeable con su capacidad proliferativa luego de tres periodos de tiempo a -196°C (1, 2 y 3 meses) donde se pone

en evidencia una baja tasa de necrosis pero una baja tasa de proliferación postdescongelamiento en concentraciones de 50 y 100 mM de Trehalosa, en cambio a 200 mM se observa una mejor tasa proliferativa de las SSC (188) en cambio, en el almacenaje de espermatozoides humanos durante largo tiempo en nitrógeno líquido se ha observado que no daña la calidad de los espermatozoides ni la tasa de fecundación postdescongelamiento (189). En nuestro estudio, hemos usado el ACP permeable (DMSO 10%) y ACP no permeables (Trehalosa, fructosa y Sucrosa a una concentración de 200mM) observándose que existe capacidad proliferativa postdescongelamiento cuando las células son congeladas en el medio MSON en presencia de ACP permeable (DMSO) y ACP no permeable (Sucrosa 200 mM) y suplementado con 20mg/ml de Maca. La capacidad proliferativa disminuye con la criopreservación y la presencia de ACP no permeable conserva la capacidad proliferativa durante un mayor tiempo de permanencia en nitrógeno líquido. En nuestro medio de criopreservación, la Maca posee efectos antioxidantes que reducen el porcentaje de apoptosis temprana y necrosis celular durante largos periodos de congelamiento.

El uso simultáneo de DBA y del Kit FlowCollect Mitopotential kit (Mitosense y 7AAD) permiten obtener información sobre la presencia de células madre espermátogonias así como del número de células con alto potencial de membrana mitocondrial o membrana mitocondrial intacta (vivas con alto potencial mitocondrial con una alta fluorescencia al Mitosense) de las que inician disfunción mitocondrial (Con disminución de la actividad mitocondrial y disminuido potencial de membrana mitocondrial o Apoptosis temprana) y las que están en necrosis celular (positivas a 7AAD+) en un solo ensayo. Identificando de manera objetiva la calidad de las células madre espermátogonias de alpaca vivas y saludables con un alto potencial de membrana mitocondrial, que pueden ser identificadas al citómetro de flujo con una fluorescencia intensa al Mitosense (Rojo), asimismo como

este kit monitorea los cambios fluctuantes de potencial de membrana mitocondrial, las células que disminuyen su potencial están en apoptosis temprana con una intensidad menor de fluorescencia al Mitosense. Y las que están en necrosis son marcadas con la sonda 7AAD+.

Nuestro estudio ha logrado el establecimiento de dos protocolos para criopreservación de células madre espermatozonales de alpaca, sugiriendo que el medio para congelar fragmentos testiculares de alpaca es el medio MTON y para suspensiones de células espermatozonales (aisladas) es el medio MSON. En ambos medios, se observa una crioconservación de las SSC con un mayor porcentaje de SCC con potencial de membrana mitocondrial lo que sugiere un efecto antioxidante y citoprotector de la Maca negra que conserva el potencial de membrana mitocondrial en las SSC de alpaca cuya calidad postdescongelamiento será dependiente de la calidad inicial de las muestras precongelamiento. Por otra parte, se ha evidenciado que las células congeladas en suspensión (aisladas) poseen capacidad proliferativa y responden al inductor de diferenciación en sistemas de cultivo *in vitro*, lo cual hace promisorio su utilización en trasplantes así como en la conservación de SSC para desarrollar tecnologías de alta complejidad en alpacas en ICSI lo que pone en evidencia y utilidad en el rescate de caracteres de impacto económico en alpacas élite.

VI. CONCLUSIONES

VI.1 Conclusión general

Se identificó la presencia de SSC en alpacas adultas usando marcadores como β integrina y ZBTB16 mediante qPCR así como con DBA mediante CF. Durante la criopreservación se observó que la Maca negra conserva la viabilidad y la actividad mitocondrial en las SSC de alpacas adultas congeladas en forma de fragmentos testiculares.

VI.2 Conclusiones específicas

- Los marcadores moleculares (β integrina y ZBTB16) y DBA identificaron a las SSC en alpacas adultas.
- Las SSC de alpaca pueden ser criopreservadas tanto a partir de células aisladas como de fragmentos testiculares.
- El sistema dual Mitosense-7AAD es de gran utilidad para establecer el rol del potencial de membrana mitocondrial en las células madre espermatogoniales de alpaca postdescongelamiento discriminando a las células con apoptosis temprana de las que presentan un potencial mitocondrial conservado de las que se encuentran en necrosis postcriopreservación en machos de alpaca.

VII. LIMITACIONES

Del análisis molecular:

No existe un genoma completo descrito para la alpaca por lo que se usaron especies relacionadas (*Sus scrofa* y *Bos Taurus*) para el diseño de primers con la finalidad de dar robustez al análisis. Los primers fueron validados bioinformáticamente corroborando su especificidad y son referenciados (46). El qPCR es más sensible, rápido y fácil de usar comparado a otros métodos de cuantificación del ARN como northern blot e hibridación in situ. A pesar de las ventajas de la cuantificación de ARNm por PCR (qPCR) son mucho más que las de un PCR convencional, aún tiene limitaciones inherentes, particularmente aquellas que dan al ser métodos no validados. Existen varias fuentes de sesgo en una medición de ARN por qPCR, las principales causas en resumen son: la extracción de ARN, la calidad del ARN, el almacenamiento del ARN/ADNc, el calibrador inapropiado, el termociclador, las micropipetas.

De la determinación de apoptosis temprana y necrosis:

En este estudio se determinó la apoptosis celular por el estatus funcional de la mitocondria evaluando la vía intrínseca de la apoptosis, no se evaluó directamente la vía extrínseca de la apoptosis que podría ser evaluada por Anexina V que identifica a las células que están en apoptosis a través del reconocimiento de la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina (PE) de la membrana plasmática, pudiéndose usar como conjugado a Ioduro de propidio ó a 7AAD. En este trabajo se usó el Kit Flow Celect Mipotentia Red (posee dos sondas Mitosense y 7AAD) que evalúa dos importantes parámetros de salud celular de forma simultáneamente; cambios en el potencial de membrana mitocondrial, considerado como una marca temprana de apoptosis celular (Disminución del potencial de membrana mitocondrial, lo que se evidencia por la

disminución de la fluorescencia de la sonda mitosense) y permeabilización de la membrana plasmática celular o muerte celular (por la asociación del fluorocromo 7AAD al ADN de la célula en necrosis), diferenciándose a las células vivas con membranas intactas (plasmática y mitocondrial) de las que experimentan la apoptosis temprana (con permeabilidad de la membrana mitocondrial y apertura de poros con la pérdida de citocromo c) de las que están en necrosis (con el reconocimiento del ADN celular con la sonda 7AAD en las células con membranas rotas).

VIII. RECOMENDACIONES

- a) Se sugiere continuar con investigaciones a nivel de cultivo de SSC postdescongelamiento.
- b) Realizar purificación de SSC postdescongelamiento.
- c) Realizar xenotransplantes con SSC purificadas postdescongelamiento.
- d) Proponer el establecimiento del banco criogénico de células madre espermatogoniales de la alpaca peruana.
- e) Medir de manera más específica el proceso apoptosis temprana y necrosis con un colorante que complemente a 7 AAD como por ejemplo con la Anexina V.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MINCETUR. Decreto Supremo 015-2004. Crean Comisión Nacional de Productos Bandera (COPROBA. El Peruano. 2004.
2. Lavana A, Vazquez R, Palma-Irizarry M, Orihuela A. Effect of supplementation with maca (*Lepidium meyenii*) in libido and semen characteristics in hair sheep rams (*Ovis aries*). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2013;12(3).
3. INDECOPI. GUIA INFORMATIVA PRODUCTOS BANDERA DEL PERU. Centro de Información y Documentación INDECOPI. 2013:48.
4. ONUDI. El futuro de los productos andinos en la region alta y los valles centrales de los andes /textiles-Camelidos. Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo 2008:47 pp.
5. MINCETUR. Informe 113-2018- PROMPERU. PROMPERU. 2018:20pp.
6. Rosadio R, Maturrano L, Pérez D, Luna E. El complejo entérico neonatal en alpacas andinas. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2012;23(3):261-71.
7. Zhang Y, Yu L, Ao M, Jin W. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. Journal of ethnopharmacology. 2006;105(1-2):274-9.
8. Benavides ER, Bastidas J, Cruz EJ, Junes R, Vila G, Ch MY. Efecto antioxidante del extracto acuoso de *Lepidium meyenii* walpers (Maca) en animales de experimentación con osteoporosis inducida. Ciencia e Investigación. 2008;11(1):37-41.
9. Gonzales G, Gasco M, Cordova A, Chung A, Rubio J, Villegas L. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). Journal of endocrinology. 2004;180(1):87-96.

10. Gonzales GF, Gasco M, Lozada-Requena I. Role of maca (*Lepidium meyenii*) consumption on serum interleukin-6 levels and health status in populations living in the Peruvian Central Andes over 4000 m of altitude. *Plant foods for human nutrition*. 2013;68(4):347-51.
11. Clément C, Kneubühler J, Urwyler A, Witschi U, Kreuzer M. Effect of maca supplementation on bovine sperm quantity and quality followed over two spermatogenic cycles. *Theriogenology*. 2010;74(2):173-83.
12. Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Shao Y, Huang ZY, et al. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*. 2000;55(4):598-602.
13. Melnikovova I, Fait T, Kolarova M, Fernandez EC, Milella L. Effect of *Lepidium meyenii* Walp. on semen parameters and serum hormone levels in healthy adult men: a double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015.
14. Rubio J, Riqueros MI, Gasco M, Yucra S, Miranda S, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced—damage on reproductive function in male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2006;44(7):1114-22.
15. Valdivia M, Yarasca K, Lévano G, Vásquez J, Temoche H, Torres L, et al. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on testicular function of mice with chemically and physically induced subfertility. *Andrologia*. 2016;48(8):927-34.
16. Choi EH, Kang JI, Cho JY, Lee SH, Kim TS, Yeo IH, et al. Supplementation of standardized lipid-soluble extract from maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats. *Journal of Functional Foods*. 2012;4(2):568-73.

17. Yábar E, Pedreschi R, Chirinos R, Campos D. Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chemistry*. 2011;127(4):1576-83.
18. Lee K-J, Dabrowski K, Sandoval M, Miller MJ. Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture*. 2005;244(1-4):293-301.
19. Sandoval M, Okuhama NN, Angeles FM, Melchor VV, Condezo LA, Lao J, et al. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*. 2002;79(2):207-13.
20. Valerio LG, Gonzales GF. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicological reviews*. 2005;24(1):11-35.
21. Zeng X, Miura T, Luo Y, Bhattacharya B, Condie B, Chen J, et al. Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. *Stem Cells*. 2004;22(3):292-312.
22. Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Molecular human reproduction*. 2004;11(3):173-81.
23. Ullmann U, In't Veld P, Gilles C, Sermon K, De Rycke M, Van de Velde H, et al. Epithelial–mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Molecular human reproduction*. 2006;13(1):21-32.
24. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem cells*. 2008;26(12):3068-74.

25. Blum B, Benvenisty N. Clonal analysis of human embryonic stem cell differentiation into teratomas. *Stem Cells*. 2007;25(8):1924-30.
26. Clouthier DE, Avarbock MR, Maika SD, Hammer RE, Brinster RL. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*. 1996;381(6581):418.
27. Ogawa H, Kobayashi I, Nagasaka T, Namil Y, Hayashi S, Kadomatsu K, et al., editors. Suppression of porcine xenoantigen expression by dominant-negative effect of alpha-1, 3-galactosyltransferase (alpha-1, 3-GT) splicing variants. *Transplantation proceedings*; 2000.
28. Zheng Y, Tian X, Zhang Y, Qin J, An J, Zeng W. In vitro propagation of male germline stem cells from piglets. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(7):945-52.
29. Lee KH, Lee WY, Kim DH, Lee SH, Do JT, Park C, et al. Vitrified canine testicular cells allow the formation of spermatogonial stem cells and seminiferous tubules following their xenotransplantation into nude mice. *Scientific reports*. 2016;6:21919.
30. Zhang Z, Hill J, Holland M, Kurihara Y, Loveland KL. Bovine sertoli cells colonize and form tubules in murine hosts following transplantation and grafting procedures. *Journal of andrology*. 2008;29(4):418-30.
31. Dobrinski I, editor *Germ cell transplantation*. *Seminars in reproductive medicine*; 2005: Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New .
32. Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biology of Reproduction*. 2001;64(5):1409-16.
33. Sadri-Ardekani H, Mizrak SC, van Daalen SK, Korver CM, Roepers-Gajadien HL, Koruji M, et al. Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *Jama*. 2009;302(19):2127-34.

34. Dym M, Kokkinaki M, He Z. Spermatogonial stem cells: mouse and human comparisons. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2009;87(1):27-34.
35. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*. 1998;282(5391):1145-7.
36. Rodríguez J, Agapito J, de la Flora I, Barreto T, Timoteo O, Herrera-Velita P, et al. Genetic diversity in alpaca (*vicugna pacos*) populations using 10 microsatellite markers. *Sustainable Improvement of Animal Production and Health*.
37. Paredes M, Membrillo A, Azor P, Machaca J, Torres D, Serrano AM. Genetic and phenotypic variation in five populations of Huacaya Alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Small ruminant research*. 2013;111(1-3):31-40.
38. Barreta J, Iñiguez V, Saavedra V, Romero F, Callisaya AM, Echalar J, et al. Genetic diversity and population structure of Bolivian alpacas. *Small Ruminant Research*. 2012;105(1-3):97-104.
39. Vassena R, Eguizabal C, Heindryckx B, Sermon K, Simon C, van Pelt A, et al. Stem cells in reproductive medicine: ready for the patient? *Human Reproduction*. 2015;30(9):2014-21.
40. Goossens E, Van Saen D, Tournaye H. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic. *Human reproduction*. 2013;28(4).
41. Yango P, Altman E, Smith JF, Klatsky PC, Tran ND. Optimizing cryopreservation of human spermatogonial stem cells: comparing the effectiveness of testicular tissue and single cell suspension cryopreservation. *Fertility and sterility*. 2014;102(5):1491-8. e1.

42. Lee Y-A, Kim Y-H, Kim B-J, Kim B-G, Kim K-J, Auh J-H, et al. Cryopreservation in trehalose preserves functional capacity of murine spermatogonial stem cells. *PloS one*. 2013;8(1):e54889.
43. Oatley JM, Reeves JJ, McLean DJ. Biological activity of cryopreserved bovine spermatogonial stem cells during in vitro culture. *Biology of Reproduction*. 2004;71(3):942-7.
44. Oatley JM, de Avila DM, Reeves JJ, McLean DJ. Testis tissue explant culture supports survival and proliferation of bovine spermatogonial stem cells. *Biology of reproduction*. 2004;70(3):625-31.
45. Lee W-Y, Lee K-H, Heo Y-T, Kim N-H, Kim J-H, Kim J-H, et al. Transcriptional coactivator undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 expressed in spermatogonial stem cells: a putative marker of boar spermatogonia. *Animal reproduction science*. 2014;150(3-4):115-24.
46. Valdivia M, Castañeda-Zegarra S, Lévano G, Lazo J, Reyes J, Bravo Z, et al. Spermatogonial stem cells identified by molecular expression of PLZF, integrin β 1 and reactivity to Dolichos biflorus agglutinin (DBA) in alpaca adult testes. *Andrologia* 2019, Vol 151 (6): e13283.
47. Valdivia M, Reyes J, Bravo Z, Cancho C, Limaymanta O, Woll P, et al. In vitro culture of spermatogonial stem cells (SSCs) isolated from adult alpaca (*Vicugna pacos*) testes identified by Dolichos biflorus (DBA). *Andrologia*. 2019; e13269:7 pages.
48. Valdivia M, Reyes J, Bravo Z, Gonzales G, inventors; Protocolo de criopreservación para células espermatogoniales aisladas de alpaca. In institutional evaluation, assignee. Perú, 2019.

49. Hermann BP, Sukhwani M, Lin CC, Sheng Y, Tomko J, Rodriguez M, et al. Characterization, cryopreservation, and ablation of spermatogonial stem cells in adult rhesus macaques. *Stem cells*. 2007;25(9):2330-8.
50. Kim K-J, Lee Y-A, Kim B-J, Kim Y-H, Kim B-G, Kang H-G, et al. Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing. *Cryobiology*. 2015;70(2):175-83.
51. PAN C-y, Shuai Y, ZHANG P-f, Bo W, ZHU Z-d, LIU Y-y, et al. Effect of sucrose on cryopreservation of pig spermatogonial stem cells. *Journal of integrative agriculture*. 2017;16(5):1120-9.
52. Blanco-Rodriguez J. A matter of death and life: the significance of germ cell death during spermatogenesis. *International journal of andrology*. 1998;21(5):236-48.
53. Ha S-J, Kim B-G, Lee Y-A, Kim Y-H, Kim B-J, Jung S-E, et al. Effect of antioxidants and apoptosis inhibitors on cryopreservation of murine germ cells enriched for spermatogonial stem cells. *PloS one*. 2016;11(8):e0161372.
54. Vásquez J, Florentini E, Valdivia M. Hypoosmotic swelling test in alpaca (*Vicugna pacos*) epididymal spermatozoa. *Reproduction in domestic animals*. 2012;47(6):e83-e7.
55. Evangelista-Vargas D, Evangelista-Vargas S, Valdivia M, Santiani A. 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. *Reproduction in domestic animals*. 2017;52(2):312-8.
56. Bravo Z, Valdivia M. Effect of follicular fluid on sperm motility of alpaca *vicugna pacos* (Linnaeus, 1758). *JSM Invitro Fertilization*. 2017;2(2):1013.
57. Bravo Z, Valdivia M. Follicular fluid stimulates capacitation and acrosome reaction in alpaca sperm (*Vicugna pacos*). *Reproduction in domestic animals*. 2018;53(3):629-35.

58. Zezé B, Briceño R, Valdivia M. Efecto del fluido folicular sobre la capacidad de unión a zona pelúcida de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Spermova*. 2017;7(2):106-9.
59. Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez LI C, Valdivia M, et al. Efecto de crioprotectores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2010;21(2):145-53.
60. Canorio N, Arnedo F, Valdivia M 76. Cryocapacitation of Alpaca (*Vicugna pacos*) sperm cell. *Cryobiology*. 2012;65(3):364-6.
61. Santiani A, Evangelista S, Valdivia M, Risopatrón J, Sánchez R. Erratum to “Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation” *Theriogenology* 79 (2013) 842–846. *Theriogenology*. 2013;3(80):284.
62. Canorio Pariona N, Paredes Arnedo F, Valdivia Cuya M. Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2015;26(3):434-43.
63. Schover LR, Rybicki LA, Martin BA, Bringelsen KA. Having children after cancer: a pilot survey of survivors' attitudes and experiences. *Cancer*. 1999;86(4):697-709.
64. Lonnie R. Mammalian spermatogenesis. . In: Press CR, editor. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 16: Cache River Press; 1990. p. 1-40.
65. Yang S-R, Rahman I, Trosko JE, Kang K-S. Oxidative stress-induced biomarkers for stem cell-based chemical screening. *Preventive Medicine*. 2012;54:S42-S9.
66. Tagelenbosch RA, de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation*

Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1993;290(2):193-200.

67. Vansandt LM, Livesay JL, Dickson MJ, Li L, Pukazhenthil BS, Keefer CL.

Conservation of spermatogonial stem cell marker expression in undifferentiated felid spermatogonia. *Theriogenology*. 2016;86(4):1022-35. e3.

68. Ryu B-Y, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(40):14302-7.

69. von Kopylow K, Schulze W, Salzbrunn A, Spiess A-N. Isolation and gene expression analysis of single potential human spermatogonial stem cells. *Molecular human reproduction*. 2016;22(4):229-39.

70. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. β 1-and α 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(10):5504-9.

71. Oatley JM, Avarbock MR, Talaranta AI, Fearon DT, Brinster RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(25):9524-9.

72. Garbuzov A, Pech MF, Hasegawa K, Sukhwani M, Zhang RJ, Orwig KE, et al. Purification of GFR α 1⁺ and GFR α 1⁻spermatogonial stem cells reveals a niche-dependent mechanism for fate determination. *Stem cell reports*. 2018;10(2):553-67.

73. Boitani C, Di Persio S, Esposito V, Vicini E, editors. *Spermatogonial cells: mouse, monkey and man comparison*. *Seminars in cell & developmental biology*; 2016: Elsevier.

74. Oatley JM, Brinster RL. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annual review of cell and developmental biology*. 2008;24:263-86.

75. Wu X, Schmidt JA, Avarbock MR, Tobias JW, Carlson CA, Kolon TF, et al. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(51):21672-7
76. Gonzales GF, Cordova A, Vega K, Chung A, Villena A, Góñez C. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *Journal of endocrinology*. 2003;176(1):163-8
77. Zenico T, Cicero A, Valmorri L, Mercuriali M, Bercovich E. Subjective effects of *Lepidium meyenii* (Maca) extract on well-being and sexual performances in patients with mild erectile dysfunction: a randomised, double-blind clinical trial. *Andrologia*. 2009;41(2):95-9.
78. Gonzales GF, Cordova A, Vega K, Chung A, Villena A, Góñez C, et al. Effect of *Lepidium meyenii* (MACA) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. *andrologia*. 2002;34(6):367-72.
79. Clément C, Diaz Grados DA, Avula B, Khan IA, Mayer AC, Ponce Aguirre DD, et al. Influence of colour type and previous cultivation on secondary metabolites in hypocotyls and leaves of maca (*Lepidium meyenii* Walpers). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010;90(5):861-9.
80. Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, Fernández G, Yucra S, Rubio J, et al. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;3(1):5.
81. Gonzales GF, Villaorduña L, Gasco M, Rubio J, Gonzales C. Maca (*Lepidium meyenii* Walp), una revisión sobre sus propiedades biológicas. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*. 2014;31(1):100-10.

82. Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2006;103(3):448-54.
83. Gonzales-Castañeda C, Rivera V, Chirinos AL, Evelson P, Gonzales GF. Photoprotection against the UVB-induced oxidative stress and epidermal damage in mice using leaves of three different varieties of *Lepidium meyenii* (maca). *International journal of dermatology*. 2011;50(8):928-38.
84. Zhao J, Avula B, Chan M, Clément C, Kreuzer M, Khan IA. Metabolomic differentiation of maca (*Lepidium meyenii*) accessions cultivated under different conditions using NMR and chemometric analysis. *Planta medica*. 2012;78(01):90-101.
85. Zha S, Zhao Q, Chen J, Wang L, Zhang G, Zhang H, et al. Extraction, purification and antioxidant activities of the polysaccharides from maca (*Lepidium meyenii*). *Carbohydrate polymers*. 2014;111:584-7.
86. Curaba M, Poels J, Van Langendonckt A, Donnez J, Wyns C. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? *Fertility and sterility*. 2011;95(6):2123. e9-. e12.
87. Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, et al. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nature communications*. 2014;5:4320.
88. Baukloh V. Retrospective multicentre study on mechanical and enzymatic preparation of fresh and cryopreserved testicular biopsies. *Human Reproduction*. 2002;17(7):1788-94.
89. Brook PF, Radford JA, Shalet SM, Joyce AD, Gosden RG. Isolation of germ cells from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertility and sterility*. 2001;75(2):269-74.

90. Gosden R, Nagano M. Preservation of fertility in nature and ART. REPRODUCTION-CAMBRIDGE-. 2002;123(1):3-11.
91. Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K, Hovatta O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. Human Reproduction. 2007;22(5):1384-95.
92. Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, et al. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. Human Reproduction. 2002;17(12):3039-45.
93. Suzuki N, Donnez J. Gonadal tissue cryopreservation in fertility preservation: Springer; 2016.
94. Jezek D, Schulze W, Kalanj-Bognar S, Vukelić Z, Milavec-Puretić V, Krhen I. Effects of various cryopreservation media and freezing–thawing on the morphology of rat testicular biopsies. Andrologia. 2001;33(6):368-78.
95. Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. Nature medicine. 1996;2(6):693.
96. Brinster RL, Nagano M, editors. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. Seminars in cell & developmental biology; 1998: Elsevier.
97. Izadyar F, Spierenberg G, Creemers L, Ouden Kd, De Rooij D. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. REPRODUCTION-CAMBRIDGE-. 2002;124(1):85-94.
98. Izadyar F, Matthijs-Rijsenbilt J, Den Ouden K, CREEMERS LB, WOELDERS H, de ROOIJ DG. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. Journal of andrology. 2002;23(4):537-45.

99. Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive biomedicine online*. 2004;9(6):680-91.
100. Pegg D. The history and principles of cryopreservation. In *Seminars in reproductive medicine* 20. USA: Thieme Medical Publishers; 2002. p. 05-14.
101. Said TM, Gaglani A, Agarwal A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online*. 2010;21(4):456-62.
102. Heng BC, Ye CP, Liu H, Toh WS, Rufaihah AJ, Yang Z, et al. Loss of viability during freeze-thaw of intact and adherent human embryonic stem cells with conventional slow-cooling protocols is predominantly due to apoptosis rather than cellular necrosis. *Journal of biomedical science*. 2006;13(3):433-45.
103. Onofre J, Baert Y, Faes K, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Human reproduction update*. 2016;22(6):744-61.
104. Lozano GM, Bejarano I, Espino J, Gonzalez D, Ortiz A, Garcia JF, et al. Relationship between caspase activity and apoptotic markers in human sperm in response to hydrogen peroxide and progesterone. *The Journal of reproduction and development*. 2009;55(6):615-21.
105. Heng BC. Effect of Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 on the post-thaw viability of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue and Cell*. 2009;41(5):376-80.
106. Xu X, Cowley S, Flaim CJ, James W, Seymour L, Cui Z. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnology progress*. 2010;26(3):827-37.
107. Bavister BD. The mitochondrial contribution to stem cell biology. *Reproduction, Fertility and Development*. 2006;18(8):829-38.

108. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human reproduction update*. 2009;15(5):553-72.
109. Krysko DV, Roels F, Leybaert L, D'Herde K. Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001;49(10):1277-84.
110. Ly JD, Grubb D, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*. 2003;8(2):115-28.
111. Gollapudi S, McCORMICK MJ, Gupta S. Changes in mitochondrial membrane potential and mitochondrial mass occur independent of the activation of caspase-8 and caspase-3 during CD95-mediated apoptosis in peripheral blood T cells. *International journal of oncology*. 2003;22(3):597-600.
112. Castro L, Hamilton TRdS, Mendes C, Nichi M, Barnabe VH, Visintin JA, et al. Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. *Journal of animal science and biotechnology*. 2016;7(1):17.
113. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 1992;13(2):204-8.
114. Sansome C, Zaika A, Marchenko ND, Moll UM. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria: detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS letters*. 2001;488(3):110-5.

- 115.Hsu Y-T, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-XL during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(8):3668-72.
- 116.Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397(6718):441.
- 117.Hikim APS, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2003;85(2-5):175-82.
- 118.Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Odontogenesis: Springer*; 2012. p. 41-7.
- 119.Escada-Rebelo S, Silva A, Amaral S, Tavares R, Paiva C, Schlatt S, et al. Spermatogonial stem cell organization in felid testis as revealed by *Dolichos biflorus* lectin. *Andrology*. 2016;4(6):1159-68.
- 120.Nash R, Neves L, Faast R, Pierce M, Dalton S. The lectin *Dolichos biflorus* agglutinin recognizes glycan epitopes on the surface of murine embryonic stem cells: a new tool for characterizing pluripotent cells and early differentiation. *Stem Cells*. 2007;25(4):974-82.
- 121.Park MH, Kim MS, Yun JI, Choi JH, Lee E, Lee ST. Integrin heterodimers expressed on the surface of porcine spermatogonial stem cells. *DNA and cell biology*. 2018;37(3):253-63.
- 122.Bedford-Guaus S, Kim S, Mulero L, Vaquero J, Morera C, Adan-Milanès R, et al. Molecular markers of putative spermatogonial stem cells in the domestic cat. *Reproduction in domestic animals*. 2017;52:177-86.

123. Goel S, Reddy N, Mahla RS, Suman SK, Pawar RM. Spermatogonial stem cells in the testis of an endangered bovid: Indian black buck (*Antelope cervicapra* L.). *Animal reproduction science*. 2011;126(3-4):251-7.
124. Valdivia M, Reyes J, Bravo Z, Gonzales GF, inventors Solicitud de patente: “PROTOCOLO DE CRIOPRESERVACION PARA CELULAS ESPERMATOGONIALES AISLADAS” Perú 2019.
125. MINCETUR. Informe de la Exportación de Maca y Alpaca 2018. 2018.
126. Ferasin L, Ogden D, Davies S, Kirby R, D’Alterio G. Electrocardiographic parameters of normal alpacas (*Lama pacos*). *Veterinary record*. 2005;157(12):341-3.
127. Fleis RI, Scott DW. The microanatomy of healthy skin from alpacas (*Vicugna pacos*). *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 2010;22(5):716-9.
128. Sumar J. La alpaca peruana de raza suri. *Revista de Investigaciones Veterinarias*. 1998(10).
129. Renieri C, Frank E, Rosati A, Antonini M. Definición de razas en llamas y alpacas. *Animal Genetic Resources/Resources génétiques animales/Recursos genéticos animales*. 2009;45:45-54.
130. Alan L. Parámetros genéticos de caracteres funcionales y secundarios en alpacas: Universidad Complutense de Madrid; 2018.
131. Sumar J. Studies on reproductive pathology in alpacas. 1983.
132. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols*: Springer; 2000. p. 365-86.
133. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic acids research*. 2003;31(13):3406-15.
134. Florentini E, Vasquez J, Valdivia M. Detección del transcrito referencial RPLO en tejido gonadal de alpaca. *Spermova*. 2011;1(1):134-5.

- 135.Valdivia M, Reyes J, Zezé B, Gonzales G, inventorsSolicitud de Patente “FORMULACION DE MEDIO DE CRIOPRESERVACION PARA TEJIDOS (BIOPSIAS O FRAGMENTOS TESTICULARES)”. Perú2019.
- 136.Zanganeh BM, Rastegar T, Roudkenar MH, Kashani IR, Amidi F, Barbarestani M. Co-culture of spermatogonial stem cells with sertoli cells in the presence of testosterone and FSH improved differentiation via up-regulation of post meiotic genes. *Acta Medica Iranica*. 2013;51(1):1-11.
- 137.Sato K. On the Real Nature of Vital Staining. *Folia Anatomica Japonica*. 1930;8(1):51-61.
- 138.Altman SA, Randers L, Rao G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology progress*. 1993;9(6):671-4.
- 139.Aponte PM, Soda T, Teerds KJ, Mizrak SC, van de Kant HJ, de Rooij DG. Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reproduction*. 2008;136(5):543-57.
- 140.Fujihara M, Kim S-M, Minami N, Yamada M, Imai H. Characterization and in vitro culture of male germ cells from developing bovine testis. *Journal of Reproduction and Development*. 2011;1101260348-.
- 141.Liu S, Tang Z, Xiong T, Tang W. Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2011;9(1):141.
- 142.Ahmad S, Xiao Y, Han L, Hua H, Riaz H, Liang A, et al. Isolation, Identification and Enrichment of Type A Spermatogonia from the Testis of Chinese Cross-Bred Buffaloes (Swamp× River). *Reproduction in Domestic Animals*. 2013;48(3):373-81.

143. Goel S, Sugimoto M, Minami N, Yamada M, Kume S, Imai H. Identification, isolation, and in vitro culture of porcine gonocytes. *Biology of Reproduction*. 2007;77(1):127-37.
144. Borjigin U, Davey R, Hutton K, Herrid M. Expression of promyelocytic leukaemia zinc-finger in ovine testis and its application in evaluating the enrichment efficiency of differential plating. *Reproduction, Fertility and Development*. 2010;22(5):733-42.
145. Manku G, Culty M. Mammalian gonocyte and spermatogonia differentiation: recent advances and remaining challenges. *Reproduction*. 2015;149(3):R139-R57.
146. David G, Alland L, Hong S-H, Wong C-W, DePinho RA, Dejean A. Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene*. 1998;16(19):2549.
147. Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, et al. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nature genetics*. 2004;36(6):647.
148. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, et al. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nature genetics*. 2004;36(6):653.
149. Song H-W, Wilkinson MF, editors. Transcriptional control of spermatogonial maintenance and differentiation. *Seminars in cell & developmental biology*; 2014: Elsevier.
150. Suzuki H, Ahn HW, Chu T, Bowden W, Gassei K, Orwig K, et al. SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation. *Developmental biology*. 2012;361(2):301-12.

151. Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, et al. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell stem cell*. 2007;1(4):403-15.
152. Lee J, Kim HK, Rho J-Y, Han Y-M, Kim J. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(44):33554-65.
153. Schlatt S, Kim SS, Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction*. 2002;124(3):339-46.
154. Abrishami M, Anzar M, Yang Y, Honaramooz A. Cryopreservation of immature porcine testis tissue to maintain its developmental potential after xenografting into recipient mice. *Theriogenology*. 2010;73(1):86-96.
155. Baert Y, Braye A, Struijk RB, Van Pelt AM, Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter in vitro cell dynamics. *Fertility and sterility*. 2015;104(5):1244-52. e4.
156. Reyes J. Proliferación de células madre espermatogoniales (SSC) de alpaca (*Vicugna pacos*) y su posterior criopreservación [Tesis de Licenciatura]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.
157. Valdivia Cuya M, Reyes J, Bravo Z, Gonzales G, inventors Solicitud de Patente Protocolo de criopreservación para células espermatogonmiales aisladas sin y con proliferación In vitro Perú 2019.
158. Pacchiarotti J, Ramos T, Howerton K, Greilach S, Zaragoza K, Olmstead M, et al. Developing a clinical-grade cryopreservation protocol for human testicular tissue and cells. *BioMed Research International*. 2013;2013.

159. Sa R, Cremades N, Malheiro I, Sousa M. Cryopreservation of human testicular diploid germ cell suspensions. *Andrologia*. 2012;44(6):366-72.
160. Baert Y, Van Saen D, Haentjens P, In't Veld P, Tournaye H, Goossens E. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? *Human Reproduction*. 2013;28(7):1816-26.
161. Karlsson JO, Toner M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*. 1996;17(3):243-56.
162. Yavin S, Arav A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*. 2007;67(1):81-9.
163. Gouk SS, Loh YFJ, Kumar SD, Watson PF, Kuleshova LL. Cryopreservation of mouse testicular tissue: prospect for harvesting spermatogonial stem cells for fertility preservation. *Fertility and sterility*. 2011;95(7):2399-403.
164. Travers A, Milazzo JP, Perdrix A, Metton C, Bironneau A, Mace B, et al. Assessment of freezing procedures for rat immature testicular tissue. *Theriogenology*. 2011;76(6):981-90.
165. Picton HM, Wyns C, Anderson RA, Goossens E, Jahnukainen K, Kliesch S, et al. A European perspective on testicular tissue cryopreservation for fertility preservation in prepubertal and adolescent boys. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2015;30(11):2463-75.
166. Wyns C, Curaba M, Vanabelle B, Van Langendonckt A, Donnez J. Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):312-28.
167. Poels J, Van Langendonckt A, Many MC, Wese FX, Wyns C. Vitrification preserves proliferation capacity in human spermatogonia. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2013;28(3):578-89.

168. Poels J, Abou-Ghannam G, Herman S, Van Langendonck A, Wese FX, Wyns C. In Search of Better Spermatogonial Preservation by Supplementation of Cryopreserved Human Immature Testicular Tissue Xenografts with N-acetylcysteine and Testosterone. *Frontiers in surgery*. 2014;1:47.
169. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Human reproduction* (Oxford, England). 2005;20(6):1676-87.
170. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, Hattori N, Tanaka S, Yagi S, et al. Dimethyl sulfoxide has an impact on epigenetic profile in mouse embryoid body. *Stem Cells*. 2006;24(11):2549-56.
171. Khalili B, Farshad A, Zamiri MJ, Rashidi A, Fazeli P. Effects of Sucrose and Trehalose on the Freezability of Markhoz Goat Spermatozoa. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2009;22(12):1614-9.
172. Woelders H, Matthijs A, Engel B. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology*. 1997;35(2):93-105.
173. Bissoyi A, Pramanik K, Panda NN, Sarangi SK. Cryopreservation of hMSCs seeded silk nanofibers based tissue engineered constructs. *Cryobiology*. 2014;68(3):332-42.
174. Aliakbari F, Gilani MA, Amidi F, Baazm M, Korouji M, Izadyar F, et al. Improving the Efficacy of Cryopreservation of Spermatogonia Stem Cells by Antioxidant Supplements. *Cellular reprogramming*. 2016;18(2):87-95.
175. Aliakbari F, Sedighi Gilani MA, Yazdekhesti H, Koruji M, Asgari HR, Baazm M, et al. Effects of antioxidants, catalase and alpha-tocopherol on cell viability and

oxidative stress variables in frozen-thawed mice spermatogonial stem cells. Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology. 2017;45(1):63-8.

176.Sandoval M, Zhang XJ, Liu X, Mannick EE, Clark DA, Miller MJ. Peroxynitrite-induced apoptosis in T84 and RAW 264.7 cells: attenuation by L-ascorbic acid. Free radical biology & medicine. 1997;22(3):489-95.

177.Valdivia Cuya M, Yarasca De La Vega K, Levano Sanchez G, Vasquez Caverio J, Temoche Garcia H, Torres Torres L, et al. Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on testicular function of mice with chemically and physically induced subfertility. Andrologia. 2016;48(8):927-34.

178.Gonzales-Arimborgo C, Yupanqui I, Montero E, Alarcon-Yaquetto DE, Zevallos-Concha A, Caballero L, et al. Acceptability, Safety, and Efficacy of Oral Administration of Extracts of Black or Red Maca (*Lepidium meyenii*) in Adult Human Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. Pharmaceuticals (Basel, Switzerland). 2016;9(3).

179.Bissoyi A, Pramanik K. Role of the apoptosis pathway in cryopreservation-induced cell death in mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. Biopreserv Biobank. 2014;12(4):246-54.

180.Baust JM, Vogel MJ, Van Buskirk R, Baust JG. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. Cell transplantation. 2001;10(7):561-71.

181.Baust JM, Van B, Baust JG. Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. In vitro cellular & developmental biology Animal. 2000;36(4):262-70.

182. Baust JM, Van Buskirk R, Baust JG. Modulation of the cryopreservation cap: elevated survival with reduced dimethyl sulfoxide concentration. *Cryobiology*. 2002;45(2):97-108.
183. Gillis K, Clor J, Khan A, Tyagarajan K. Multiplexed approaches correlating mitochondrial health to cell health using microcapillary cytometry. *Methods (San Diego, Calif)*. 2018;134-135:106-12.
184. Parillo F, Verini Supplizi A, Mancuso R, Catone G. Glycomolecule Modifications in the Seminiferous Epithelial Cells and in the Acrosome of Post-testicular Spermatozoa in the Alpaca. *Reproduction in domestic animals*. 2012;47(4):675-86.
185. Diekman A. Glycoconjugates in sperm function and gamete interactions: how much sugar does it take to sweet-talk the egg? *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2003;60(2):298-308.
186. Schröter S, Osterhoff C, McArdle W, Ivell R. The glycocalyx of the sperm surface. *Human reproduction update*. 1999;5(4):302-13.
187. Jiménez I, González-Márquez H, Ortiz Ro, Herrera JA, García A, Betancourt M, et al. Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2003;59(5-6):1171-80.
188. Lee Y, Kim Y, Kim B, Kim K, Auh J et al. Cryopreservation in trehalose preserves functional capacity of murine Spermatogonial stem cell. *PloS one* 2013; 8(1):e54889
189. Yogev L, Kleiman S, Shabtai E, Botchan A, Paz G, Hauser R et al. Long-term cryostorage of sperm in a human sperm bank does not damage progressive motility concentration. 2010; 25(5):1097-1103.
190. Singh, S. R., Burnicka-Turek, O., Chauhan, C., & Hou, S. X. Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *Journal of cellular and molecular medicine*. . (2011); 15(3), 468-483.

191. Kanatsu-Shinohara M, Masanori Takehashi, Takashima S, Lee J, Morimoto H et al. Homing of Mouse Spermatogonial Stem Cells to Germline Niche Depends on b1-Integrin. *Cell Stem Cell* (2008); 3, 533–542.
192. Wu, X., Goodyear, S. M., Abramowitz, L. K., Bartolomei, M. S., Tobias, J. W., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. *Human reproduction*, (2012), 27(5), 1249-1259.
193. Baust, J. G., Gao, D., & Baust, J. M. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis* (2009). 5(3), 90-96.
194. Mazur, P., & Cole, K. W.. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Cryobiology*, (1985), 22(6), 509-536.
195. Yu, F. R., Yang, B., Li, Z. P., Lian, X. Z., Xie, M. R., Li, D. L., & Zhang, S. S.. Effects of the maca extract on the ultrastructures of mitochondria in the spinal nerve cell and exercise endurance. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi= Zhongguo yingyong shenglixue zazhi= Chinese journal of applied physiology*, (2017), 33(6), 535-538.
196. Gugnani, K. S., Vu, N., Rondón-Ortiz, A. N., Böhlke, M., Maher, T. J., & Pino-Figueroa, A. J. Neuroprotective activity of macamides on manganese-induced mitochondrial disruption in U-87 MG glioblastoma cells. *Toxicology and applied pharmacology*, (2018), 340, 67-76.
197. Zhang, M., Wu, W., Ren, Y., Li, X., Tang, Y., Min, T., & Wu, H. Structural characterization of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii* (maca) and analysis of its regulatory function in macrophage polarization in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, (2017), 65(6), 1146-1157.

198. Zhang, M., Wu, W., Ren, Y., Li, X., Tang, Y., Min, T., ... & Wu, H. Structural characterization of a novel polysaccharide from *Lepidium meyenii* (maca) and analysis of its regulatory function in macrophage polarization in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, (2017). 65(6), 1146-1157.

X. ANEXOS

Anexo N°1: Muestras usadas en el estudio:

PARÁMETROS	PESO	CONCENTRACIÓN	CONCENTRACIÓN	MOVILIDAD
MUESTRAS N°	TESTICULAR (g)	CÉLULAS ESPERMATOGONIALES (millones/ml)	CÉLULAS ESPERMÁTICAS (millones /ml epididimo)	ESPERMÁTICA
1	6,83	30,25	8	Mala
2	9,13	1115,02	21,5	Mala
3	10,73	61,25	1,5	Mala
4	11,49	136,42	13,5	Mala
5	13,17	1249,19	24	Mala
6	17,83	724,58	23,5	Mala
7	8,74	ND	23	Regular
8	9,96	151,21	26,5	Regular
9	10,15	512,02	41	Regular
10	11,14	512,53	183,5	Regular
11	11,15	355,83	1000	Regular
12	11,68	2462,8	30,5	Regular
13	11,69	1365,65	20	Regular
14	11,9	835,2	62	Regular
15	12,22	516,97	16,5	Regular
16	12,23	330,55	14	Regular
17	12,3	29,7	203	Regular
18	13,26	111,74	33	Regular
19	13,32	715,98	13	Regular
20	13,61	8573,8	131	Regular
21	13,72	2488,09	90	Regular
22	13,88	118,48	298,5	Regular
23	14,58	1179,75	171,5	Regular
24	18,89	524,98	1029,5	Regular
25	7,97	53,55	7	Buena
26	8,55	37,1	9	Buena
27	18,7	78,65	9,5	Buena
28	7,99	34,38	100,5	Buena
29	8,71	330,57	130,5	Buena
30	9,03	83,57	275,5	Buena
31	9,68	2151,88	35,5	Buena
32	10,54	70,98	48,5	Buena
33	11,57	117,4	491,5	Buena
34	11,6	346,88	13,5	Buena
35	11,76	61,43	113,5	Buena
36	11,9	169,46	230,5	Buena
37	12,48	105,61	355	Buena
38	12,59	197,93	20,5	Buena
39	13,01	119,79	530	Buena
40	13,92	240,26	155,5	Buena
41	14,04	184,39	427	Buena
42	14,53	156,26	592	Buena
43	15,24	117,09	281	Buena
44	16,06	3734,06	96,5	Buena
45	17,43	1297,01	17,5	Buena
46	19,04	78,21	87	Buena
47	19,94	151,21	350	Buena

Anexo N°2 : Tiempo de congelamiento de Fragmentos testiculares a -196°C

FRAGMENTOS (44 muestras)	
Número de Muestra	Tiempo de Congelamiento
1	1 día
2	15 días
3	15 días
4	9 días
5	26 días
6	30 días
7	30 días
8	11 días
9	11 días
10	6 días
11	14 días
12	40 días
13	53 días
14	138 días
15	151 días
16	47 días
17	96 días
18	47 días
19	2 días
20	53 días
21	74 días
22	3 días
23	4 días
24	4 días
25	26 días
26	12 días
27	11 días
28	24 días
29	95 días
30	116 días
31	116 días
32	125 días
33	33 días
34	101 días
35	81 días
36	81 días
37	82 días
38	32 días
39	166 días
40	41 días
41	40 días
42	84 días
43	43 días
44	141 días

Anexo N°3: Tiempo de congelamiento de células espermatogoniales asiladas a -196°C

SSC (32 muestras)	
Número de Muestra	Tiempo de Congelamiento
1	1 día
2	62 días
3	10 días
4	12 días
5	40 días
6	96 días
7	5 días
8	6 días
9	10 días
10	2días
11	4 días
12	3 días
13	3 días
14	5 días
15	1 días
16	148 días
17	111 días
18	6 días
19	32días
20	116 días
21	116 días
22	125días
23	125 días
24	40 días
25	104 días
26	41 días
27	85 días
28	14 días
29	32 días
30	7 días
31	7 días
32	7 días

Anexo N° 4. Viabilidad de las células espermatozonales de alpaca postdescongelamiento proveniente de fragmentos con azul de Tripán .

N°	MTOR	MTON	MTD	MTAR	MTAN	MTA	MEOR	MEON	MEO	MEAR	MEAN	MFA	MSOR	MSON	MSO	MSAR	MSAN	MSA
1	79	91	95	72	70	61	65	76	22	35	24	33	25	60	66	35	49	79
2	70	34	92	90	90	81	44	25	56	91	69	61	58	72	93	46	99	84
3	47	35	80	81	68	65	39	27	65	80	60	58	51	69	87	86	85	87
4	71	100	91	97	29	95	77	98	97	94	85	43	88	89	81	93	92	95
5	89	94	92	94	0	94	90	99	87	25	18	62	90	95	87	76	76	85
6	90	79	75	61	80	82	84	73	61	10	38	39	8	73	83	70	55	73
7	36	35	49	77	12	11	43	14	27	18	44	32	71	79	3	37	56	24
8	89	90	84	89	82	73	82	75	82	73	68	84	75	73	65	67	45	28
9	45	72	65	28	41	61	30	10	6	33	46	22	9	7	45	12	29	33
10	7	4	4	30	66	34	51	2	25	24	19	9	3	39	88	14	23	27
11	34	53	29	30	5	72	29	9	84	49	71	16	65	29	95	79	83	30
12	74	69	45	61	43	56	55	42	80	81	83	92	18	69	76	55	70	61
13	84	72	70	45	65	67	61	64	75	22	37	48	57	78	65	73	69	79
14	77	47	38	55	94	92	79	83	89	93	90	63	37	95	88	88	78	76
15	30	88	83	62	78	85	81	89	87	16	94	86	59	77	52	67	44	58
16	16	27	26	17	22	23	35	13	34	27	23	30	6	23	20	20	28	4
17	30	38	34	88	49	68	21	18	36	29	29	14	13	24	17	15	20	26
18	70	89	50	85	84	86	77	79	79	50	82	15	70	46	63	80	53	83
19	32	28	36	2	12	14	5	30	6	26	5	7	35	22	29	43	26	32
20	8	27	21	35	34	64	33	45	16	28	13	63	15	6	46	50	9	51
21	41	72	77	70	68	69	87	73	64	57	60	81	64	59	63	55	64	64
22	39	49	38	44	46	46	7	54	65	66	20	31	69	60	37	55	58	41
23	82	91	75	76	81	72	52	61	76	43	54	52	56	37	60	78	60	76
24	38	47	66	52	34	60	46	44	40	49	43	48	56	60	26	28	52	58
25	55	42	50	49	52	38	41	43	24	40	44	40	47	42	46	35	30	47
26	55	56	59	58	30	37	46	38	58	61	45	48	45	46	47	51	43	48
27	40	69	49	78	77	81	49	74	69	62	59	57	31	61	46	64	64	44
28	43	87	80	87	94	76	5	93	81	89	82	74	78	83	86	8	75	86
29	61	96	64	80	75	28	49	87	52	61	84	68	64	63	57	85	94	100
30	10	5	31	3	5	72	8	6	31	52	6	88	26	54	64	38	41	47
31	45	30	56	29	14	17	23	43	79	22	13	14	82	14	14	30	15	19
32	30	39	17	26	82	37	59	54	95	40	87	72	54	56	71	30	59	22
33	94	86	82	64	96	100	98	96	88	76	92	94	92	62	63	76	81	74
34	15	75	67	94	91	86	90	69	87	82	82	82	76	74	64	83	68	67
35	49	64	43	86	61	65	64	53	60	46	72	59	64	62	74	52	91	72
36	63	24	80	73	83	89	74	62	95	86	88	84	56	77	71	46	84	80
37	73	61	59	64	66	52	67	40	48	66	62	53	84	55	62	36	45	65
38	6	41	46	47	1	93	91	86	40	72	39	78	87	100	88	88	85	84
39	63	87	79	83	87	83	83	82	77	88	80	86	88	72	45	62	99	91
40	64	73	52	65	57	65	43	71	62	51	57	21	66	40	68	53	92	90
41	91	53	72	67	79	86	84	69	78	89	69	67	75	94	90	72	69	56
42	41	58	42	49	42	43	34	51	44	36	45	24	47	30	43	43	57	61
43	68	54	61	44	71	50	70	45	71	67	59	53	46	41	35	65	75	48
44	56	46	28	59	23	29	36	32	19	36	53	47	7	34	41	24	79	50
PROMEDIO	52,3	58,6	57,5	60,1	55,4	61,9	54,3	54,4	59,0	54,5	54,3	52,2	52,6	56,8	59,6	53,7	60,7	58,2

**Anexo N° 5. Viabilidad de las células espermatozonales de alpaca
postdescongelamiento congeladas en forma aislada con azul de Tripán**

Nº	MTOR	MTON	MFO	MTAR	MTAN	MTA	MFOR	MFON	MFO	MFAR	MFAN	MFA	MSOR	MSON	MSO	MSOR	MSAN	MSA
1	68,0	35,3	13,3	67,1	30,9	32,3	52,4	28,6	25,5	6,9	17,5	21,2	24,5	10,1	56,1	23,1	51,5	11,4
2	59,1	65,0	56,6	59,7	47,7	53,8	61,0	63,8	82,4	57,8	85,1	74,6	69,4	54,3	63,0	65,4	74,6	73,0
3	42,2	25,6	29,4	0,0	25,6	32,7	46,2	23,9	45,8	45,8	38,9	37,5	31,6	33,3	34,5	26,2	35,6	26,7
4	52,2	41,4	34,2	25,4	17,9	26,5	32,9	30,0	30,4	18,8	31,9	11,9	32,2	20,6	34,6	29,4	14,1	18,9
5	66,7	36,2	37,5	17,4	23,4	30,0	20,8	35,0	28,7	30,0	34,5	28,0	25,2	36,5	24,2	17,9	36,7	47,7
6	51,1	36,5	39,1	11,3	5,0	10,6	3,6	12,0	28,6	20,0	30,0	27,6	41,2	5,9	28,6	55,9	9,5	57,6
7	11,3	6,7	17,5	1,9	13,2	0,0	29,8	2,9	17,5	7,8	13,3	33,8	22,7	10,4	10,2	11,1	3,6	0,5
8	44,6	31,5	34,9	51,6	38,8	43,4	37,5	31,3	39,9	49,3	33,6	48,9	39,7	45,1	66,5	39,0	52,5	52,3
9	16,7	27,7	25,9	46,3	42,9	27,3	7,1	42,2	9,3	50,3	28,6	35,5	21,3	7,9	22,2	12,5	6,1	17,5
10	16,3	13,9	33,3	7,1	24,5	11,0	39,0	31,1	25,9	84,9	43,4	90,9	32,6	38,0	40,0	11,7	29,3	29,2
11	67,3	41,6	69,3	40,5	57,5	13,1	63,5	63,4	26,5	30,2	15,4	11,5	34,3	46,3	48,5	22,2	21,5	15,6
12	69,8	77,9	66,9	73,4	73,3	66,0	75,9	73,1	48,4	55,3	59,0	66,0	64,2	69,6	52,1	63,9	60,3	63,6
13	35,3	29,0	58,5	47,9	39,0	24,0	17,7	17,1	62,2	33,8	20,4	33,0	8,8	44,5	45,8	50,2	32,1	35,2
14	50,5	57,3	56,1	50,5	64,6	43,6	49,4	62,4	54,5	77,7	43,6	58,0	51,6	42,3	39,1	46,7	46,2	45,1
15	37,6	20,6	21,8	9,7	14,6	17,9	25,3	16,2	12,0	8,4	0,0	12,2	16,7	30,8	18,8	7,1	0,0	14,8
16	42,3	40,8	30,8	32,2	25,6	41,0	37,6	28,4	37,6	26,7	32,4	51,7	23,1	28,7	22,3	33,7	33,4	52,5
17	20,2	21,1	10,3	12,0	85,5	39,6	16,0	24,8	29,3	30,6	19,7	39,1	22,3	31,2	16,8	32,0	15,1	19,6
18	69,8	53,8	66,3	7,1	26,3	11,1	44,7	48,8	75,4	15,2	17,9	14,2	52,6	16,7	65,4	30,3	35,6	53,5
19	74,2	35,8	27,0	44,4	12,7	38,7	26,0	17,1	0,0	16,3	19,7	14,5	20,5	12,1	31,6	27,5	38,5	23,0
20	29,4	18,3	14,7	40,3	32,9	49,4	11,1	13,3	31,8	15,6	21,1	11,3	12,9	33,3	11,2	13,1	36,7	30,6
21	86,4	72,1	62,5	74,1	62,0	70,7	79,2	77,1	72,7	67,4	72,9	72,4	60,3	66,4	54,5	85,1	81,9	68,3
22	33,8	11,1	55,9	30,5	41,8	40,7	35,9	60,0	36,1	32,8	72,3	39,6	19,4	48,5	32,7	40,4	45,9	61,9
23	37,7	53,9	47,6	57,1	63,2	54,5	55,8	49,0	67,3	69,3	72,6	64,8	56,6	55,0	35,7	55,1	62,4	70,1
24	39,0	27,3	30,7	23,0	22,4	55,9	22,2	24,8	23,1	33,8	35,9	36,4	54,1	47,7	43,9	63,6	32,9	55,1
25	33,3	43,1	68,1	51,7	69,4	75,3	43,0	60,3	67,2	52,1	54,9	63,5	57,7	58,0	58,0	71,9	75,8	50,5
26	58,1	51,3	55,4	63,2	71,8	89,8	65,8	55,1	63,8	67,6	74,0	69,5	77,4	59,7	51,3	59,3	65,4	57,9
27	23,3	28,9	23,1	58,3	39,4	21,2	19,4	3,2	19,4	25,0	26,6	8,8	8,5	2,7	56,3	23,5	30,4	61,5
28	39,8	45,7	43,0	48,9	35,2	67,0	30,6	37,2	43,8	53,3	46,3	77,1	60,2	59,5	62,8	57,3	49,8	66,7
29	48,4	65,5	66,8	51,0	43,7	54,8	48,9	53,6	63,7	48,7	45,8	53,6	65,6	61,6	71,4	50,6	57,8	57,1
30	78,6	75,6	39,5	45,9	50,8	55,6	42,6	45,9	63,6	52,3	48,4	56,7	61,5	39,5	54,3	24,5	35,1	33,8
31	13,9	20,4	30,0	9,0	13,1	18,2	29,3	22,2	10,4	4,9	28,6	43,0	55,6	46,7	25,0	9,3	24,1	34,6
32	35,7	48,3	58,6	46,5	36,0	36,7	50,4	51,9	54,3	28,0	41,3	41,0	51,0	45,1	49,4	53,6	62,8	54,9
Media	45,4	39,0	41,4	37,7	39,5	39,1	38,1	37,8	40,5	38,0	38,3	41,8	39,8	37,7	41,5	38,1	39,3	42,5

Anexo N°6. Viabilidad Media±EE de las células espermatozonales evaluados con azul de Tripán obtenidas desde fragmentos descongelados

		Media ± Error estándar		
	MEDIOS	TOTALES	BUENOS	REGULARES
1	MTOR	52,27 ± 3,80	66,9 ± 4,38	37,38 ± 4,45
2	MTON	58,57 ± 3,83	73,75 ± 4,58	43,73 ± 5,89
3	MTO	57,55 ± 3,45	72,38 ± 3,44	45,04 ± 4,26
4	MTAR	60,14 ± 3,23	75,67 ± 2,90	53,05 ± 8,84
5	MTAN	55,43 ± 4,43	71,89 ± 4,72	34,40 ± 8,09
6	MTA	61,91 ± 3,61	74,91 ± 3,51	53,76 ± 7,50
7	MFOR	54,25 ± 3,90	67,90 ± 4,56	32,48 ± 5,55
8	MFON	54,48 ± 4,18	71,53 ± 4,22	33,26 ± 7,69
9	MFO	59,02 ± 3,96	73,87 ± 3,55	46,13 ± 6,75
10	MFAR	54,57 ± 3,67	64,98 ± 5,30	47,34 ± 5,37
11	MFAN	54,25 ± 3,92	68,00 ± 4,54	40,05 ± 6,59
12	MFA	52,23 ± 3,82	63,12 ± 4,62	41,73 ± 7,54
13	MSOR	52,57 ± 3,97	61,56 ± 4,66	47,34 ± 5,37
14	MSON	56,84 ± 3,66	70,36 ± 3,30	50,43 ± 5,66
15	MSO	59,57 ± 3,54	72,17 ± 2,69	42,4 ± 8,89
16	MSAR	53,70 ± 3,56	65,55 ± 4,11	44,73 ± 6,52
17	MSAN	60,66 ± 3,64	73,49 ± 3,55	49,71 ± 6,24
18	MSA	59,20 ± 3,66	75,81 ± 3,25	40,55 ± 3,78

Muestras Buenas: ≥55% de viabilidad

Muestras regulares: <55% de viabilidad

Muestras malas <35% de viabilidad

Los datos son expresados como Media±Error estándar.

Prueba de contraste Kruskal Wallis.

Diferencia significativa (p value <0,05).

Totales, Buenos, regulares y malos MTOR, MTON y MSO (Pvalue >0,05)

Totales, Buenos, regulares y malos MTAR, MTAN y MSA (Pvalue >0,05)

Totales, Buenos, regulares y malos MFOR, MFON y MFO (Pvalue >0,05)

Totales, Buenos, regulares y malos MFAR, MFAN y MFA (Pvalue >0,05)

Totales, Buenos, regulares y malos MSOR, MSON y MSO (Pvalue >0,05)

Totales, Buenos, regulares y malos MSAR, MSAN y MSA (Pvalue >0,05)

**Anexo N°7. Viabilidad Media±EE de las células espermatogoniales
Postdescongelamiento congeladas en forma aislada y
evaluadas con Azul de Tripán**

		Media ± Error estándar		
	MEDIOS	TOTALES	BUENOS	REGULARES
1	MTOR	45,36 ± 3,57	54,24 ± 4,45	37,59 ± 4,79
2	MTON	39,34 ± 3,34	52,49 ± 4,63	27,75 ± 2,46
3	MTO	41,41 ± 3,2	52,76 ± 3,88	31,36 ± 3,54
4	MTAR	37,63 ± 3,89	51,89 ± 4,33	25,10 ± 4,45
5	MTAN	39,47 ± 3,67	50,77 ± 4,26	29,48 ± 4,72
6	MTA	39,19 ± 3,80	53,02 ± 5,03	26,89 ± 3,60
7	MFOR	38,16 ± 3,37	51,5 ± 3,61	26,32 ± 3,60
8	MFON	37,75 ± 3,65	53,47 ± 3,69	23,97 ± 3,54
9	MFO	40,53 ± 3,87	57,24 ± 4,11	25,79 ± 3,55
10	MFAR	38,03 ± 3,88	48,91 ± 5,21	28,40 ± 4,66
11	MFAN	38,34 ± 3,65	52,35 ± 5,29	25,90 ± 2,59
12	MFA	41,91 ± 4,07	54,81 ± 4,86	30,33 ± 4,94
13	MSOR	39,84 ± 3,50	54,11 ± 4,06	27,27 ± 3,31
14	MSON	37,69 ± 3,35	48,76 ± 4,35	28,03 ± 3,71
15	MSO	41,47 ± 3,04	54,15 ± 2,94	30,26 ± 3,23
16	MSAR	38,09 ± 3,68	51,08 ± 4,52	26,64 ± 4,01
17	MSAN	39,31 ± 3,81	57,17 ± 3,59	23,51 ± 3,13
18	MSA	42,59 ± 3,55	54,67 ± 4,07	31,81 ± 4,27

Muestras Buenas: $\geq 45\%$ de viabilidad

Muestras regulares: $< 45\%$ de viabilidad

Los datos son expresados como Media±Error estándar.

Prueba de contraste Kruskal Wallis.

Diferencia significativa (p value $< 0,05$).

Totales, Buenos y regulares MTOR, MTON y MSO (Pvalue $> 0,05$)

Totales, Buenos y regulares MTAR, MTAN y MSA (Pvalue $> 0,05$)

Totales, Buenos y regulares MFOR, MFON y MFO (Pvalue $> 0,05$)

Totales, Buenos y regulares MFAR, MFAN y MFA (Pvalue $> 0,05$)

Totales, Buenos y regulares MSOR, MSON y MSO (Pvalue $> 0,05$)

Totales, Buenos y regulares MSAR, MSAN y MSA (Pvalue $> 0,05$)

Anexo N°8. Porcentaje de células espermatozonales redondas frescas tipificadas mediante CF de acuerdo a la reactividad de la sonda DBA como sDBA+, wDBA+ y DBA-

N° DE MUESTRAS	sDBA+	wDBA+	DBA-
1	1,08	19,7	75,7
2	13,5	31	52,7
3	0,84	51,1	39,7
4	2,85	23,1	73,4
5	7,18	28,8	60,3
6	3,26	28,3	68,9
7	1,52	36,6	60
8	3,07	51,8	46,3
9	1,15	5,12	92,7
10	1,84	54,3	40,8
11	2,92	21,4	71,5
12	6,07	28,4	59,7
13	2,74	51,4	44,2
14	6,01	36,5	47,5
15	3,42	46,6	44,6
16	5,87	44,5	42
17	8,92	26,5	64
18	10,8	19,1	63,1
19	2,52	58,1	31,9
20	1,07	57,2	39,6
21	8,59	26,4	61,4
22	2,59	49	44,8
23	5,61	60,5	27,5
24	3,05	43,1	46,6
Media±EE	4,44±0,68	37,44±3,07	54,12±3,18

Anexo N°9. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en las muestras Totales proveniente de fragmentos congelados con CF

MEDOS-FRAG	TsDBA+		TwDBA+		TDBA-		TsMitosen+		TwMitosen+		T7AAD+	
	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue
1 MTOR	8,13±3,65		63,6±5,28		25,37±7,04		32,00±8,75		47,64±10,39		12,28±1,94	
2 MTON	6,09±2,32	p=0,93	63,69±7,76	p=0,93	27,44±8,10	p=0,87	36,85±10,30	p=0,88	40,78±9,68	p=0,94	15,45±4,56	0,56
3 MTO	8,87±2,51		60,12±9,37		29,18±11,20		27,50±8,43		44,23±11,87		16,96±4,52	
4 MTAR	5,31±2,17		62,40±6,32		30,35±7,77		27,13±8,52		50,26±8,44		16,71±4,25	
5 MTAN	10,19±5,64	p=0,89	61,00±7,08	p=0,86	26,02±7,51	p=0,78	28,89±8,46	p=0,93	50,06±12,28	p=0,73	10,88±1,25	p=0,62
6 MTA	4,04±1,22		70,07±4,00		23,79±3,86		32,41±9,90		37,70±9,55		20,19±7,15	
7 MFOR	3,44±1,16		65,56±10,53		28,64±11,27		34,30±9,59		43,11±10,8		13,78±3,99	
8 MFON	4,42±1,34	p=0,5	69,47±7,67	p=0,91	24,19±8,06	p=0,91	33,94±8,98	p=0,70	40,80±11,15	p=0,75	13,75±2,28	p=0,97
9 MFO	2,52±0,92		65,73±6,51		29,30±7,22		23,76±6,94		42,59±9,51		15,60±4,72	
10 MFAR	6,84±2,79		69,53±5,64		21,49±5,65		28,21±9,0		48,58±8,84		16,82±3,94	
11 MFAN	3,83±1,79	p=0,51	64,57±10,41	p=0,95	29,50±11,35	p=0,99	26,36±6,74	p=0,93	50,46±8,31	p=0,87	14,04±2,77	p=0,82
12 MFA	4,54±1,19		69,64±7,51		23,81±7,52		27,67±8,61		51,79±9,14		14,53±2,63	
13 MSOR	6,79±1,96		69,17±7,80		21,49±8,45		31,26±10,21		41,93±9,19		14,71±3,65	
14 MSON	6,52±1,94	p=0,99	65,81±7,91	p=0,96	24,89±9,0	p=0,88	30,47±8,71	p=0,97	38,89±8,40	p=0,80	21,47±3,91	p=0,19
15 MSO	6,81±2,29		66,81±7,04		23,58±7,77		29,31±8,54		42,54±8,01		14,03±4,53	
16 MSAR	4,60±1,91		69,11±5,02		23,73±5,06		35,31±8,92		32,16±6,70		10,69±2,96	
17 MSAN	5,35±1,79	p=0,69	71,23±3,24	p=0,69	21,18±2,96	p=0,99	29,83±8,87	p=0,91	43,24±7,03	p=0,62	16,73±2,41	p=0,37
18 MSA	8,58±4,96		60,43±7,92		29,03±8,21		35,05±8,22		34,71±7,93		14,85±3,55	

Los datos son expresados como media ±Error estándar. Prueba de contraste - Kruskal Wallis, considera diferencia significativa $p < 0,05$.

Anexo N°10. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en las muestras Buenas proveniente de fragmentos congelados con CF

MEDIOS-FRAG	BsDBA+		BwDBA+		BDBA-		BsMitosen+		BwMitosen+		B 7AAD+	
	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue
1 MTOR	12,33±5,55		66,66±4,71		8,68±2,37		53,77±2,55		22,23±6,38		8,68±2,37	
2 MTON	8,43±3,37	p=0,60	70,3±6,48	p=0,87	11,15±5,38	p=0,50	57,20±9,57	p=0,23	23,7±6,26	p=0,84	11,15±5,38	p=0,97
3 MTO	13,52±1,27		68,73±2,32		15,40±8,65		34,07±12,20		29,57±19,07		15,40±8,65	
4 MTAR	4,29±1,24		70,38±2,67		15,7±8,98		42,4±11,82		29,55±3,33		15,7±8,98	
5 MTAN	13,85±9,45	p=0,62	65,65±8,92	p=0,82	9,93±1,88	p=0,30	49,88±4,77	p=0,794	18,71±5,89	p=0,44	9,93±1,88	p=0,926
6 MTA	4,68±2,01		68,78±3,43		14,02±9,98		46,82±13,30		25,55±7,62		14,02±9,98	
7 MFOR	3,56±1,22		70,1±7,6		12,10±8,20		51,18±10,63		19,77±7,04		12,10±8,20	
8 MFOR	5,65±2,19	p=0,44	68,28±9,91	p=0,98	9,23±2,80	p=0,98	55,10±5,37	p=0,30	13,27±5,09	<0,05	9,23±2,80	p=0,93
9 MFO	2,27±1,01		68,75±7,39		12,08±5,77		40,45±5,70		35±2,86		12,10±5,77	
10 MFAR	5,83±3,69		73,35±8,85		7,67±1,65		48,18±9,51		30,35±9,88		7,70±1,65	
11 MFAN	4,60±2,71	p=0,70	76,83±5,33	p=0,98	10,21±3,87	p=0,99	40,55±5,26	p=0,99	31,45±6,97	p=0,55	10,21±3,87	p=0,87
12 MFA	5,55±1,85		73,88±5,45		11,4±4,70		47,28±8,40		28,6±3,77		11,40±4,70	
13 MSOR	7,25±2,83		76,18±6,32		7,87±5,28		51,93±13,54		20,5±4,03		7,87±5,28	
14 MSON	9,67±2,22	p=0,61	71,98±1,60	p=0,39	15,92±4,15	p=0,30	48,53±10,46	p=0,84	20,55±5,41	p=0,12	16,00±4,15	p=0,46
15 MSO	7,41±2,37		67,58±2,88		14,29±9,78		41,98±12,92		34,18±5,88		14,29±9,78	
16 MSAR	6,93±2,88		71,25±5,21		14,68±4,95		48,63±11,22		20,5±4,04		14,68±4,95	
17 MSAN	5,58±3,28	p=0,87	69,55±3,17	p=0,93	10,97±1,49	p=0,50	45,85±5,21	p=0,80	27,75±8,02	p=0,50	10,97±1,50	p=0,67
18 MSA	13,32±8,23		66,68±9,10		10,15±5,44		52,45±7,73		15,90±5,28		10,15±5,44	

Los datos son expresados como media ±Error estándar. Prueba de contraste - Kruskal Wallis, considera diferencia significativa p<0,05.

Anexo N°11. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en las muestras Malas de muestras congeladas en forma de fragmentos con CF

MEDIOS-FRAG	MsDBA+		MwDBA+		MDBA-		MsMitosen+		MwMitosen+		M7AAD+	
	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue
1 MTOR	2,55±2,12		59,53±11,68		35,47±12,86		10,16±5,83		73,05±5,70		15,88±1,82	
2 MTON	2,96±2,54	p=0,66	54,87±16,43	p=0,96	39,69±17,72	p=0,96	16,50±11,27	p=0,62	57,85±14,28	p=0,47	19,76±7,45	p=0,70
3 MTO	2,68±2,68		48,65±22,11		47,45±24,20		20,92±12,42		58,9±12,26		18,52±4,36	
4 MTAR	6,67±5,33		51,77±12,92		40,52±17,74		11,86±6,61		70,98±5,93		17,73±1,78	
5 MTAN	5,32±4,85	p=0,93	54,81±12,60	p=0,39	36,79±16,74	p=0,50	7,90±4,24	p=0,87	81,4±3,70	p=0,17	11,82±1,78	p=0,17
6 MTA	3,2±1,27		71,80±9,25		23,05±8,70		18,00±11,92		49,90±16,42		26,37±10,66	
7 MFOR	3,28±2,54		59,51±25,09		35,35±26,60		17,43±11,22		66,45±11,44		15,46±2,27	
8 MFON	2,79±0,86	p=0,97	71,07±14,62	p=0,96	25,14±15,50	p=1	12,78±6,99	p=0,98	68,33±6,97	p=0,93	18,28±1,67	p=0,62
9 MFO	2,85±1,96		61,70±13,15		34,03±14,40		7,08±2,53		50,18±19,37		19,10±7,91	
10 MFAR	8,18±5,08		64,43±6,56		25,26±10,81		8,24±4,68		66,8±6,78		25,98±3,72	
11 MFAN	2,80±2,62	p=0,50	48,23±21,63	p=0,73	48,10±23,87	p=0,90	12,17±7,09	p=0,90	69,48±5,75	p=0,54	17,88±3,34	p=0,22
12 MFA	3,18±1,19		64,0±17,55		30,50±16,73		8,07±4,38		74,98±4,13		17,65±1,92	
13 MSOR	2,55±2,13		59,83±16,43		31,01±18,76		10,60±4,31		63,35±8,47		21,55±1,76	
14 MSON	2,96±2,55	p=0,96	57,6±19,33	p=0,84	38,4±19,76	p=0,60	12,41±5,19	p=0,84	57,23±8,73	p=0,70	27,03±5,80	p<0,05
15 MSO	2,68±2,69		65,8±18,15		25,80±20,05		16,64±8,13		50,90±14,77		13,78±0,03	
16 MSAR	6,67±5,34		66,27±10,71		30,15±10,55		22,0±11,30		43,83±10,11		6,70±2,39	
17 MSAN	5,32±4,86	p=0,18	73,47±6,99	p=0,40	20,12±6,94	p=0,43	13,81±4,68	p=0,94	58,73±2,49	p=0,70	22,5±1,67	p<0,05
18 MSA	3,2±1,28		52,10±14,58		43,93±15,89		17,66±7,31		53,53±5,48		19,55±3,82	

Los datos son expresados como media ±Error estándar. Prueba de contraste - Kruskal Wallis, considera diferencia significativa p<0,05.

Anexo N° 12. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en las muestras totales de células aisladas evaluadas con CF

MEDIOS	TsDBA+		TwDBA+		TDBA-		TsMitosen+		Tw Mitosen+		T7AAD+	
	Media±EE	pvalue	Media±EE	pvalue	Media±EE	pvalue	Media±EE	pvalue	Media±EE	pvalue	Media±EE	pvalue
1 MTOR	6,06±1,46		49,63±5,48		39,87±5,39		36,27±10,24		37,98±9,97		9,73±3,80	
2 MTON	9,89±3,62	P=0,650	37,10±7,13	P=0,374	48,13±7,13	P=0,520	31,95±9,62	P=0,895	38,75±9,88	P=0,96	12,15±5,10	P=0,685
3 MTO	5,51±1,58		38,71±6,42		50,94±6,76		32,25±7,56		38,5±5,37		13,42±4,91	
4 MTAR	3,79±1,11		48,47±4,13		43,99±4,95		42,13±10,46		33,48±6,74		12,44±5,20	
5 MTAN	5,87±1,70	P=0,483	58,47±5,84	P=0,377	32,05±5,86	P=0,473	31,21±10,00	P=0,676	36,53±8,78	P=0,717	15,81±5,93	P=0,977
6 MTA	6,48±1,68		48,20±4,60		40,45±5,53		37,36±9,39		40,10±7,91		11,25±4,39	
7 MFOR	6,45±2,58		38,57±6,92		48,21±6,75		44,14±12,73		34,15±10,97		8,71±3,12	
8 MFON	3,86±1,16	P=0,675	48,30±4,30	P=0,237	44,41±4,60	P=0,573	40,52±10,32	P=0,567	27,71±6,78	P=0,960	12,44±4,40	P=0,726
9 MFO	6,13±2,05		53,77±4,55		36,82±5,06		32,84±10,84		33,7±9,82		11,10±3,35	
10 MFAR	8,94±2,54		58,47±4,16		29,15±3,61		42,32±10,70		29,87±7,21		10,96±3,23	
11 MFAN	8,49±2,83	P=0,523	60,19±3,60	P=0,482	27,69±4,92	P=0,435	37,22±8,73	P=0,738	44,27±8,40	P=0,229	14,03±4,94	P=0,805
12 MFA	6,36±2,44		55,12±3,49		35,07±4,89		42,25±11,95		31,93±7,36		14,84±4,81	
13 MSOR	5,45±2,15		49,82±3,91		39,90±4,79		36,10±9,57		37,78±8,87		16,70±7,05	
14 MSON	4,47±1,41	P=0,797	44,21±7,79	P=0,906	45,76±7,60	P=0,914	53,92±10,25	P=0,581	34,79±8,90	P=0,927	8,29±3,38	P=0,614
15 MSO	3,78±1,17		48,97±6,29		43,04±6,26		44,57±9,37		36,75±4,71		12,23±4,00	
16 MSAR	3,95±1,63		49,03±2,12		41,99±1,95		42,37±7,45		39,67±8,98		11,90±4,05	
17 MSAN	6,08±2,32	P=0,862	46,58±7,41	P=0,973	44,01±8,84	P=0,856	43,03±10,00	P=0,810	30,77±7,20	P=0,854	12,56±5,40	P=0,994
18 MSA	4,95±1,40		50,69±1,95		40,39±2,57		39,20±4,27		40,45±9,53		12,66±4,19	

Los datos son expresados como media ±Error estándar. Prueba de Contraste - Kruskal Wallis, considera diferencia significativa $p < 0,05$.

Anexo N°13. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en muestras buenas en células aisladas mediante CF

MEDIOS	BsDBA+		BwDBA+		BDBA-		BsMitosen+		BwMitosen+		B7AAD+	
	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue
1 MTOR	4,50±1,53		50,02±7,86		40,35±6,99		51,58±5,11		23,46±5,44		5,12±1,74	
2 MTON	5,95±2,62	p=0,981	34,50±7,57	p=0,33	53,97±9,95	p=0,55	46,90±2,73	p=0,62	25,58±4,88	p=0,584	6,71±2,29	p=0,61
3 MTO	5,07±1,87		40,92±6,20		47,42±3,28		43,58±2,95		31,65±4,28		8,10±2,41	
4 MTAR	1,99±0,94		44,40±0,78		47,87±2,14		57,42±5,65		23,28±2,62		6,06±3,37	
5 MTAN	2,48±1,23	p=0,58	51,55±10,41	p=0,58	41,05±2,14	p=0,94	45,50±6,70	p=0,43	28,18±5,67	p=0,67	11,51±6,64	p=0,98
6 MTA	5,18±3,02		40,75±3,42		47,27±6,30		50,72±6,04		29,28±6,17		6,46±3,63	
7 MFOR	0,82±0,32		33,80±4,96		62,65±7,64		62,93±6,88		17,98±5,88		4,93±1,91	
8 MFON	2,67±1,30	p=0,25	44,42±5,63	p=0,05	48,03±6,66	p=0,63	54,20±7,44	p=0,29	23,47±8,66	p=0,73	8,64±3,01	p=0,51
9 MFO	2,78±0,63		53,50±1,71		38,72±1,66		46,85±9,76		19,15±3,48		7,10±1,98	
10 MFAR	5,30±2,61		54,65±2,28		34,65±4,60		58,55±3,39		18,65±1,02		6,86±2,18	
11 MFAN	4,39±2,86	p=0,33	54,12±4,36	p=0,98	36,17±3,75	p=0,93	50,62±3,27	p=0,39	39,90±12,27	p=0,7	8,32±3,47	p=0,76
12 MFA	1,89±0,62		54,95±4,36		38,25±4,38		59,67±6,71		24,68±6,03		9,68±2,96	
13 MSOR	2,94±1,37		42,62±4,52		48,10±3,32		50,20±4,92		31,20±10,77		10,73±5,05	
14 MSON	2,73±2,02	p=0,33	39,05±13,56	p=0,87	51,45±13,80	p=0,93	63,68±8,90	p=0,74	32,46±12,05	p=0,74	5,18±2,13	p=0,65
15 MSO	1,09±0,84		41,17±6,94		52,02±6,07		53,00±11,65		33,23±6,57		10,03±3,70	
16 MSAR	1,84±0,74		46,73±3,38		44,57±2,20		53,32±1,91		34,48±13,22		7,54±3,04	
17 MSAN	1,64±1,20	p=0,74	41,03±12,47	p=0,97	52,77±12,76	p=0,78	56,13±8,86	p=0,28	22,28±3,31	p=0,87	7,65±3,47	p=0,93
18 MSA	3,60±2,00		48,77±1,55		41,58±2,99		44,75±3,53		38,38±14,80		10,65±5,03	

Los datos son expresados como media ±Error estándar. Prueba de Contraste - Kruskal Wallis, considera diferencia significativa p<0,05.

Anexo N°14. Determinación del porcentaje de SSC y potencial de membrana mitocondrial postdescongelamiento en muestras Malas de células aisladas con CF

	MsDBA+		MwDBA+		MDBA-		MsMitosense+		MwMitosense+		M 7AAD+	
MEDIOS	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue	Media ± EE	pvalue
1 MTOR	5,79±5,42		46,85±1,75		43,85±8,75		5,65±2,99		67,01±7,01		18,95±8,45	
2 MTON	21,9±11,40	p=0,65	43,18±32,02	p=0,86	28,7±17,90	p=0,65	2,05±1,51	p=0,276	65,1±16,8	p=0,37	23,04±13,36	p=0,65
3 MTO	6,8±6,8		29,62±20,49		61,1±28,30		9,6±5,90		52,2±6,40		24,05±12,55	
4 MTAR	4,16±3,07		44,85±15,55		48,2±19,60		11,54±6,77		53,9±3,80		25,2±9,70	
5 MTAN	7,62±2,89	p=0,27	66,35±7,35	p=0,56	21,45±8,25	p=0,37	2,62±2,46	p=0,65	53,25±23,35	p=0,56	24,45±12,36	0,87
6 MTA	10,44±0,67		60,9±3,00		25,1±2,20		10,62±5,69		61,65±3,55		20,85±8,55	
7 MFOR	9,66±4,84		30,65±26,85		39,3±3,80		6,58±5,52		66,5±5,60		16,25±6,25	
8 MTON	5,10±3,08	p=0,16	59,45±11,45	p=0,65	32,3±7,80	p=0,56	13,15±11,85	p=0,56	36,2±11,20	p=0,18	20,06±12,25	p=0,87
9 MFO	15,35±0,65		60,65±15,15		22,44±14,16		4,81±3,79		62,8±10,10		19,10±7,0	
10 MFAR	13,84±8,76		62,65±19,75		21,35±10,35		9,86±8,25		52,3±4,40		19,15±5,25	
11 MFAN	12,45±7,26	p=1	64,8±0,80	p=1	19,6±8,40	p=1	10,41±1,29	p=0,87	53,0±6,10	p=1	25,45±9,95	p=0,87
12 MFA	16,8±0,40		60,9±12,40		19,8±13,0		7,40±7,11		46,45±16,65		25,15±11,65	
13 MSOR	10,30±8,61		57,35±4,45		30,35±13,75		7,90±6,11		50,95±15,05		28,65±19,45	
14 MSON	3,36±1,52	p=0,87	53,00±10,60	p=0,65	39,15±7,15	p=0,56	34,40±23	p=0,37	39,45±16,95	p=0,87	14,51±9,29	p=0,57
15 MSO	5,51±1,69		66,75±12,25		23,9±9,90		27,7±8,70		43,8±0,10		16,65±11,35	
16 MSAR	4,23±3,54		52,05±0,85		40,5±2,80		20,45±9,45		50,05±0,45		20,60±8,8	
17 MSAN	14,75±4,25	p=0,18	67,45±3,35	p=0,18	14,86±8,25	p=0,18	16,85±0,65	p=0,37	47,75±16,65	p=0,57	22,38±14,82	p=0,65
18 MSA	2,96±0		52,5±0,20		41,40±1,20		28,1±3,70		44,6±4,90		16,70±9,41	

Los datos son expresados como media ±Error estándar. Contraste de Hipótesis - Kruskal Wallis, considera diferencia significativa p<0,05.

Anexo 15. Comparacion del porcentaje de sDBA+, wDBA+, DBA-, SMitosense+, Mitopsense+, AAD, en muestras totales congeladas en forma aislada (Cell) y en fragmentas (Frag) evaluadas mediante CF

MEDIOS	Media ± Error Estandar											
	TsDBA+(cell)	TsDBA+(Frag)	TwDBA+(cell)	TwDBA+(Frag)	TDBA-(Cell)	TDBA-(Frag)	TsMitosense+(cell)	TsMitosense+(Frag)	TwMitosense+(cell)	TwMitosense+(Frag)	T7AAD+(cell)	T7AAD+(Frag)
1 MTOR	6,06±1,46	8,13±3,85	49,63±5,48	63,8±5,28	39,87±5,39	25,37±7,04	38,27±10,24	32,00±8,75	49,63±5,47	47,64±10,39	18,95±8,45	12,28±1,94
2 MTON	9,89±3,62	6,09±2,32	37,10±7,13 ^a	63,69±7,76 ^b	48,13±7,13	27,44±8,10	31,95±9,62	36,85±10,30	37,11±7,12	40,78±9,68	23,04±13,36	15,45±4,56
3 MTO	5,51±1,58	8,87±2,51	38,71±6,42 ^a	60,12±9,37 ^b	50,94±8,78 ^a	29,18±11,20 ^b	32,25±7,56	27,50±8,43	38,72±6,42	44,23±11,87	24,05±12,55	16,96±4,52
4 MTAR	3,79±1,11	5,31±2,17	48,47±4,13 ^a	62,40±8,32 ^b	43,99±4,95	30,35±7,77	42,13±10,46	27,13±9,52	48,47±4,13	50,26±8,44	25,20±9,70	16,71±4,25
5 MTAN	5,87±1,70	10,19±5,84	58,47±5,84	61,00±7,08	32,05±5,86	26,02±7,51	31,21±10,00	28,89±8,46	58,47±5,83	50,06±12,28	24,44±12,36	10,88±1,25
6 MTA	6,48±1,68	4,04±1,22	48,20±4,60	70,07±4,00	40,45±5,53	23,79±3,86	37,36±9,39	32,41±9,90	48,20±4,60	37,70±9,55	20,85±8,55	20,19±7,15
7 MFOR	6,45±2,58	3,44±1,16	38,57±6,92 ^a	65,56±10,53 ^b	48,21±6,75	28,84±11,27	44,14±12,73	34,30±9,59	38,57±6,92	43,11±10,8	16,25±6,25	13,78±3,99
8 MFON	3,86±1,16	4,42±1,34	48,30±4,30 ^a	69,47±7,67 ^b	44,41±4,60	24,19±9,06	40,52±10,32	33,94±9,98	48,30±4,30	40,80±11,15	20,06±12,25	13,75±2,28
9 MFO	6,13±2,05	2,52±0,92	53,77±4,55	65,73±6,51	36,82±5,06	29,30±7,22	32,84±10,84	23,76±9,94	53,77±4,55	42,59±9,51	19,10±7,00	15,60±4,72
10 MFAR	8,94±2,54	6,84±2,79	58,47±4,16	69,53±5,84	29,15±3,61	21,49±5,65	42,32±10,70	28,21±9,0	58,47±4,16	48,58±8,84	19,15±5,25	16,82±3,94
11 MFAN	8,48±2,83	3,83±1,79	60,19±3,60	64,57±10,41	27,69±4,92	29,50±11,35	37,22±9,73	26,36±8,74	60,19±3,60	50,46±8,31	25,45±9,95	14,04±2,77
12 MFA	6,36±2,44	4,54±1,19	55,12±3,49 ^a	69,84±7,51 ^b	35,07±4,89	23,81±7,52	42,25±11,95	27,87±9,61	55,12±3,49	51,79±9,14	25,15±11,85	14,53±2,83
13 MSOR	5,45±2,15	6,79±1,96	49,82±3,91 ^a	69,17±7,80 ^b	39,90±4,79 ^a	21,49±8,45 ^b	36,10±9,57	31,26±10,21	49,82±3,90	41,93±9,19	28,85±19,45	14,71±3,85
14 MSON	4,47±1,41	6,52±1,94	44,21±7,79	65,81±7,91	45,76±7,60	24,89±9,0	53,92±10,25	30,47±8,71	44,21±7,80	38,89±8,40	14,51±9,29	21,47±3,91
15 MSO	3,78±1,17	6,81±2,29	48,97±6,29	66,81±7,04	43,04±6,26 ^a	23,58±7,77 ^b	44,57±9,37	29,31±8,54	48,97±6,29	42,54±8,01	16,85±11,35	14,03±4,53
16 MSAR	3,95±1,63	4,60±1,91	49,03±2,12	69,11±5,02	41,99±1,95 ^a	23,73±5,06 ^b	42,37±7,45	35,31±8,92	49,03±2,11	32,16±6,70	20,80±8,80	10,69±2,96
17 MSAN	6,08±2,32	5,35±1,79	46,58±7,41 ^a	71,23±3,24 ^b	44,01±8,84 ^a	21,18±2,96 ^b	43,03±10,00	29,83±8,87	46,58±7,40	43,24±7,03	22,38±14,82	16,73±2,41
18 MSA	4,95±1,40	8,58±4,96	50,69±1,95	60,43±7,92	40,39±2,57 ^a	29,03±8,21 ^b	39,20±4,27	35,05±8,22	50,69±1,95	34,71±7,93	16,89±9,41	14,85±3,55

Los datos son expresados como media ±Error estándar. Prueba de contraste –U de Mann Whitney Diferencia significativa p<0,05.

Anexo N°16. Comparación de la Media $\pm$ EE en muestras Buenas de sDBA+, wDBA+, DBA-, sMitosense+, wMitosense+, 7AAD+ en las células aisladas (cell) y células proveniente de fragmentos (Frag) postdescongelamiento evaluadas con CF

BsDBA+ (cell): SSC en muestras Buenas congeladas en forma aislada.

BsDBA+ (Frag): SSC en muestras Buenas congeladas en forma de fragmentos.

BwDBA+: SSC en diferenciación temprana congelada en células aisladas (Cell) o (Frag) congelados en forma de Fragmentos.

BDBA-(Cell): Células diferenciadas DBA- proveniente de muestras congeladas en forma aislada (cell) o en forma de fragmentos descongelados (Frag).

BsMitosense+: Con alto potencial mitocondrial proveniente de células (Cell) ó de Fragmentos (Frag).

BwMitosense+: Apoptosis temprana en células aisladas (cell) o en fragmentos descongelados (Frag).

B7AAD+: Apoptosis en muestras de células descongeladas (Cell) o proveniente de Fragmentos (Frag). a y b significa diferencias significativas $p < 0,05$.

Los datos son expresados como media $\pm$ Error estándar. Prueba de Contraste -U de Mann Whitney Diferencia significativa $p < 0,05$.

MEDIOS	Media $\pm$ Error Estándar									
	BsDBA+(Cell)	BsDBA+(Frag)	BwDBA+(Cell)	BwDBA+(Frag)	BDBA-(Cell)	BDBA-(Frag)	BsMitosense+(Cell)	BsMitosense+(Frag)	BwMitosense+(Cell)	BwMitosense+(Frag)
1 MTOR	4,50 $\pm$ 1,53	12,33 $\pm$ 5,55	50,02 $\pm$ 7,86	66,85 $\pm$ 4,71	40,35 $\pm$ 6,99	8,68 $\pm$ 2,37	51,58 $\pm$ 5,11	53,77 $\pm$ 42,55	23,46 $\pm$ 5,44	22,23 $\pm$ 6,38
2 MTON	5,95 $\pm$ 2,62	8,43 $\pm$ 3,37	34,50 $\pm$ 7,57 ^a	70,3 $\pm$ 6,48 ^b	53,97 $\pm$ 9,95 ^a	11,15 $\pm$ 5,38 ^b	46,90 $\pm$ 7,73	57,20 $\pm$ 49,57	25,58 $\pm$ 4,88	23,7 $\pm$ 6,25
3 MTO	5,07 $\pm$ 1,87 ^a	13,52 $\pm$ 1,27 ^b	40,92 $\pm$ 6,20 ^a	68,73 $\pm$ 2,32 ^b	47,42 $\pm$ 3,28 ^a	15,40 $\pm$ 8,65 ^b	43,58 $\pm$ 2,95	34,07 $\pm$ 42,20	31,65 $\pm$ 4,28	29,57 $\pm$ 19,07
4 MTAR	1,99 $\pm$ 0,94	4,29 $\pm$ 1,24	44,40 $\pm$ 0,78 ^a	70,38 $\pm$ 2,67 ^b	47,87 $\pm$ 2,14 ^a	15,7 $\pm$ 8,98 ^b	57,42 $\pm$ 5,65	42,4 $\pm$ 11,82	23,28 $\pm$ 2,62	29,55 $\pm$ 3,33
5 MTAN	2,48 $\pm$ 1,23	13,85 $\pm$ 9,45	51,55 $\pm$ 10,41	65,85 $\pm$ 8,92	41,05 $\pm$ 2,14	9,93 $\pm$ 1,88	45,50 $\pm$ 5,70	49,88 $\pm$ 4,77	28,18 $\pm$ 5,67	18,7 $\pm$ 5,89
6 MTA	5,18 $\pm$ 3,02	4,68 $\pm$ 2,01	40,75 $\pm$ 3,42 ^a	68,78 $\pm$ 3,43 ^b	47,27 $\pm$ 6,30	14,02 $\pm$ 9,98	50,72 $\pm$ 5,04	46,82 $\pm$ 13,30	29,28 $\pm$ 6,17	25,55 $\pm$ 7,62
7 MFOR	0,82 $\pm$ 0,32	3,56 $\pm$ 1,22	33,80 $\pm$ 4,96 ^a	70,1 $\pm$ 7,6 ^b	62,55 $\pm$ 7,64 ^a	12,10 $\pm$ 9,20 ^b	62,93 $\pm$ 5,88	51,18 $\pm$ 10,63	17,98 $\pm$ 5,88	19,77 $\pm$ 7,04
8 MFON	2,67 $\pm$ 1,30	5,65 $\pm$ 2,19	44,42 $\pm$ 5,63 ^a	68,28 $\pm$ 9,91 ^b	48,03 $\pm$ 6,66	9,23 $\pm$ 2,80	54,20 $\pm$ 7,44	55,10 $\pm$ 5,37	23,47 $\pm$ 8,66	13,27 $\pm$ 5,09
9 MFO	2,79 $\pm$ 0,63	2,27 $\pm$ 1,01	53,50 $\pm$ 1,71	68,75 $\pm$ 7,39	38,72 $\pm$ 1,66	12,08 $\pm$ 5,77	46,85 $\pm$ 9,76	40,45 $\pm$ 5,70	19,15 $\pm$ 3,48 a	35 $\pm$ 2,86 b
10 MFAR	5,30 $\pm$ 2,61	5,83 $\pm$ 3,69	54,65 $\pm$ 2,28 ^a	73,35 $\pm$ 8,85 ^b	34,85 $\pm$ 4,60 ^a	7,67 $\pm$ 1,65 ^b	58,55 $\pm$ 3,39	48,18 $\pm$ 9,51	18,65 $\pm$ 1,02	30,35 $\pm$ 9,88
11 MFAN	4,39 $\pm$ 2,86	4,60 $\pm$ 2,71	54,12 $\pm$ 4,36 ^a	76,83 $\pm$ 5,33 ^b	36,73 $\pm$ 3,76 ^a	10,21 $\pm$ 3,87 ^b	50,62 $\pm$ 3,27	40,55 $\pm$ 5,26	39,90 $\pm$ 12,27	31,45 $\pm$ 6,97
12 MFA	1,89 $\pm$ 0,62 ^a	5,55 $\pm$ 1,85 ^b	54,95 $\pm$ 4,36 ^a	73,88 $\pm$ 5,45 ^b	38,35 $\pm$ 4,38	11,44 $\pm$ 7,0	59,67 $\pm$ 7,71	47,28 $\pm$ 8,40	24,68 $\pm$ 6,03	28,6 $\pm$ 3,77
13 MSOR	2,94 $\pm$ 1,37	7,25 $\pm$ 2,83	42,62 $\pm$ 4,52 ^a	76,18 $\pm$ 6,32 ^b	48,10 $\pm$ 3,32 ^a	7,87 $\pm$ 5,28 ^b	50,20 $\pm$ 4,92	51,93 $\pm$ 13,54	31,20 $\pm$ 10,77	20,5 $\pm$ 4,03
14 MSON	2,73 $\pm$ 2,02 ^a	9,67 $\pm$ 2,22 ^b	39,05 $\pm$ 13,56 ^a	71,98 $\pm$ 1,60 ^b	51,45 $\pm$ 13,80 ^a	15,92 $\pm$ 4,15 ^b	63,68 $\pm$ 9,90	48,53 $\pm$ 10,46	32,46 $\pm$ 12,05	20,55 $\pm$ 5,41
15 MSO	1,09 $\pm$ 0,84 ^a	7,41 $\pm$ 2,37 ^b	41,17 $\pm$ 6,94 ^a	67,58 $\pm$ 2,88 ^b	52,02 $\pm$ 6,07 ^a	14,29 $\pm$ 7,78 ^b	53,00 $\pm$ 11,65	41,98 $\pm$ 12,92	33,23 $\pm$ 6,57	34,18 $\pm$ 5,88
16 MSAR	1,84 $\pm$ 0,74	6,93 $\pm$ 2,88	46,73 $\pm$ 3,38 ^a	71,25 $\pm$ 5,21 ^b	44,57 $\pm$ 2,20 ^a	14,66 $\pm$ 4,95 ^b	53,32 $\pm$ 1,91	48,63 $\pm$ 11,22	34,48 $\pm$ 13,22	20,5 $\pm$ 4,04
17 MSAN	1,64 $\pm$ 1,20	5,58 $\pm$ 3,28	41,03 $\pm$ 12,47 ^a	69,55 $\pm$ 3,17 ^b	52,77 $\pm$ 12,76 ^a	10,97 $\pm$ 1,49 ^b	56,13 $\pm$ 8,86	45,85 $\pm$ 5,21	22,28 $\pm$ 3,31	27,75 $\pm$ 8,02
18 MSA	3,60 $\pm$ 2,00	13,32 $\pm$ 8,23	48,77 $\pm$ 1,55	66,88 $\pm$ 9,10	41,58 $\pm$ 2,99 a	10,15 $\pm$ 5,44b	44,75 $\pm$ 3,53	52,45 $\pm$ 7,73	38,38 $\pm$ 14,80	15,90 $\pm$ 5,28

Anexo N°17. Comparación de la Media $\pm$ EE en muestras Malas de sDBA+, wDBA+, DBA-, sMitosen+, wMitosen+, 7AAD+ en las células aisladas (cell) y células proveniente de fragmentos (Frag) postdescongelamiento evaluadas mediante CF

MsDBA+ (cell): SSC en muestras Malas congeladas en forma aislada.

MsDBA+ (Frag): SSC en muestras Malas congeladas en forma de fragmentos.

MwDBA+: SSC en diferenciación temprana congelada en células aisladas (Cell) o (Frag) congelados en forma de Fragmentos.

MDBA-(Cell): Células diferenciadas DBA- proveniente de muestras congeladas en forma aislada (cell) o en forma de fragmentos descongelados (Frag).

MsMitosen+: Con alto potencial mitocondrial proveniente de células (Cell) ó de Fragmentos (Frag).

MwMitosen+: Apoptosis temprana en células aisladas (cell) o en fragmentos descongelados (Frag).

M7AAD+: Apoptosis en muestras de células descongeladas (Cell) o proveniente de Fragmentos (Frag). a y b significa diferencias significativas $p < 0,05$.

Los datos son expresados como media $\pm$ Error estándar. Prueba de Contraste –U de Mann Whitney Diferencia significativa $p < 0,05$

MEDIOS	Media $\pm$ Error Estándar											
	MsDBA+(Cell)	MsDBA+(Frag)	MwDBA+(Cell)	MwDBA+(Frag)	MDBA-(Cell)	MDBA-(Frag)	MsMitosen+(Cell)	MsMitosen+(Frag)	MwMitosen+(Cell)	MwMitosen+(Frag)	M 7AAD+(Cell)	M 7AAD+(Frag)
1 MTOR	5,79 $\pm$ 5,42	2,56 $\pm$ 2,12	46,65 $\pm$ 1,75	59,53 $\pm$ 11,68	43,85 $\pm$ 8,75	35,47 $\pm$ 12,86	5,65 $\pm$ 2,99	10,16 $\pm$ 5,83	67,01 $\pm$ 7,01	73,05 $\pm$ 5,70	18,95 $\pm$ 8,45	15,88 $\pm$ 1,82
2 MTOR	21,9 $\pm$ 11,40	2,96 $\pm$ 2,54	43,18 $\pm$ 32,02	54,87 $\pm$ 16,43	28,7 $\pm$ 17,90	39,69 $\pm$ 17,72	2,05 $\pm$ 1,51	16,50 $\pm$ 11,27	65,1 $\pm$ 16,8	57,85 $\pm$ 14,28	23,04 $\pm$ 13,36	19,76 $\pm$ 7,45
3 MTO	6,8 $\pm$ 6,8	2,68 $\pm$ 2,68	29,62 $\pm$ 20,49	48,65 $\pm$ 22,11	61,1 $\pm$ 28,30	47,45 $\pm$ 24,20	9,6 $\pm$ 5,90	20,92 $\pm$ 12,42	52,2 $\pm$ 6,40	58,9 $\pm$ 12,26	24,05 $\pm$ 12,55	18,52 $\pm$ 4,36
4 MTAR	4,16 $\pm$ 3,07	6,67 $\pm$ 5,33	44,85 $\pm$ 15,55	51,77 $\pm$ 12,92	48,2 $\pm$ 19,60	40,52 $\pm$ 17,74	11,54 $\pm$ 6,77	11,86 $\pm$ 6,61	53,9 $\pm$ 3,80	70,98 $\pm$ 5,93	25,2 $\pm$ 9,70	17,73 $\pm$ 1,78
5 MTAN	7,62 $\pm$ 2,89	5,32 $\pm$ 4,85	66,35 $\pm$ 7,35	54,81 $\pm$ 12,60	21,45 $\pm$ 8,25	36,79 $\pm$ 16,74	2,62 $\pm$ 2,46	7,90 $\pm$ 4,24	53,25 $\pm$ 23,35	81,4 $\pm$ 3,70	24,45 $\pm$ 12,36	11,82 $\pm$ 1,78
6 MTA	10,44 $\pm$ 0,67	3,2 $\pm$ 1,27	60,9 $\pm$ 3,00	71,80 $\pm$ 9,25	25,1 $\pm$ 2,20	23,05 $\pm$ 8,70	10,62 $\pm$ 5,69	18,00 $\pm$ 11,92	61,65 $\pm$ 3,55	49,90 $\pm$ 16,42	20,85 $\pm$ 8,55	26,37 $\pm$ 10,66
7 MFOR	9,66 $\pm$ 4,84	3,28 $\pm$ 2,54	30,65 $\pm$ 26,85	59,51 $\pm$ 25,09	39,3 $\pm$ 3,80	35,35 $\pm$ 26,60	6,58 $\pm$ 5,52	17,43 $\pm$ 11,22	66,5 $\pm$ 5,60	66,45 $\pm$ 11,44	16,25 $\pm$ 6,25	15,46 $\pm$ 2,27
8 MFOR	5,10 $\pm$ 3,08	2,79 $\pm$ 0,86	59,45 $\pm$ 11,45	71,07 $\pm$ 14,62	32,3 $\pm$ 7,80	25,14 $\pm$ 15,50	13,15 $\pm$ 11,85	12,78 $\pm$ 6,99	36,2 $\pm$ 11,20	68,33 $\pm$ 6,97	20,06 $\pm$ 12,25	18,28 $\pm$ 1,67
9 MFO	15,35 $\pm$ 0,65	2,85 $\pm$ 1,96	60,65 $\pm$ 15,15	61,70 $\pm$ 13,15	22,44 $\pm$ 14,16	34,03 $\pm$ 14,40	4,81 $\pm$ 3,79	7,08 $\pm$ 2,53	62,8 $\pm$ 10,10	50,18 $\pm$ 19,37	19,10 $\pm$ 7,0	19,10 $\pm$ 7,91
10 MFAR	13,84 $\pm$ 8,76	8,18 $\pm$ 5,08	62,65 $\pm$ 19,75	64,43 $\pm$ 6,56	21,35 $\pm$ 10,35	25,26 $\pm$ 10,81	9,86 $\pm$ 8,25	8,24 $\pm$ 4,68	52,3 $\pm$ 4,40	66,8 $\pm$ 6,78	19,15 $\pm$ 5,25	25,98 $\pm$ 3,72
11 MFAN	12,45 $\pm$ 7,26	2,80 $\pm$ 2,62	64,8 $\pm$ 0,80	48,23 $\pm$ 21,63	19,6 $\pm$ 8,40	48,10 $\pm$ 23,87	10,41 $\pm$ 1,29	12,17 $\pm$ 7,09	53,0 $\pm$ 6,10	69,48 $\pm$ 5,75	25,45 $\pm$ 9,95	17,88 $\pm$ 3,34
12 MFA	16,8 $\pm$ 0,40	3,18 $\pm$ 1,19	60,9 $\pm$ 12,40	64,0 $\pm$ 17,55	19,8 $\pm$ 13,0	30,50 $\pm$ 16,73	7,40 $\pm$ 1,11	8,07 $\pm$ 4,38	46,45 $\pm$ 16,65	74,98 $\pm$ 4,13	25,15 $\pm$ 11,65	17,65 $\pm$ 1,92
13 MSOR	10,30 $\pm$ 8,61	2,55 $\pm$ 2,13	57,35 $\pm$ 4,45	59,83 $\pm$ 16,43	30,35 $\pm$ 13,75	31,01 $\pm$ 18,76	7,90 $\pm$ 6,11	10,60 $\pm$ 4,31	50,95 $\pm$ 15,05	63,35 $\pm$ 8,47	28,65 $\pm$ 19,45	21,55 $\pm$ 1,76
14 MSON	3,36 $\pm$ 1,52	2,96 $\pm$ 2,55	53,00 $\pm$ 10,60	57,6 $\pm$ 19,33	39,15 $\pm$ 7,15	38,4 $\pm$ 19,76	34,40 $\pm$ 2,3	12,41 $\pm$ 5,19	39,45 $\pm$ 16,95	57,23 $\pm$ 8,73	14,51 $\pm$ 9,29	27,03 $\pm$ 5,80
15 MSO	5,51 $\pm$ 1,69	2,68 $\pm$ 2,69	66,75 $\pm$ 12,25	65,8 $\pm$ 18,15	23,9 $\pm$ 9,90	25,80 $\pm$ 20,05	27,7 $\pm$ 8,70	16,64 $\pm$ 8,13	43,8 $\pm$ 0,10	50,90 $\pm$ 14,77	16,65 $\pm$ 11,35	13,78 $\pm$ 0,03
16 MSAR	4,23 $\pm$ 3,54	6,67 $\pm$ 5,34	52,05 $\pm$ 0,85	66,27 $\pm$ 10,71	40,5 $\pm$ 2,80	30,15 $\pm$ 10,55	20,45 $\pm$ 9,45	22,0 $\pm$ 11,30	50,05 $\pm$ 0,45	43,83 $\pm$ 10,11	20,60 $\pm$ 8,8	6,70 $\pm$ 2,39
17 MSAN	14,75 $\pm$ 4,25	5,32 $\pm$ 4,86	67,45 $\pm$ 3,35	73,47 $\pm$ 6,99	14,86 $\pm$ 8,25	20,12 $\pm$ 6,94	16,85 $\pm$ 0,65	13,81 $\pm$ 4,68	47,75 $\pm$ 16,65	58,73 $\pm$ 2,49	22,38 $\pm$ 14,82	22,5 $\pm$ 1,67
18 MSA	2,96 $\pm$ 0	3,2 $\pm$ 1,28	52,5 $\pm$ 0,20	52,10 $\pm$ 14,58	41,40 $\pm$ 1,20	43,93 $\pm$ 15,89	28,1 $\pm$ 3,70	17,66 $\pm$ 7,31	44,6 $\pm$ 4,90	53,53 $\pm$ 5,48	16,70 $\pm$ 9,41	19,55 $\pm$ 3,82

Anexo N°18. Composición de la Maca Juvens Negra y Roja. (178)



MACA NEGRA BLACK MACA		
INFORMACIÓN NUTRICIONAL-NUTRITION FACT		
Serving size: 1 sachet (3gr) Porción: 1 sachet (3gr)		
Serving per container: 30 sachets (90 gr) Porción por caja: 30 sachets (90 gr)		
Amount per Serving	Cantidad por Sachet (por 100 gr)	
Calories 10	Calorias 10 (333)	Calories from fat 0.1
		% Daily Value*Value Diario*
Total Fat 0.01g	Grasa Total 0.01 g (0.33 g)	0.02%
Saturated Fat <0.003g	Grasa Saturada <0.003g (<1 g)	<0.02%
Trans Fat <0.003g	Grasa Trans <0.003g (<1 g)	<0.02%
Cholesterol 0g	Coolesterol 0g	0%
Sodium 5-11 mg	Sodio 5-11 mg (169-365 mg)	0.02-0.5%
Potassium 45-54 mg	Potasio 45-54 mg (150-180 mg)	1.3-1.5%
Total Carbohydrate 2 g	Carbohidratos Totales 2 g (66.7 g)	0.7%
Dietary Fiber 0.01-0.05 g	Fibra 0.01-0.05 g (0.33-1.66 g)	0.04-0.2%
Protein 0.3-0.4 g	Proteína 0.3-0.4 g (10-13.3 g)	0.6-0.8%
Vitamin C	Vitamina C	11-15%
Calcium	Calcio	0.2%
Iron	Hierro	0.5-1.0%
Percent Daily Values are Based on a 2,000 calorie diet. Los valores porcentuales diarios están dados en una dieta de 2,000 calorías		
No es un medicamento. El consumo de este producto es responsabilidad de quien lo recomienda y de quien lo usa.		
It is not medicine. The consumption of this product is the exclusive responsibility of the user and who recommends it		

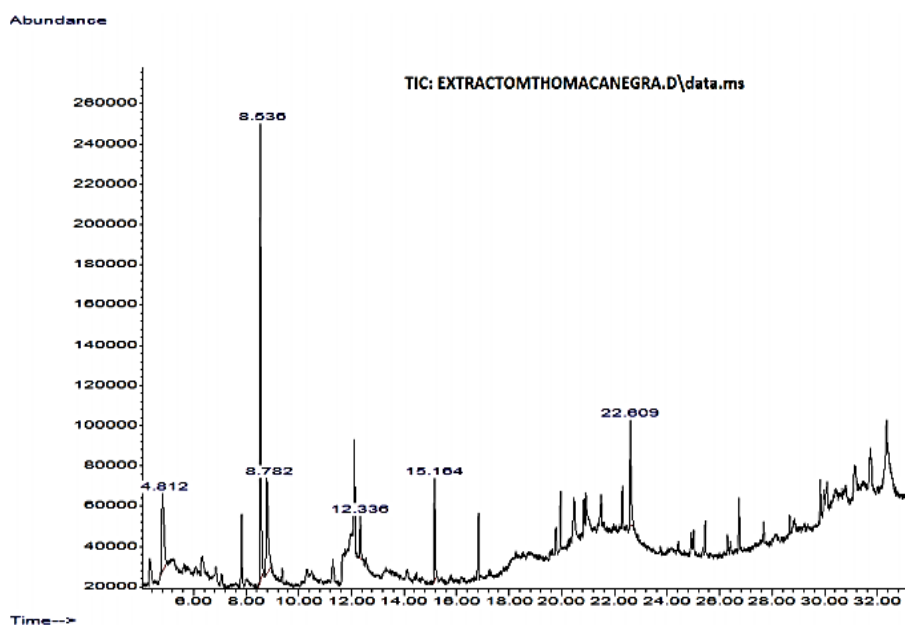
MACA ROJA RED MACA		
INFORMACIÓN NUTRICIONAL - NUTRITION FACT		
Serving Size: 1 sachet (3 gr) Porción: 1 sachet (3 gr)		
Serving Per Container: 30 sachets (90 gr) Porción por caja: 30 sachets (90 gr)		
Amount Per Serving	Cantidad por Sachet	
Calories 10	Calorias 10	Calories from fat 0.1
		%Daily value*Valor Diario*
Total Fat 0.01 g	Grasa Total 0.01g	0.02%
Saturated Fat <0.003 g	Grasa Saturada <0.003g	<0.02%
Trans Fat <0.003 g	Grasa Trans <0.003g	<0.02%
Cholesterol 0 g	Coolesterol 0g	0%
Sodium 5-11 mg	Sodio 5 - 11 mg	0.2-0.5%
Potassium 45 - 54 mg	Potasio 45-54 mg	1.3-1.5%
Total Carbohydrate 2 g	Carbohidrato Total 2g	0.7%
Dietary Fiber 0.01-0.05 g	Fibra 0.01-0.05g	0.04-0.2%
Protein 0.3 - 0.4 g	Proteína 0.3-0.4g	0.6-0.8%
Vitamin C	Vitamina C	11-15%
Calcium	Calcio	0.2%
Iron	Hierro	0.5-1.0%
Percent Daily Values are based on a 2,000 calorie diet. Los valores porcentuales diarios están dados en una dieta de 2,000 calorías		

Compound	Maca Samples	
	Black Maca	Red Maca
Formic acid	4.10	6.94
Adenine	6.23	5.06
Fumaric acid	13.79	15.43
Uridine	10.82	10.71
Sucrose	1632.36	1368.35
Glucotropeolin	77.50	72.08
Macamides	55.21	39.86
Choline	327.44	366.99
GABA	40.09	76.59
Malic acid	83.88	92.81
Glutamine	132.01	118.27
Proline	875.25	832.98
Fatty acids	504.55	378.36
Alanine	156.22	152.41
Valine	111.48	107.61
Phytosterols	24.23	21.10

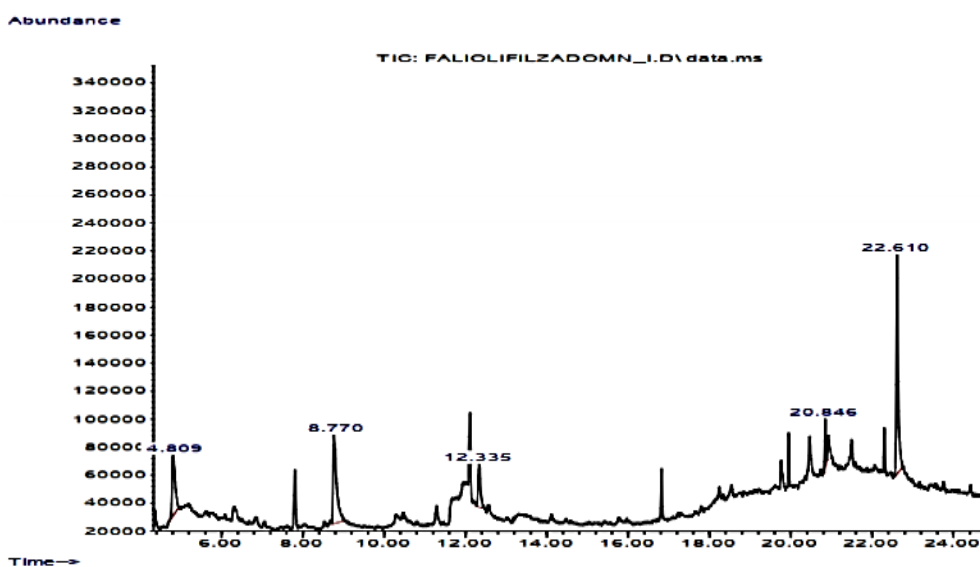
Anexo N°19. Cromatogramas de maca negra y roja

Fondo del Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica/Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC/FONDECYT), Perú, Círculo de Investigación de Plantas con Efecto en la Salud, (Grant no. 010-2014-FONDECYT).

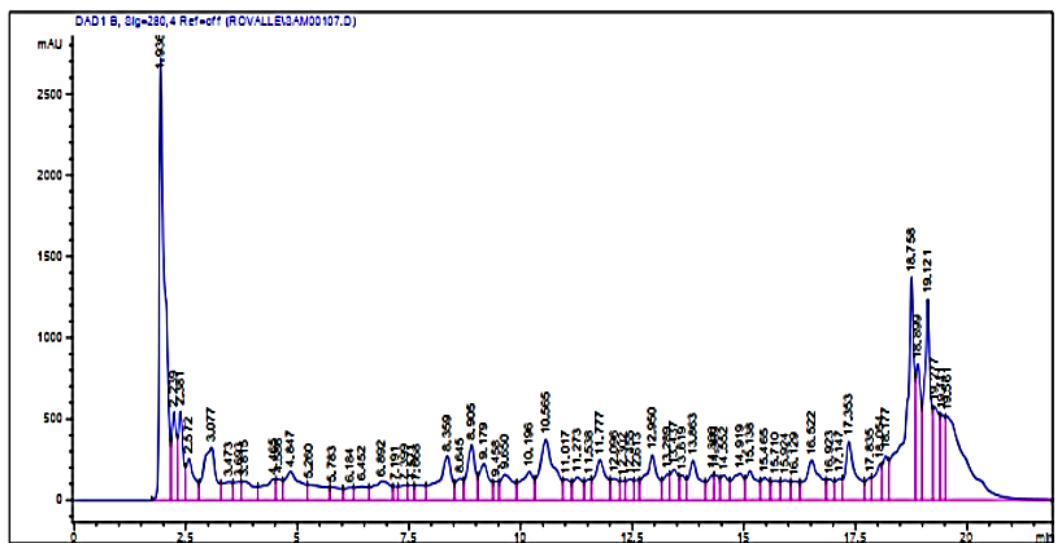
Cromatograma del extracto metanólico de Maca negra



Cromatograma del extracto acuoso de Maca negra



Cromatograma del extracto butanólico de Maca Roja



Cromatograma FNNS de maca roja

