

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**IDENTIFICACIÓN DE LA ACUAPORINA 3 Y SU RELACIÓN
CON LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS DE
ESPERMATOZOIDES DE ALPACA
(*Vicugna pacos*)**

TESIS

Presentada por:

Bach. Cristian Kennedy Rivera Chino

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA – PERÚ

2026

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

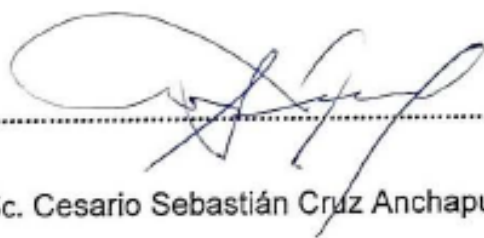
Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“IDENTIFICACIÓN DE LA ACUAPORINA 3 Y SU RELACIÓN
CON LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS DE
ESPERMATOZOIDES DE ALPACA (*Vicugna pacos*)”**

TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 25 DE SEPTIEMBRE DEL 2025,
SIENDO EL JURADO CALIFICADOR:

PRESIDENTE:



MSc. Cesario Sebastián Cruz Anchapuri

SECRETARIO:



MSc. Maribel Fortunata Medina Rojas

VOCAL:



Dr. Duany Condemayta Cutipa

ASESOR:



Dr. Daniel Gandarillas Espezúa

3

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Daniel Gandarillas Espezúa** en mi condición de asesor acreditada por la resolución de facultad N° 8097-2023-FCAG de la tesis titulada:

IDENTIFICACIÓN DE LA ACUAPORINA 3 Y SU RELACIÓN CON LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA (*Vicugna pacos*)", presentada por el Bachiller: Cristian Kennedy Rivera Chino para optar el título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista, habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual Turnitin cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 9%. Por lo que **CERTIFICO LA SIMILARIDAD** de la tesis, por lo cual otorgo este certificado para dar continuidad a los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.



ASESOR

DANIEL GANDARILLAS ESPEZÚA

DNI: 01771233



TESISTA

CRISTIAN KENNEDY RIVERA CHINO

DNI: 74574263

DEDICATORIA

A mi madre, la mujer que supo soltar mi mano cuando era pequeño para que hoy pudiera sostener este título.

Gracias por enseñarme que el amor más grande a veces duele, pero construye.

A mi padre, cómplice silencioso de esa decisión, que convirtió la distancia en enseñanzas.

A mis hermanos, que crecieron a mi lado incluso cuando estaba lejos.

A mi familia, el equipo que convirtió el sacrificio en un puente hacia este momento en que les devuelvo una parte de todo lo que me dieron.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, mi alma mater.

A todos mis docentes, que vieron en mí no solo un alumno, sino un ser con dudas, miedos y sueños por cumplir. A todos ustedes que me enseñaron y brindaron todos los conocimientos y experiencias adquiridas en el transcurso de mi vida universitaria.

A mi asesor el Dr. Daniel Gandarillas Espezúa por su apoyo, confianza, sobre todo tolerancia.

Al Proyecto de semilleros “Identificación, localización y función de las acuaporinas AQP3, AQP7 y AQP11 en espermatozoides de alpaca – Región Tacna” por brindarme su apoyo para el desarrollo de esta tesis.

A Asencia, mi mamita.

A mis tíos, cuyo apoyo incondicional durante mi niñez y adolescencia fue esencial. Gracias por velar por mi bienestar, ofrecerme un hogar cuando lo necesité y demostrarme que la familia se extiende más allá de la sangre.

A Ruth, por ser mi soporte en los días más difíciles, cuando el estrés y la frustración nublaban mi carácter.

A Edith, por extender su mano cuando más la necesitaba, cuando el peso de las dificultades parecía ahogarme. Gracias por creer en mí incluso cuando yo había dejado de hacerlo.

A Angelina, por sus consejos llenos de sabiduría y por ayudarme a ver la realidad cuando mis emociones nublaban mi juicio.

A Emely, por su paciencia, por las historias en la madrugada, por su capacidad para escuchar en los días de mayor estrés y por recordarme que incluso los desafíos más complejos tienen solución. Con el alma en deuda eterna.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1. Descripción del Problema.....	4
1.2. Formulación del Problema.....	7
1.3. Justificación	7
1.4. Objetivos.....	8
1.4.1. Objetivo general	8
1.4.2. Objetivos específicos.....	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	9
2.1. Antecedentes.....	9
2.1.1. En el ámbito internacional	9
2.2. Bases Teóricas	11
2.2.1. Los camélidos sudamericanos	11
2.2.2. Características del semen de alpacas.....	16
2.2.3. Las acuaporinas	17
2.3. Definición de Términos	26

CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS	28
3.1. Material.....	28
3.1.1. Ubicación Geográfica y Temporal.....	28
3.1.2. Población y Muestra	28
3.1.3. Tipo y diseño de Investigación	29
3.1.4. Equipos de laboratorio.....	30
3.1.5. Material de laboratorio.....	30
3.1.6. Reactivos.....	30
3.2. Metodología de la Investigación	31
3.2.1. Colecta y evaluación del semen	31
3.2.2. Evaluación de los parámetros espermáticos:	32
3.2.3. Proceso de refrigeración y congelación de muestras seminales.....	34
3.2.4. Identificación de la acuaporina 3	35
3.2.5. Extracción de Proteína y Western Blotting:	36
3.3. Análisis de Datos.....	38
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	39
4.1. Reporte de la presencia de la acuaporina 3 en espermatozoides de alpaca (<i>Vicugna pacos</i>).....	39
4.2. Parámetros espermáticos según grupo y su relación con la presencia de la acuaporina 3 en alpacas (<i>Vicugna pacos</i>)	40

4.3. Contrastación de Hipótesis.....	42
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES.....	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Identificación de la acuaporina 3 en espermatozoides de alpaca mediante Western blot</i>	39
Tabla 2 <i>Parámetros espermáticos post-congelación por grupo y su relación con la AQP3</i>	40

RESUMEN

El estudio se realizó en el laboratorio de biotecnología reproductiva animal de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna; tuvo como objetivo identificar la acuaporina 3 (AQP3) y la relación con los parámetros espermáticos de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) en un grupo de 4 alpacas macho de 4 a 7 años de edad, con antecedentes de presentar parámetros espermáticos favorables ($n=2$) y desfavorables ($n=2$) a la descongelación. Las muestras de semen se obtuvieron mediante vagina artificial y maniquí con un total de 5 repeticiones por animal, posteriormente se llevaron a un proceso de congelación en nitrógeno líquido a -196°C , para luego descongelarlo y dividirlos en dos grupos: favorables y desfavorables. Se realizó la identificación de la AQP3 mediante Western blot en cada grupo ($r=3$), antes y después de la congelación. Se realizó un Test-Fisher para determinar la asociación de las variables: identificación de la acuaporina 3 y parámetros espermáticos de buena y mala calidad. Se identificó la AQP3 en una muestra (antes y después de congelación) perteneciente al grupo de parámetros espermáticos de buena calidad ($p<0,05$). Se concluye que la identificación de la acuaporina 3 en la muestra seminal de animales con antecedentes favorables al proceso de congelación podría indicar una participación de la proteína en el proceso de supervivencia espermática.

Palabras clave: Alpaca, acuaporina 3, parámetros espermáticos, western blot

ABSTRACT

The aim of this study was to identify aquaporin 3 and its relationship with sperm parameters in alpaca sperm (*Vicugna pacos*) in a group of 4 male alpacas aged 4 to 7 years, with a history of favorable (n=2) and unfavorable (n=2) sperm parameters upon thawing. Semen samples were obtained using an artificial vagina and a mannequin with a total of 5 repetitions per animal, then they were frozen in 0,25 ml straws in liquid nitrogen at -196°C, then thawed and divided into two groups: favorable and unfavorable. Aquaporin 3 was identified using the Western blot technique in each group (n=3), before and after freezing. A Fisher test was performed to determine the association of the variables: identification of aquaporin 3 and favorable and unfavorable sperm parameters. Aquaporin 3 was identified in a semen sample (before and after freezing) belonging to the group of favorable sperm parameters ($p<0,05$). It is concluded that the identification of aquaporin 3 in the semen sample of animals with favorable antecedents to the freezing process could indicate a participation of the protein in the sperm survival process.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una de las tecnologías de reproducción asistida más relevantes a nivel mundial, con un impacto significativo en la producción de camélidos. Esta biotecnología permite que un solo reproductor genere numerosos descendientes a lo largo de su vida reproductiva (Giuliano et al, 2012; O'Brien et al., 2022). Aunque los métodos para la recolección e IA con semen fresco ahora están bien establecidos, no existen métodos confiables para la aplicación comercial de la IA utilizando semen de camélidos criopreservados (Fumuso et al., 2020, 2021).

Esta limitación del semen de alpacas se debe a la dificultad en su procesamiento, conservación, bajo volumen, mala calidad y alta viscosidad. Además, que los espermatozoides son llevados a temperaturas ultra bajas de -196°C para la criopreservación; aun así, presentando poca tolerancia a la congelación-descongelación en comparación con otras especies (Kershaw et al., 2012), lo que explica que sólo entre el 25% y 40% sobrevivan al proceso de criopreservación y muestran funcionalidad reducida frente a muestras frescas (Bravo et al., 2000).

Otra propiedad criobiológica determinante en el éxito de la criopreservación de espermatozoides es la permeabilidad de la membrana

plasmática al agua y agentes crioprotectores (CPA) como el glicerol (Mazur, 1984). Las acuaporinas (AQP) son canales de agua que confieren a los espermatozoides la capacidad de adaptarse a cambios en el volumen celular (Huang et al., 2006). Entre estas, las acuagliceroporinas: AQP-3, AQP-7, AQP-9, AQP-10 identificadas en mamíferos están directamente relacionadas con el mecanismo de adaptación (Kreida & Toernorth, 2015). Por ello, representan un objetivo de estudio prioritario para optimizar los protocolos de congelación espermática.

Particularmente, la AQP3 es una proteína de membrana sensible a los cambios osmóticos que se producen durante los procesos de congelación y descongelación, lo cual influye directamente en la criorresistencia espermática (Prieto et al., 2017). Diversos estudios han documentado la presencia y función en los espermatozoides en porcinos, bovinos e incluidos en el ser humano, donde se asocia a la osmoadaptación, motilidad y tolerancia a la congelación (Pellavio & Laforenza, 2021; Yeung et al., 2010; Yesté et al., 2017). Hasta donde sabemos, no existen estudios previos sobre la determinación de AQP-3 en espermatozoides de alpaca.

Por lo tanto, este trabajo se centra en identificar AQP-3 y su relación con los parámetros espermáticos post-descongelación en el semen de alpacas (*Vicugna pacos*).

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del Problema

El uso de herramientas biotecnológicas permite determinar la fertilidad tanto del macho y de la hembra, mediante la evaluación de biomarcadores moleculares en la calidad seminal prediciendo la eficiencia reproductiva del donante (Michalek & Oberska, 2023).

Para mejorar los resultados de la técnica de reproducción asistida (TRA) es crucial el conocimiento de la biología celular del espermatozoide de alpaca, en los últimos años se ha investigado la participación de biomarcadores moleculares en los diversos procesos de la célula; una de ellas son proteínas específicas llamadas acuaporinas (AQP) que cumplen la función de canal para facilitar el transporte de agua, glicerol y otros pequeños solutos a través de membranas biológicas (Agre, 2004; Grayson et al., 2003). Se tiene conocimiento que estas proteínas están ampliamente distribuidas por todo el organismo. En especial en la participación, en la fertilidad y el potencial reproductivo.

Hasta el momento, se han identificado 13 miembros de la familia de las AQPs en células de mamíferos y se clasifican según su similitud de secuencia y selectividad para el sustrato en tres grupos principales: las

AQP ortodoxas, superacuaporinas y las acuagliceroporinas, las cuales son canales permeables al agua y otros pequeños solutos, como urea o glicerol y son: AQP (3, 7, 9, 10 y 11) (Yeste et al., 2017).

En los reportes de Yeste et al, (2017) las AQP 3; 7 y 11 se identificaron mayormente en espermatozoides, cumpliendo funciones desde el inicio de la espermatogénesis, capacitación, reacción acrosómica y en la criotolerancia espermática. Diversos estudios indican que estas 3 AQPs difieren en su localización dentro del espermatozoide de diferentes especies animales y el hombre; la expresión de AQP3 en humanos, cerdo y vacuno se encuentra en mayor abundancia en la pieza intermedia del espermatozoide (Chen et al., 2011; Prieto, et al., 2017).

Sin embargo, la expresión de las AQPs 3 en la estructura espermática y el rol específico que cumple varían en las diferentes especies; algunas de estas participan en la activación de la motilidad y capacitación espermática como indicador de la calidad seminal (Delgado et al., 2022). En cerdos la AQP3 está relacionada con criotolerancia espermática (Saito et al., 2004). Asimismo, Morato et al. (2018) reporta en bovinos la relación de AQP5 con criotolerancia, la estrecha relación de la funcionalidad de las AQP con la criotolerancia viene consecuentemente del

rol osmoregulador en las membranas lipídicas para la mantención de parámetros espermáticos favorables (Yeste et al., 2017).

Teniendo en cuenta el rol de las AQP's en la fertilidad en humanos y especies domésticas, se establece la relación de estas proteínas como biomarcadores de parámetros espermáticos y congelación seminal (Bonilla et al., 2017; Morató et al., 2018; Ribeiro et al., 2021). Sin embargo, no existen trabajos realizados en alpacas o camélidos sudamericanos. Con la identificación y funcionalidad de las AQP's en las células espermáticas de alpaca, podríamos determinar la calidad seminal y fertilidad; mediante la cuantificación de las AQP's en relación a los distintos parámetros espermáticos favorables y no favorables; que determinaría un donante apto para el proceso de criopreservación y mejorar los resultados en los protocolos de congelación y predecir el potencial reproductivo del macho.

La profundización en las disciplinas de ciencia básica como la biología del espermatozoide de la alpaca y de las AQP's permitirá desvelar los mecanismos moleculares que controlan eventos relacionados a la baja calidad seminal e infertilidad y destacar puntos de intervención potenciales para mejorar la TRA en esta especie.

1.2. Formulación del Problema

¿La acuaporina 3 en semen de alpaca (*Vicugna pacos*) tiene relación con los parámetros espermáticos en post congelación?

1.3. Justificación

Con la identificación y funcionalidad de las AQPs en las células espermáticas de alpaca, podríamos determinar la calidad seminal y fertilidad; mediante la cuantificación de las AQPs en relación a los distintos parámetros espermáticos favorables y no favorables; que determinaría un donante apto para el proceso de criopreservación y mejorar los resultados en los protocolos de congelación y predecir el potencial reproductivo del macho.

En camélidos sudamericanos no existen reportes sobre la expresión de la AQP3 en el espermatozoide. Este trabajo de investigación proporciona la primera demostración directa de la presencia de las acuaporinas en el espermatozoide de alpaca, donde la identificación de marcadores moleculares de calidad seminal permitirá seleccionar los mejores eyaculados, los cuales serán usados en la inseminación artificial mejorando la eficiencia reproductiva y rentabilidad de los reproductores. El estudio brindará también un aporte metodológico mediante la experimentación y estandarización de protocolos para la identificación de

AQP3 en alpacas, debido a que este trabajo es uno de los primeros estudios en camélidos sudamericanos.

El aporte científico del estudio se canalizó a través del intercambio y difusión de los resultados obtenidos que da a conocer proteínas de interés biológico que servirá para futuras investigaciones relacionadas a los mecanismos de criopreservación y la influencia sobre la preservación de espermatozoides de alpacas. Asimismo, el estudio es un punto de partida para futuras investigaciones en acuaporinas en células germinales, así como fuente de bibliografía a investigadores en la línea de investigación para biotecnología reproductiva animal.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

“Identificar la acuaporina 3 y su relación con la calidad de parámetros espermáticos post- congelación en semen de alpaca (*Vicugna pacos*).

1.4.2. Objetivos específicos

- a. Identificar la acuaporina 3 en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*).
- b. Comparar parámetros espermáticos en grupos de machos con buena y mala calidad seminal post congelación y su relación con la presencia de la acuaporina 3 en alpacas (*Vicugna pacos*).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. En el ámbito internacional

Bonilla et al. (2017) investigaron la presencia y función de la acuaporina 3 (AQP3) en el espermatozoides de sementales, evaluando muestras antes y después de la criopreservación. Confirmaron que AQP3 está presente en todos los eyaculados analizados y observaron que aquellos con mejor capacidad de congelación presentaban niveles significativamente más altos de esta proteína. Estos resultados sugieren que la AQP3 no solo participa en la respuesta del espermatozoides al proceso de congelación, sino que también podría utilizarse como un biomarcador para predecir la criotolerancia espermática.

Prieto et al. (2017) en su estudio sobre semen porcino, se evaluaron la AQP3 como biomarcador de criotolerancia, analizando 29 eyaculados clasificados por su capacidad de congelación. Los resultados mostraron que los eyaculados con buena congelabilidad presentaron mayores niveles de AQP3 antes de la congelación, sugiriendo su posible asociación con la resistencia espermática al proceso de crioconservación.

Prieto et al. (2017), llevaron a cabo un estudio titulado *“Relación de las acuaporinas 3, 7 y 11 con la resistencia del esperma de verraco a los procedimientos de congelación y descongelación”*, en el cual evaluaron el papel de la AQP3 como posible biomarcador de crio tolerancia en semen porcino. Para ello, analizaron 29 eyaculados, que fueron clasificados en grupos de buena y mala congelabilidad según la viabilidad y motilidad espermática post-descongelación. Mediante técnicas de inmunotransferencia e inmunocitoquímica, encontraron que antes de la congelación, la cantidad relativa de AQP3 era significativamente mayor en los eyaculados con buena congelabilidad, sin observarse cambios en su patrón de localización tras la congelación. Estos hallazgos sugieren que la AQP3 podría estar asociada con una mayor resistencia del esperma porcino al proceso de crioconservación, considerándose como un potencial biomarcador de congelabilidad

Fujii et al. (2018) evaluaron la expresión de AQP3 en semen fresco, refrigerado y congelado de toros, encontrando que su cantidad y localización (principalmente en la cola) no se vieron afectadas por la criopreservación, sin embargo, la variación en su expresión entre eyaculados se relaciona positivamente con la motilidad espermática, sugiriendo que AQP3 podría estar asociada con el mantenimiento de la motilidad tras la congelación.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. *Los camélidos sudamericanos*

La alpaca es uno de los camélidos sudamericanos importantes en la producción de fibra, estos tienen un peso ligero y buena fortaleza, en esta especie, hay dos variedades que tienen distintas características fenotípicas. La alpaca Huacaya se caracteriza por tener un vellón compacto y esponjoso; mientras que la alpaca Suri por presentar fibras de gran longitud organizadas en rizos colgantes (Antonini et al., 2004). Ambas variedades tienen similar comportamiento reproductivo tales como la ovulación inducida, viscosidad de semen, bajas tasas de fertilidad y la producción de una cría por año.

2.2.1.1. Fisiología y anatomía del aparato reproductivo del macho

Los testículos de una alpaca adulta se mantienen en un escroto no pendular situado de 5 a 9 cm debajo del ano. Los testículos son pequeños, elípticos y posicionados en orientación vertical u orientación dorso-caudal oblicuo. Normalmente ambos testículos son del mismo tamaño y de consistencia firme, con movimiento libre en el escroto. La cabeza, cuerpo y cola del epidídimo son pequeños y conectados a los testículos (Ratto et al., 2020).

El escroto mantiene los testículos a una temperatura ligeramente más baja que la temperatura del cuerpo. El peso promedio de los testículos completamente desarrollados es de aproximadamente 15 g, los testículos son relativamente pequeños, en animales adultos miden entre 3,5 y 4 cm de largo y de 2,5 y 3 cm de ancho, móviles dentro de la bolsa escrotal. El conducto deferente es muy delgado (2mm) en su inicio y engrosa (3mm) cuando ingresa a la cavidad abdominal y termina cerca de la vejiga (Ratto et al., 2020).

La próstata está constituida por un cuerpo claramente definido a nivel del cuello de la vejiga y una parte diseminada a lo largo de la uretra pélvica. El cuerpo de la próstata mide aproximadamente 3x2 cm. La glándula bulbouretral es ovalada y localizada en ambos lados de la uretra a la salida de la pelvis (Bravo et al., 2000).

El pene es de consistencia fibroelástica, con un pequeño proceso cartilaginoso conocido como proceso uretral. La longitud del pene sin erección de alpaca es de 26 cm, y la flexura sigmoidal es preescrotal. El prepucio es pequeño, localizado a 15 cm caudal al ombligo, con una apertura triangular en orientación caudal. Durante la micción, los camélidos dirigen el chorro de orina hacia atrás entre las patas traseras. El músculo protector del prepucio tira hacia adelante antes de aparearse, cambiando

la dirección de la apertura del prepucio y permitiendo que el pene se dirija hacia adelante (Cebra et al., 2013).

2.2.1.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es la suma de transformaciones que resultan en la formación de espermatozoide a partir de espermatogonia, mientras que se mantiene el número de espermatogonias (Hafez & Hafez, 2002).

La espermatogénesis comprende fases secuenciales de mitosis, meiosis y postmeiosis de células espermáticas precursoras. Este proceso se lleva a cabo en los compartimientos basal y adluminal del túbulo seminífero, separados funcionalmente entre sí por las células de Sertoli, que garantizan el ambiente propicio para que se lleve a cabo la espermatogénesis y resultan en la formación de los espermatozoides (Galina, 2008).

Estudios histológicos testiculares han mostrado que los túbulos seminíferos en las alpacas tienen un diámetro de 174 – 237µm y que el lumen aparece a los 12 meses de edad y que los primeros espermatozoides y células de Leydig observables se producen poco después, a los 15 a 18 meses de edad (Bravo et al., 2000), sin embargo, aún no se conoce en detalle el proceso de espermatogénesis.

La espermatogénesis incluye dos fases: a) la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren una división celular hasta transformarse en espermátides y la espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados (Hafez & Hafez, 2002).

A. Espermatocitogénesis: Después de la pubertad y durante la vida reproductiva del macho, las espermatogonias se dividen de una manera rápida y sucesiva por mitosis, donde las espermatogonias (células tronco) son la fuente para la continua producción de gametos, a partir de los cuales se originan las espermatogonias tipo A1 y otras células germinales. Las espermatogonias tipo A1 se dividen progresivamente para formar los tipos A2, A3 y A4. El tipo A4 se divide una vez más para formar espermatogonias intermedias, que a su vez forma la espermatogonia tipo B. Todas ellas representan estadios sucesivos del desarrollo de la espermatogonia, conocida también como fase proliferativa (Hafez & Hafez, 2002; Galina, 2008).

Las espermatogonias tipo B se dividen por lo menos una vez, y probablemente dos veces para formar los espermatocitos primarios. El espermatocito primario realiza su primera división meiótica o reduccional para dar origen a los espermatocitos secundarios. Ésta es una fase prolongada donde ocurren los cambios de material genético entre los pares

de cromosomas. Durante este periodo no sólo se realiza la reducción en el número de cromosomas somáticos, sino que también los cromosomas sexuales se separan de manera que un espermatocito secundario recibe el cromosoma X y el otro el cromosoma Y. En la segunda división meiótica de cada espermatocito secundario se produce dos espermátides (Hafez & Hafez, 2002; Galina, 2008).

- a. Espermiogénesis: Consiste en la transformación de las espermátides, redondas, en espermatozoides estructuralmente equipados para fertilizar al óvulo. Estos son cambios que ocurren cuando las espermátides están en contacto con el citoplasma de las células de Sertoli. Durante este proceso comienzan a diferenciarse las partes que constituyen el espermatozoide, primero la cabeza, el acrosoma, el cuello y la cola. Las diversas etapas de transformación de las espermátides se dividen en cuatro fases: de Golgi, de encasquetamiento, acrosómica y de maduración (Hafez & Hafez, 2002; Galina, 2008). La liberación de las células germinales formadas al interior de los túbulos seminíferos se denomina espermiación. Los espermatozoides son liberados con una gota citoplasmática en el cuello (gota proximal) (Hafez & Hafez, 2002).

2.2.2. Características del semen de alpacas

El semen de camélidos sudamericanos tiene una naturaleza viscosa y bajo volumen de colecta (Kershaw & Maxwell, 2012); cuando se utiliza el método de vagina artificial con maniquí el volumen varía entre 1,03 a 3,4 ml, donde el 88,5% del volumen es plasma seminal, el pH varía entre 6,8 a 7,83, el color es blanco lechoso, tiene una baja concentración espermática que oscila entre 21,8 a 105,8 × 10⁶ espermatozoides / ml, motilidad entre 46 a 87,6%, vitalidad entre 40,7 a 82,5% e integridad funcional de membrana entre 30,7 a 67,5% (Santiani et al., 2005; Garcia et al., 2017).

Las características morfométricas de los espermatozoides de alpaca tienen valores mayores que de la llama. La cabeza de los espermatozoides de la alpaca tiene un área entre 10,08 a 18,2 μm², el perímetro 12,33 a 14,91 μm, el largo 4,91 a 6,73 μm y el ancho 2,66 a 3,96 μm. Se han reportado diferentes formas de la cabeza de los espermatozoides, entre los principales tenemos cabezas elípticas (48,6%), cabezas largas (17,5%), piriformes (12%), entre otras, y entre los defectos se ha encontrado que el 51% de los espermatozoides tenían defectos en la cabeza, el 4% en el cuello/media pieza y el 16% en la pieza principal (Buendía et al., 2002).

2.2.3. Las acuaporinas

La palabra acuaporina proviene de la palabra latina aqua y porus= pasaje, son una familia de proteínas integrales que tienen la función de ser como canales de agua selectivos (Agre, 2004). Las acuaporinas facilitan el transporte de agua y en ciertos casos pequeños solutos no cargados, como el glicerol, la urea, el peróxido de hidrógeno y el arsenito (Yeste et al., 2017).

El tipo de transporte que presentan es pasivo, esto significa que no necesita consumo de energía (ATP), y siempre ocurre a favor del gradiente de concentración que se genera entre ambos lados de la membrana (Perez et al., 2014).

Las AQPs fueron descubiertas por primera vez en 1992 por Peter Agre y colegas, que mientras intentaban purificar una proteína de 32 kilodaltons (kD) relacionada con el grupo sanguíneo Rh, aislaron un polipéptido de menor peso molecular (Yeste et al., 2017). Posteriormente, se investigaron e identificaron hasta la acuaporina 13 en distintos órganos y tejidos.

2.2.3.1. Clasificación de las Acuaporinas

Hasta el momento, se han identificado 13 miembros de la familia de las AQPs en células de mamíferos y se clasifican según su similitud de secuencia y selectividad para el sustrato en tres grupos principales: AQP

ortodoxas, acuagliceroporinas (AGP) y super acuaporinas (Yeste et al., 2017).

El primer grupo está compuesto por siete miembros: AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 y AQP8. Son canales selectivos del agua, estos son permeables al agua, pero no a los iones, ni a moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas (Huang et al., 2006).

El segundo grupo es conocido como acuagliceroporinas (AGP), incluye cuatro miembros: AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10, que no sólo son permeables al agua sino también a glicerol, urea y otros pequeños electrolitos (Sales et al., 2013).

Finalmente, el tercer grupo, también conocido como super acuaporinas (super AQP), incluye las AQP11 Y AQP12. Estos son permeables al agua, se ha sugerido que el AQP11 también es un canal de glicerol en adipocitos humanos (Madeira et al., 2014). se expresan dentro de la célula y se localizan en la membrana de los organelos celulares, en lugar de la membrana plasmática (Yeste et al., 2017).

2.2.3.2. Las acuaporinas en el tracto reproductor

Las AQPs están presentes en casi todos los tejidos y órganos de los mamíferos. En el caso del tracto genital, del aparato reproductor de femenino y masculino, tienen un papel fundamental para la producción y

función de los gametos (Huang et al., 2006); en el aparato reproductor femenino, estas proteínas están implicadas en varios procesos fundamentales, como el flujo del agua dentro del útero, la dilatación cervical durante la gestación, el transporte del ovocito a lo largo del oviducto, el desarrollo folicular, la formación de blastocistos, la implantación del embrión en el útero y la reabsorción del líquido amniótico (Huang et al., 2006).

En el sistema reproductor masculino se demostró que las AQP están presentes en la membrana plasmática de las células epiteliales secretoras de la vesícula seminal y la próstata (Huang et al., 2006). Por otra parte, participan en la regulación del equilibrio osmótico y de la adaptación de los espermatozoides a los cambios de osmolaridad del entorno (Yeung & Cooper, 2010).

2.2.3.3. Acuaporinas en espermatozoides de diferentes especies

Aunque una gran cantidad de estudios han descrito el posible de las AQPs en el tracto reproductivo masculino, la identificación, localización y función de estas proteínas en los espermatozoides ha sido menos estudiado, a pesar de su interés y sus posibles implicaciones (Yeste et al., 2017).

En diferentes investigaciones, las acuaporinas han sido encontrados en espermatozoides de diversas especies, entre ellas: el hombre, ratón,

jabalí, toro, perro e incluso en peces (Domeniconi et al., 2007; Moretti et al., 2012). La AQP más investigadas son, las AQP3, AQP7, AQP9 y AQP11 y son las que más se han estudiado (Yeste et al., 2017).

Por otra parte, se ha observado que por el tipo de AQP su ubicación varía según especie- específica. Por ejemplo, en humanos y en ratón, se han identificado las AQP3, AQP7 y AQP11, mientras que la AQP3 se encuentra en la cola espermática de ambas especies, la AQP7 se localiza en la cabeza y la cola del espermatozoide humano y la AQP 11 se halla en la cola del espermatozoide de ratón (Yeung & Cooper, 2010) en el cerdo, se ha determinado que la AQP3 se encuentra en la pieza intermedia y el acrosoma, la AQP7 en la pieza de conexión y la AQP11 en la cabeza y en la cola del espermatozoide (Prieto, et al., 2017).

Asimismo, hay que destacar que la relación de dichas AQPs con la resistencia de los espermatozoides a la criopreservación difiere entre los espermatozoides porcinos y bovinos. Así, la AQP3 está relacionada con la criotolerancia del espermatozoide porcino, la AQP7 es más abundante en los eyaculados de bovino buenos congelados, y la AQP11 se asocia con la resistencia de los espermatozoides a la congelación en ambas especies (Prieto et al., 2017).

2.2.3.4. Técnicas para identificación de proteínas

En la actualidad, son varias las técnicas que permiten detectar las proteínas de membrana como las AQP, estas técnicas pueden ser clasificadas en función al diseño de herramientas de detección a nivel estructural de la célula. La detección de AQP ha avanzado considerablemente en los últimos años mejorando la sensibilidad del diagnóstico sin comprometer la especificidad.

a. Inmunodifusión

La reacción fundamental de la inmunología implica la interacción de anticuerpos (Ac) y antígenos (Ag). Estas interacciones son útiles en la defensa del cuerpo contra infecciones bacterianas y virales y toxinas. Las capacidades de defensa dependen del reconocimiento de antígenos por componentes humorales del sistema inmunológico. A continuación, se producen anticuerpos específicos en respuesta a la exposición al antígeno. La formación de complejos antígeno-anticuerpo es el primer paso para eliminar agentes infecciosos del cuerpo. Debido a que cada anticuerpo puede unirse a más de un antígeno y cada antígeno puede estar unido por más de una molécula de anticuerpo, pueden formarse complejos macromoleculares muy grandes. Estos complejos forman precipitados que pueden ser eliminados del cuerpo a través de diversos medios. Estos

precipitados son también útiles para pruebas de laboratorio y de diagnóstico (Salkie, 1996).

La inmunodifusión radial (RID) es una técnica que puede determinar cuantitativamente la concentración de un antígeno. A diferencia de muchas técnicas de precipitación en gel y líquido que detectan cualitativamente el antígeno, el RID es una técnica cuantitativa sensible que se usa a menudo clínicamente para detectar niveles de proteínas sanguíneas en pacientes (Salkie, 1996).

b. Electroforesis

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una de las metodologías más utilizadas en el laboratorio en todo lo relacionado con el trabajo con ácidos nucleicos. Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza. Podemos además extraer del gel los fragmentos de ADN que sean de interés, para posteriormente utilizarlos en diferentes aplicaciones (Eslami & Lujan, 2010).

La electroforesis de proteína y ADN fue, y sigue siendo, una herramienta de importancia primordial en el desarrollo de las técnicas

recombinante o ingeniería genética. La idea de utilizar la técnica de electroforesis a través de una matriz para analizar muestras de ADN corresponde a Vin Thorne, un bioquímico del Instituto de Virología de Glasgow, quien a mediados de los años 60 del pasado siglo estaba interesado en caracterizar las distintas formas de ADN que se obtenían de partículas purificadas de polyomavirus. Su razonamiento era que una combinación de fuerzas eléctricas y de fricción permitiría el desplazamiento y separación en función del tamaño o topología de diferentes moléculas de ADN (Eslami & Lujan, 2010).

c. Inmunoelectroforesis

La inmunoelectroforesis se utiliza en laboratorios clínicos y de investigación para separar e identificar proteínas en base a su comportamiento electroforético y a sus propiedades inmunológicas. Proteínas, tales como proteínas de suero de conejo, que son antígenos, cuando se inyectan en otro animal, como una cabra (el huésped), provocan la producción de anticuerpos en el huésped. La interacción entre el antígeno y su anticuerpo, que es también una proteína, es a la vez fuerte y altamente específica. Si se mezclan soluciones de antígeno y anticuerpo en diferentes proporciones, se encuentra que, a una razón específica, conocida como punto de equivalencia, se maximiza la unión y se forma un precipitado de complejo antígenoanticuerpo (Delves et al., 2017).

La electroforesis en gel es un método analítico ampliamente utilizado que separa las moléculas basadas en la carga, el tamaño y la forma. Es particularmente útil para determinar el tamaño de las biomoléculas. Las muestras de proteínas se cargan en pocillos hechos en el gel al solidificarse. El gel, que consta de poros microscópicos que actúan como un tamiz molecular, se coloca en una cámara que contiene una solución tampón y electrodos. La corriente se aplica desde una fuente de alimentación de corriente continua (DC). Dado que las biomoléculas se cargan, migrarán a través del gel (Delves et al., 2017).

d. Western Blot: Electroforesis vertical para la determinación de proteínas

Extracción de proteínas: Extracción mediante solución de lisis: Es esencial el uso de una solución que permita mantener estable el pH, la fuerza iónica y la estabilidad de las proteínas que se desea extraer. Es importante trabajar a bajas temperaturas (4°C), de ser posible enfriar los dispositivos que usaremos para la extracción y las soluciones. Existen soluciones comerciales que facilitan la extracción al tiempo que estabilizan las proteínas de la muestra, aunque también se pueden preparar en el laboratorio (Eslami & Lujan, 2010).

Electroforesis: Una vez obtenido la proteína se procede a separarlo mediante su peso molecular, la electroforesis es un método que permite separar las proteínas bajo un campo eléctrico de acuerdo a su movilidad electroforética. El gel de poliacrilamida se coloca en un compartimento que contiene el tampón de migración. Un tampón de migración suele contener 25mM Tris; 190mM glicina; 0,1% SDS; pH 8,3.

Los lisados proteicos se cargan en las calles del gel, normalmente entre 20 y 40 µg por calle. Se aplica un campo eléctrico que provoca el movimiento de las proteínas hacia el polo positivo. Al haberse tratado las proteínas con SDS (cargas negativas), las cargas SDS-PAGE endógenas de las mismas son despreciables. El resultado es que las proteínas se separan en función de su talla, o peso molecular y las proteínas de menor tamaño quedan menos retenidas en la matriz del gel y por tanto migran más rápidamente (Eslami & Lujan, 2010).

Transferencia: Una vez realizada la electroforesis, es necesario marcar la proteína de interés para poder visualizarla. El gel no es una superficie adecuada para poder marcar las proteínas. Los anticuerpos no son retenidos en el gel, además, los geles son frágiles y difíciles de manipular. Por tanto, es necesario transferir las proteínas a un soporte más adecuado.

El principio es similar al de PAGE, es decir, las proteínas cargadas negativamente migran hacia el polo positivo bajo el efecto de un campo eléctrico. Se intercala una membrana entre el gel y el electrodo positivo. Las proteínas se adhieren a la membrana siguiendo la misma disposición que en el gel. Las membranas pueden ser de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Eslami & Lujan, 2010).

Inmunodetección: Este proceso consiste en el empleo de anticuerpos para la detección de las proteínas de interés, El uso de anticuerpos específicos es importante para la especificidad en la detección. Asimismo, el empleo de insumos bloqueantes para otras proteínas (BSA, leche) permite evitar errores en la conjugación de antígeno y anticuerpo. El resultado de la detección de la proteína se realiza mediante la tinción con azul de comassie (Eslami & Lujan, 2010).

2.3. Definición de Términos

Acuaporina: Las acuaporinas constituyen una familia de proteínas que se caracterizan por formar poros que se encuentran en las membranas celulares atravesándolas y permitiendo el paso de agua a través del estrecho canal que forman en su interior (Yeste et al., 2017).

Semen: Fluido espeso y de color blanquecino que está compuesto por un líquido en el que se encuentran en suspensión los espermatozoides;

se produce por las secreciones de distintas glándulas del aparato reproductor masculino, principalmente la próstata y los testículos, y se expulsa en el momento de la eyaculación (Hafez & Hafez, 2002).

Test hiposmótico: La prueba de endosmosis (hypoosmotic test, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica (Diccionario Cunningham, 2000).

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Ubicación Geográfica y Temporal

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología reproductiva animal de la escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia perteneciente a la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, ubicado a una coordenada UTM 366907 8006025 y altitud promedio de 560 m s. n. m., en la provincia de Tacna; con temperatura que fluctúa entre 22 a 30° en época de verano y 10 a 24° de temperatura en época de invierno. El estudio se desarrolló durante los meses de junio a diciembre del año 2024.

3.1.2. Población y Muestra

El presente estudio se llevó a cabo con un grupo de cuatro alpacas machos de la raza Huacaya, con edades comprendidas entre los 4 y 7 años. Todos los animales estaban previamente entrenados para la colecta de semen mediante el uso de una vagina artificial acoplada a un maniquí. La selección de los individuos se realizó mediante un muestreo no probabilístico por conveniencia, eligiendo animales que presentaban antecedentes de buena calidad espermática (grupo 1; n=2) y mala calidad

espermática (grupo 2; n=2) tras el proceso de descongelación, con el fin de comparar estos parámetros con la presencia de AQP 3 (Hernández, 2014).

3.1.3. Tipo y diseño de Investigación

El estudio es de tipo descriptivo y transversal, ya que las variables de estudio fueron observadas sin manipulación alguna, y la evaluación se realizó en un único momento durante el desarrollo del estudio.

El semen fue colectado mediante vagina artificial, se realizó 5 colectas de semen (r=5) por cada animal con antecedentes de parámetros espermáticos de buena calidad a la descongelación (n=2) y mala calidad a la descongelación (n=2), la muestra seminal se fraccionó en dos: la primera muestra para la evaluación de los parámetros espermáticos después de la congelación y la segunda para la identificación de la acuaporina 3 mediante la técnica de Western blot.

Cuadro 1. Diseño de investigación

Muestra seminal de buena calidad a la congelación (n=2)		Muestra seminal de mala calidad a la congelación (n=2)	
Identificación de AQP 3 Western Blot	Evaluación de parámetros espermáticos post-congelación	Identificación de AQP 3 Western Blot	Evaluación de parámetros espermáticos post-congelación
3R	5R	3R	5R
3R	5R	3R	5R

R: repeticiones

3.1.4. Equipos de laboratorio

- Microscopio de contraste de fases y Baño María

3.1.5. Material de laboratorio

- Vasos de precipitación de 50ml Tubos de 15 ml
- Viales de 1,5 ml Termómetro Placas Petri
- Cámara de Neubauer Laminas portaobjetos Laminas cubreobjetos
- Micropipetas (10, 100 y 1 000 ul) Tips (puntillas descartables)
- Filtro para jeringa polietersulfona
- Fundas vaginales (Latex)
- Tubos de PVC (5 cm diámetro) Ligas de sujeción

3.1.6. Reactivos

- Eosina (5%).
- Nigrosina (10%). Fructosa.
- Formaldehido.
- Citrato de sodio bihidratada Percoll
- NaCl Rojo Fenol
- Azul de Tripan 0,4%
- Agua ultrapura Ácido cítrico

3.2. Metodología de la Investigación

3.2.1. *Colecta y evaluación del semen*

Fabricación del dispositivo artificial para la colecta semen: vagina artificial

- La funda de látex se colocó en el interior de un tubo de PVC, en un extremo se sujetó el tubo colector de semen con una liga.
- Por el otro extremo del tubo se vertió agua caliente a 43°C en el interior del tubo que también se sujetó con ligas.
- Se insufló aire por la boquilla del tubo, logrando una presión de un dedo meñique en el interior del látex.
- La vagina artificial armada se colocó en la parte interna del maniquí, previamente se desinfectó con alcohol.
- Se sujetó bien la vagina al maniquí y se colocó en posición de cúbito ventral.
- Se esperó unos 15 a 20 min para que el macho eyacule en la vagina artificial, al término de la eyaculación se retiró cuidadosamente la vagina del maniquí y se llevó al laboratorio para su evaluación seminal.

3.2.2. Evaluación de los parámetros espermáticos:

3.2.2.1. Evaluación microscópica

Para la evaluación microscópica de los parámetros espermáticos se empleó un microscopio de contraste de fases (Carls Zeiss) con el Sistema de Análisis Computarizado de Semen (CASA-Androvisión).

a. Motilidad y concentración espermática:

Se alícuota 3 ul de muestra seminal diluida y se depositó en la cámara leja (sistema CASA), se seleccionó el programa motilidad y concentración; se evaluó 5 diferentes campos de la muestra y el sistema determinó los parámetros de motilidad y concentración.

b. Integridad de la membrana espermática: Prueba de Host

- Se llevó a baño María a una temperatura de 37°C un tubo falcón con 900 ul de solución hiposmótica.
- Se agregó 100ul de semen a la solución hiposmótica y se mantiene por 30 minutos en baño María (37°C).
- Pasados los 30 minutos, se agregó 100 ul de formol al 10% al tubo falcón y se retira del baño María.
- Se evaluó la reacción de las células espermáticas a la solución hiposmótica, en un microscopio óptico a 40X; se observó el número

de espermatozoides reaccionados, aquellos que presentan un hinchamiento y enrollamiento en su cola.

- Se realizó un conteo de 200 espermatozoides y se saca el porcentaje de espermatozoides reaccionados y no reaccionados.

c. Integridad de acrosoma: Tinción de azul de comassie

Se utilizó agua destilada (20 mL) con Brilliant Blue para Coomassie G250 (0,22 g), metanol (25 mL) y ácido acético 99% (5 mL). Se utilizó 10 µL de muestra para preparar un frotis y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente los frotis secos serán sumergidos en formaldehído a 4% en PBS por 15 minutos para su fijación y luego lavados en PBS. Finalmente, se agregó azul de comassie por inmersión por un periodo de 10 minutos y se escurrió el exceso de tinción y se dejó secar. Los frotis secos fueron observados a 100x con aceite de inmersión en un microscopio de campo claro, para clasificar los espermatozoides con coloración azul del acrosoma o estructura acrosomal íntegra (CB+), o coloración blanca del acrosoma o acrosoma dañado (CB-), cuantificando no menos de 100 espermatozoides por cada muestra.

d. Viabilidad espermática: Tinción de Eosina y Nigrosina

- En una lámina portaobjeto precalentada se agregó 10 µL de eosina nigrosina.

- Se extrajo 10 μ L de semen y se agregó a la lámina portaobjetos. Se homogenizó y se dejó reposar por 2 minutos.
- Luego se realizó un frotis y se dejó secar a temperatura ambiente.
- Una vez seco la muestra de tinción se procedió a lecturar el frotis, Se evaluó la lámina teñida en un microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión.
- Se determinó el número de espermatozoides vivos y muertos, mediante la cantidad de espermatozoides que se tiñeron de rosado como muertos y los no teñidos como vivos, realizando un conteo de 200 espermatozoides.

3.2.3. Proceso de refrigeración y congelación de muestras seminales

Una vez que el semen fue evaluado en fresco, se procedió a centrifugar a 3 500 rpm x 5 minutos para el retiro del plasma seminal, la muestra de semen se llevó a dilución 1:1 con la fracción A (dilutor sin crioprotector) del dilutor: Tris-yema de huevo. Las muestras de semen diluidas se llevaron al proceso de enfriamiento (en un vaso con agua a temperatura ambiente) gradualmente hasta 5°C en un tiempo aproximado de 2 horas; luego a esa temperatura, se adicionó la fracción B (dilutor con crioprotector) del respectivo dilutor y suplementado con 10 % de plasma seminal. Se dejó estabilizar por 30 minutos a esa temperatura. Las muestras refrigeradas a 5°C fueron envasadas en pajillas de 0,25 ml. Para luego llevarlas al proceso

de congelación, de forma manual con la utilización de un Termómetro (Oakton, Temp 10K Thermocouple) para controlar la temperatura de los vapores de nitrógeno líquido

Las pajillas de semen fueron selladas con alcohol polivinílico (PVA) y llevadas a vapores de nitrógeno a una altura de 10 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido, donde se mantuvieron durante 15 min hasta un descenso de temperatura de 5° a -30 °C (velocidad de descenso 2,3°C/1min) y finalmente fueron sumergidas directamente en nitrógeno líquido a -196°C, y se almacenó en el termo criogénico hasta su evaluación post descongelación.

3.2.4. Identificación de la acuaporina 3

La identificación de la AQP3 se realizó de manera individual y a través de la técnica de western blot; cuyo principio fue determinar las bandas presentes en el gel transferidos y estas son medidas en kilodalton (kDa), que es una unidad de medida utilizada para expresar el peso molecular de moléculas biológicas, especialmente proteínas y ácidos nucleicos.

La identificación de las acuaporinas AQP3 se realizó según descrito por Bonilla-Correal et al. (2017), mediante el análisis por Western blot,

utilizando el kit de ensayo DC Protein (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.), la cual se describe a continuación:

3.2.5. Extracción de Proteína y Western Blotting:

Se destinó 1ml de muestras de semen de cada eyaculado, se centrifugó a 600 g a 4°C por 10min. Se descartó el sobrenadante y el sedimento resuspenderá 400uL de Tampón de lisis [SDS (2%), Triton X-100 (1%), urea (8 M), DTT (2 mM), Tween-20 (0,5%), Tris-HCl (50 mM), inhibidor de proteasas cocktail (1%), PMSF (0,1 M) and sodium orthovanadate (700 mM).

Las muestras en tampón de lisis se sonicaron tres veces con cinco pulsos cada dos minutos (homogeneizador ultrasónico SONO-PLUS HD 2070; Bandelin, Berlín, Alemania). Luego, las muestras se centrifugaron a 10 000G y 4 ° C durante 15 min, y la proteína total se determinó mediante el kit de ensayo DC Protein (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.).

Se separó 10 ug de proteína total por muestra (pozo) mediante electroforesis de dodecilsulfato de sodio, en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), con geles separadores que contienen un 12% de acrilamida. La electroforesis se realizó durante aproximadamente 90 minutos y las bandas

de proteínas se transfirió posteriormente a membranas de polivinilideno de fluoruro a 120 mA durante 2 horas.

Las membranas se incubaron con solución de bloqueo (BSA al 5 % en TBS 1x) a 4 °C durante la noche en agitación. A continuación, se incubó a temperatura ambiente durante 1 h en agitación con los siguientes anticuerpos primarios en solución de bloqueo: anti-AQP3 (1:300; ab 125219; Abcam® PLC, Cambridge, MA, EE. UU.). Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces (cinco minutos cada lavado). Después de este paso, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Dako Dinamarca A/S, Glostrup, Dinamarca) a temperatura ambiente durante 1 h en diferentes diluciones: AQP3 (AB125219), se usó una dilución 1:100 (4ml, 0,5mg/ml) de anticuerpo primario y se incubó por 8 horas y una dilución 1:4 000 (4ml) de anticuerpo secundario y se incubó por 2 horas.

Se utilizaron los anticuerpos primarios: anti-AQP3 (1:300; ab 125219; Abcam® PLC, Cambridge, MA, EE. UU.). Después se usó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Dako Dinamarca A/S, Glostrup, Dinamarca).

La identificación de las bandas reactivas de acuaporina 3 se visualizaron con un sustrato quimioluminiscente (Immobilon Western

Detection Reagent; Millipore, Alemania). Para la adquisición de imágenes se utilizó el sistema quimioluminiscente Syngene y el software Genesys (Synoptics Limited, Cambridge, Reino Unido). Las bandas de proteínas AQP3 con el software IMAGEJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.).

3.3. Análisis de Datos

Los valores de distribución para los parámetros espermáticos: motilidad total, progresiva, integridad funcional de membrana, integridad de acrosoma y viabilidad espermática se analizaron mediante la prueba de Shapiro Wilk para evaluar la normalidad de los datos, para evaluar las diferencias entre la media de los parámetros espermáticos de buena y mala calidad se utilizó la prueba T-student. Para determinar la asociación entre las variables (presencia de la acuaporina 3 y los parámetros espermáticos de buena calidad) se utilizó el Test-Fisher. Se empleó el paquete estadístico R Studio (Versión 3,4).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Reporte de la presencia de la acuaporina 3 en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*)

Tabla 1

Identificación de la acuaporina 3 en espermatozoides de alpaca mediante Western blot

GRUPO	Individuos	Repetición	AQP 3
1	M6	3	Ausente
	MC3	3	Presente
2	S9	3	Ausente
	M5	3	Ausente

Nota. Grupo 1: buena calidad espermática; Grupo 2: mala calidad espermática.

En la tabla 1 se observó la presencia de la acuaporina 3 en espermatozoides divididos en dos grupos de animales, aquellos con parámetros espermáticos de buena y mala calidad a la descongelación; al análisis de asociación entre las variables de estudio se determinó una ligera asociación de 0,04 entre las variables de buena calidad y la presencia de la AQP-3 ($p < 0,05$), debido a que sólo en el 50% de los individuos con parámetros de buena calidad se ha identificado la acuaporina 3. En el

Anexo 1 se observa la acuaporina 3 con un peso molecular aproximado de 37 kDa encontrado en muestras frescas y post- congelación mediante la técnica Western blot. Este hallazgo no sólo confirma la presencia de AQP- 3 en espermatozoides de alpaca post-congelación, sino que también sugieren una relación en su identificación y la calidad espermática, particularmente en parámetros de motilidad e integridad funcional en las cuales se encuentra funcionalmente activa y a la vez muy variable entre diferentes organismos celulares perteneciente a un mismo grupo, como es el caso del macho MC3 con buena calidad de parámetros espermáticos.

4.2. Parámetros espermáticos según grupo y su relación con la presencia de la acuaporina 3 en alpacas (*Vicugna pacos*)

Tabla 2

Parámetros espermáticos post-congelación por grupo y su relación con la AQP3

PARÁMETROS ESPERMÁTICOS POST-CONGELACIÓN						
GRUPO	Motilidad total %	Motilidad progresiva %	Viabilidad %	Integridad de acrosoma %	Integridad funcional %	Identificación AQP 3
1	15,6±1,5 ^a	8,8±2,8 ^a	26±8,5	10±2,2 ^a	12,5±3,1	no
	20±3,4 ^a	11,1±5,4 ^a	18±2,4	15±3,9 ^a	16,5±4,7	si
2	10±4 ^b	5,3±2,2 ^b	22±5,5	7±1,3 ^b	13,3±1,1	no
	6,6±3,8 ^b	1,2±0,8 ^b	12±2,7	8±3,5 ^b	15±4,2	no

Nota. Grupo 1= buena calidad; grupo 2 = mala calidad

Superíndices ^{abc} diferentes dentro de la columna indican diferencias estadísticas

En la Tabla 2 se observa los parámetros espermáticos post-congelación, al comparar los dos grupos de muestras seminales de buena y mala calidad, observamos diferencias estadísticas ($p < 0,05$) en los parámetros de motilidad total, motilidad progresiva e integridad de acrosoma entre los grupos; en cuanto a viabilidad e integridad funcional no se observó diferencias estadísticas ($p > 0,05$) al comparar los grupos.

Al relacionar el grupo con presencia de AQP-3 y los parámetros espermáticos, estos mostraron valores más altos de motilidad total ($20,0 \pm 3,4\%$) y motilidad progresiva ($11,1 \pm 5,4\%$) en comparación con los espermatozoides negativos para AQP-3 ($10 \pm 4\%$ y $6,6 \pm 3,8\%$; $5,3 \pm 2,2\%$ y $1,2 \pm 0,8\%$, respectivamente). Aunque la viabilidad espermática fue variable ($26 \pm 8,5\%$ en buena calidad vs. $22 \pm 5,5\%$ en mala calidad) y la integridad funcional ($16,5 \pm 4,7\%$) fueron superiores en los espermatozoides que expresaban AQP-3, en comparación con los que no lo hacían ($12,5 \pm 3,1\%$, $13,3 \pm 1,1$ y $15 \pm 4,2\%$, respectivamente).

Estos resultados indican que la presencia de AQP-3 se asocia con mejores parámetros de calidad espermática post-congelación, particularmente en lo que respecta a la motilidad total, progresiva, la

integridad funcional y la estructura acrosómica, sugiriendo un posible papel protector o modulador de esta proteína durante el proceso de criopreservación.

Por otro lado, en el grupo de buena calidad sólo el 50% de individuos se identificó la AQP3, siendo esto un indicativo de la variabilidad entre individuos afectado por múltiples factores.

4.3. Contrastación de Hipótesis

Se realizó la contrastación de hipótesis de investigación con un nivel de significancia del 95% de confianza, donde:

- $p < 0,05$ = Se rechaza la H_0
- $p > 0,05$ = No existe evidencia suficiente para rechazar la H_0

H_0 : La identificación de la acuaporina 3 no se relaciona con los parámetros espermáticos de buena calidad post- congelación.

H_a : La identificación de la acuaporina 3 se relaciona con los parámetros espermáticos de buena calidad post- congelación.

Test-Fisher: p valor = 0,04

Entonces, se rechaza la hipótesis nula, indicando que existe una asociación entre las variables: presencia de la Acuaporina 3 y los parámetros espermáticos de buena calidad post-congelación.

DISCUSIÓN

Identificación de la acuaporina 3 en espermatozoides de alpaca

(Vicugna pacos)

Este es el primer estudio que identifica la AQP3 en espermatozoides de alpacas. Por lo que es importante resaltar la presencia de esta acuaporina en camélidos, que nos dará un punto de partida para nuevas investigaciones.

En el grupo 1, sólo el macho MC-03 mostró la presencia de AQP3 tanto en muestras frescas como descongeladas. En cambio, en el grupo 2, no se detectó la presencia de AQP3 ni en las muestras frescas ni en las descongeladas. La muestra con hallazgo de la AQP3 presenta un peso molecular de 37 kDa como se observa en el ANEXO 1, el cual pertenece al grupo de buena calidad espermática.

Estos resultados son similares en dromedarios que presenta una intensidad de las bandas con peso molecular 28 kDa para AQP 3 (O'Brien et al., 2022), en porcinos también se reporta una banda de 25 kDa (Prieto et al., 2017), se identificaron bandas a 30 kDa en carneros y toros (Pequeño et al., 2024; Fujii et al., 2018); sin embargo, estos estudios fueron evaluados en forma grupal y en nuestro estudio fueron determinados en forma

individual, evaluando la resistencia a la congelación en función de la capacidad de los eyaculados para resistir la congelación.

En el MC3 se determinó la presencia de AQP3 mientras que el macho M-06 no, esto posiblemente esté relacionado a la variabilidad entre individuos ya que la expresión de la proteína se da durante la espermatogénesis por algunos genes en los testículos (Fuji et al., 2018). Pero esta expresión se ve supeditada a reguladores: quinasas y fosfatasas, así también factores de epigenética como metilaciones en el ADN, cabe recalcar que la actividad de las AQP está finamente regulada a diferencia de otros tipos celulares, los espermatozoides no poseen capacidad de síntesis proteica in novo, es así que la regulación de AQP-3 no puede depender de la expresión génica convencional si no que se encuentra afectada por la fosforilación y modificaciones postraduccionales de otras proteínas en el espermatozoide maduro (Li & Wang, 2017).

La variación en la funcionalidad de AQP 3 estarían sujetas a interacciones con otras proteínas como AQP 7 y AQP 11, los cuales comprenden los principales moduladores de osmorregulación en espermatozoides (Vicente et al., 2016). Asimismo, reguladores hormonales, ambientales y postraduccionales afecta en la activación, redistribución de las AQP, lo que afectaría su determinación mediante

técnicas moleculares, como es el caso de la testosterona regulador en la expresión génica de AQP 3 durante la espermatogénesis (Santiago-Moreno et al., 2022). La concentración de testosterona en individuos con un bajo libido como el caso de M-006 podría indicar la relación con la no detección de la AQP3 en espermatozoides. Además, se ha propuesto que las AQP están presentes en la membrana plasmática. Si el acrosoma se encuentra dañado, la membrana plasmática desaparece, lo que impide la presencia de las AQP (O'brien et al., 2022). En este sentido, el macho MC-03 presentó numéricamente la mayor integridad acrosómica, lo que explica su mayor expresión de AQP3.

Para algunas acuaporinas, se ha informado de una expresión específica de especies, aunque en estos casos no se han validado las identidades de las acuaporinas a nivel de ARNm o no se ha investigado la localización subcelular de los productos proteicos y, por lo tanto, las diferencias entre especies o individuo pueden estar relacionadas con la falta de especificidad y concentración de los anticuerpos empleados

Vicente et al. (2016) reporta en espermatozoides de verraco que el estrés osmótico asociado con la descongelación desencadena la redistribución de AQP-7, lo cual refuerza la hipótesis que los cambios de localización observados disminuyen la funcionalidad de la proteína y por

ende su detección por inmunodetección (anticuerpos) se ve más comprometida.

Por otro lado, O'brien et al. (2022) en dromedarios, trabajaron según individuo e identificaron tanto en fresco y post-congelación la AQP3 podría estar en diferentes localizaciones de la membrana de los espermatozoides, con distintos patrones de distribución en el acrosoma, la región post-acrosoma, la pieza intermedia y la pieza final de la cola. Por lo tanto, se requieren más análisis para comprender mejor los detalles detrás de estas diferencias con respecto a los resultados, en muchos casos existe variabilidad individual, pero existe una fuerte asociación en diversas especies con parámetros espermáticos viables post-congelación y la presencia de la AQP3 (Prieto et al., 2017; Fuji et al., 2018).

Parámetros espermáticos de buena y mala calidad post congelación y su relación con la presencia de la acuaporina 3 en alpacas (*Vicugna pacos*)

En el grupo 1, los porcentajes de motilidad progresiva, viabilidad, integridad del acrosoma y funcionalidad fueron significativamente mayores que en el grupo 2. Sin embargo, hay que destacar, que uno de los individuos responde a la expresión de la acuaporina 3 en comparación con los demás machos, ya que sólo el macho MC-03 mostró la proteína.

Este individuo mostro superioridad en la mayoría de los parámetros evaluados en comparación con los demás, lo que explica la presencia de la AQP3. Los resultados encontrados por (Pequeño et al. 2024) estudios en carneros a la descongelación de semen, encontraron la presencia de acuaporina 3, sugiriendo que esta proteína podría utilizarse como biomarcador de criotolerancia.

Nuestros hallazgos demuestran que la AQP-3 participa funcionalmente sobre la motilidad total y progresiva, debido a que se ha localizado la proteína en el acrosoma, la región postacrosómica, la pieza intermedia y la pieza principal o final de la cola (O'Brien et al., 2022), influyendo en la generación de ATP mitocondrial durante a cinética espermática, lo que indicaría una mejor motilidad total y progresiva.

En cuanto a los parámetros de integridad funcional se reporta que la AQP-3 juega un papel en la regulación del volumen celular frente a cambios osmóticos extremos, en mecanismos moleculares en conjunto con otras proteínas (AQP 7, vasopresina) (Prieto-Martínez et al., 2016). En cuanto a la viabilidad, aunque las diferencias fueron menos marcadas, se observó una tendencia positiva en presencia de AQP-3, lo que sugiere un efecto protector adicional durante el proceso criogénico.

Del mismo modo, Prieto et al. (2017), en porcinos, sugirieron que AQP3 está asociada con la criosupervivencia espermática del verraco. En toros, también se ha observado una relación entre la resistencia a la congelación y la expresión de AQP3, lo que podría hacer de estas proteínas marcadores de congelabilidad (Prieto-Martínez et al., 2016). Además, Fujii et al. (2018) demostraron que las cantidades de AQP3 variaban entre los eyaculados de toro y que esta variabilidad se relacionaba positivamente con la motilidad de los espermatozoides.

Esta diferencia podría estar relacionada con la limitada cantidad de muestras y el número de repeticiones, ya que se sabe que esta especie produce un volumen y concentración de esperma menores en comparación con otras especies.

Para aumentar el poder estadístico, sería necesario incrementar la muestra y las repeticiones. Aunque nuestros hallazgos brindan información valiosa sobre la expresión de AQP-3 en espermatozoides de alpacas, es necesario diseñar más experimentos para comprender mejor el papel de AQP-3 y otras acuaporinas en la congelabilidad del esperma de esta especie, además sería necesario relacionarlo con la fertilidad.

CONCLUSIONES

1. Existe una asociación entre la presencia de la acuaporina 3 y, parámetros espermáticos de buena calidad post-congelación con un nivel de significancia $p=0,04$.
2. Se identificó la acuaporina 3 en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*), tanto en muestras frescas como post-congelación. La proteína estuvo presente en un solo animal (1/4; 25%) del total estudiado, el cual pertenecía al grupo de buena calidad seminal (donde representó el 50%, 1/2 de los individuos).
3. La identificación de la acuaporina 3 se relaciona favorablemente con los parámetros espermáticos de buena calidad post-congelación en espermatozoides de alpaca.

RECOMENDACIONES

1. Contar con mayor número de muestras de estudio, lo que permitiría obtener resultados más concluyentes y estadísticamente robustos, para determinar la influencia de la acuaporina 3 en la fertilidad de alpacas.
2. Profundizar en los mecanismos moleculares mediante los cuales AQP3 podría estar favoreciendo la integridad espermática tras la descongelación, por ejemplo, mediante estudios de expresión génica o proteómica, efectuar estudio de inmunofluorescencia para la localización de la acuaporina 3 en el espermatozoide de alpaca.
3. Realizar más estudios moleculares para investigar la presencia y posible papel de otras isoformas de acuaporinas (como AQP11, AQP7 o AQP9) en espermatozoides de alpaca, para evaluar si también se relacionan con la resistencia a la criopreservación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agre, P. (2004). Aquaporin water channels (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 43(33), 4278–4290.
<https://doi.org/10.1002/anie.200460804>
- Antonini, M., Gonzales, M., & Valbonesi, A. (2004). Relationship between age and postnatal skin follicular development in three types of South American domestic camelids. *Livestock Production Science*, 90(2-3), 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.06.001>
- Bonilla, S., Noto, F., Garcia, E., Rodríguez, J., Yeste, M., & Miro, J. (2017). First evidence for the presence of aquaporins in stallion sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 61–64.
<https://doi.org/10.1111/rda.13059>
- Bravo, P., Skidmore, J., & Zhao, X. (2000). Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science*, 62, 173–193. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00157-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00157-7)
- Buendía, P., Soler, C., Paolicchi, F., Gago, G., Urquieta, B., Pérez, F., & Bustos, E. (2002). Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm-class analyzer computer-

assisted system. *Theriogenology*, 57(4), 1207-18.
[https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00724-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00724-5)

Cebra, C., Van Saun, R., Anderson, D., Tibary, A., & Johnson, L. (2013). *Llama and alpaca care: Medicine, surgery, reproduction, nutrition, and herd health (1st ed.)*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2352-6.00066-3>

Chen, Q., Peng, H., Lei, L., Zhang, Y., Kuang, H., Cao, Y., Shi, Q., Ma, T., & Duan, E. (2011). Aquaporin3 is a sperm water channel essential for postcopulatory sperm osmoadaptation and migration. *Cell Research*, 21(6), 922–933. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.169>

Delgado, A., Ribas, J., & Yeste, M. (2022). Relevance of aquaporins for gamete function and cryopreservation. *Animals*, 12(5), 573. <https://doi.org/10.3390/ani12050573>

Delves, P., Martin, S., Burton, D., & Roitt, I. (2017). *Roitt's essential immunology*. Wiley.

Domeniconi, R., Orsi, A., Justulin, L., Beu, C., & Felisbino, S. (2007). Aquaporin 9 (AQP9) localization in the adult dog testis excurrent

ducts by immunohistochemistry. *Anatomical Record*, 290(12), 1519–1525. <https://doi.org/10.1002/ar.20611>

Eslami, A., & Lujan, J. (2010). Western blotting: Sample preparation to detection. *Journal of Visualized Experiments*(44), e2359. <https://doi.org/10.3791/2359>

Fujii, T., Hirayama, H., Fukuda, S., Kageyama, S., Naito, A., Yoshino, H., Moriyasu, S., Yamazaki, T., Sakamoto, K., Hayakawa, H., Takahashi, K., Takahashi, Y., & Sawai, K. (2018). Expression and localization of aquaporins 3 and 7 in bull spermatozoa and their relevance to sperm motility after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(4), 788–795. <https://doi.org/10.1111/rda.13164>

Fumuso, F. G., Chaves, G., Neild, D., Miragaya, M., Bertuzzi, M., & Carretero, M. (2020). Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. *Andrologia*, 52(6), e13597. <https://doi.org/10.1111/and.13597>

Fumuso, F., Bertuzzi, M., Velásquez, N., Miragaya, M., & Carretero, M. (2021). Cryopreservation of llama semen using a combination of permeable cryoprotectants. *Reprod Domest Anim*, 56(7), 958-964. <https://doi.org/10.1111/rda.13937>

Galina, C. (2008). *Reproducción de Animales Domésticos*. México: Editorial LIMUSA.

Galina, C., & Valencia, J. (2025). *Reproducción de Animales Domésticos*. LIMUSA.

García, W., Alarcón, V., & Bravo, P. (2017). Inseminación artificial de alpacas con semen refrigerado y con inclusión de dos tipos de yema de huevo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(2), 337–344. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13080>

Giuliano, S., Chaves, M., Trasorras, V., Gambarotta, M., Neild, D., Director, A., Pinto, M., & Miragaya, M. (2012). Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Anim Reprod Sci*, 131(3-4), 204-210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.010>

Grayson, P., Tajkhorshid, E., & Schulten, K. (2003). Mechanisms of selectivity in channels and enzymes studied with interactive molecular dynamics. *Biophysical Journal*, 85(1), 36–48. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74452-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74452-X)

Hafez, B., & Hafez, E. (2002). *Reproducción en animales domésticos*.

Kiawah Island, South Carolina, USA: Editorial Interamericana,
McGRAW-HILL.

Hernández, R. (2014). *Metodología de la Investigación*. Mexico: Mc Graw
Hill Education.

Huang, H., He, R., Sun, C., Zhang, Y., Meng, Q., & Ma, Y. (2006). Function
of aquaporins in female and male reproductive systems. *Human
Reproduction Update*, 12(6), 785–795.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dml035>

Kershaw, C., & Maxwell, W. (2012). Seminal plasma components in
camelids and comparisons with other species. *Reproduction in
Domestic Animals*, 47(4), 369–375. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02100.x>

Kreida, S., & Törnroth-Horsefield, S. (2015). Structural insights into
aquaporin selectivity and regulation. *Curr Opin Struct Biol*, 33, 126-
34. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.08.004>

Kruse, E., Uehlein, N., & Kaldenhoff, R. (2006). The aquaporins. *Genome
Biology*, 7(2), 206. <https://doi.org/10.1186/gb-2006-7-2-206>

- Li, C., & Wang, W. (2017). Molecular biology of aquaporins. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, 969, 1–34. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1057-0_1
- Madeira, A., Fernández-Veledo, S., Camps, M., Zorzano, A., Moura, T., Ceperuelo-Mallafre, V., Vendrell, J., & Soveral, G. (2014). Human aquaporin-11 is a water and glycerol channel and localizes in the vicinity of lipid droplets in human adipocytes. *Obesity*, 22(9), 2010–2017. <https://doi.org/10.1002/oby.20792>
- Malo, C., Crichton, E., & Skidmore, J. (2020). Preservation of the spermatozoa of the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) by chilling and freezing: The effects of cooling time, extender composition and catalase supplementation. *Theriogenology*, 15, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.043>
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, 247(3), C125–C142.
- Michalek, K., & Oberska, P. (2023). Aquaporins in the male reproductive system: A chance for paternity or a road to nowhere? *Andrology*, 11(6), 970–972. <https://doi.org/10.1111/andr.13374>

Morató, R., Prieto-Martínez, N., Muiño, R., Hidalgo, C., Rodríguez-Gil, J., Bonet, S., & Yeste, M. (2018). Aquaporin 11 is related to cryotolerance and fertilising ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(8), 1099–1108. <https://doi.org/10.1071/RD17340>

Moretti, E., Terzuoli, G., Mazzi, L., Iacoponi, F., & Collodel, G. (2012). Immunolocalization of aquaporin 7 in human sperm and its relationship with semen parameters. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(3), 129–135. <https://doi.org/10.3109/19396368.2011.644385>

O'Brien, E., Malo, C., Castaño, C., García, P., Toledano, A., Martínez, B., Rodríguez, H., Álvarez, M., & Santiago, J. (2022). Sperm freezability is neither associated with the expression of aquaporin 3 nor sperm head dimensions in dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*, 189, 230–236. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.06.029>

Pellavio, G., & Laforenza, U. (2021). Human sperm functioning is related to the aquaporin-mediated water and hydrogen peroxide transport

regulation. *Biochimie*, 188, 45-51.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.05.011>

Pequeño, B., Millán, M., Castaño, C., Toledano, A., Esteso, M., Alba, E., Arrebola, F., Ungerfeld, R., Martínez, B., Alvarez, M., Rodríguez, H., & Santiago, J. (2024). Cooling rate modifies the location of aquaporin 3 in spermatozoa of sheep and goat. *Theriogenology*, 223, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.04.008>

Perez, J., Soto, G., Alleva, K., Jozefkiewicz, C., Amodeo, G., Muschietti, J., & Ayub, N. (2014). Prediction of aquaporin function by integrating evolutionary and functional analyses. *Journal of Membrane Biology*, 247(2), 107–125. <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9618-8>

Prieto, N., Morató, R., Muiño, R., Hidalgo, C., Rodríguez, J., Bonet, S., & Yeste, M. (2017). Aquaglyceroporins 3 and 7 in bull spermatozoa: Identification, localisation and their relationship with sperm cryotolerance. *Reproduction Fertility and Development*, 29(6), 1249–1259. <https://doi.org/10.1071/RD16077>

Prieto, N., Morató, R., Vilagran, I., Rodríguez, J., Bonet, S., & Yeste, M. (2017). Aquaporins in boar spermatozoa. Part II: Detection and

localisation of aquaglyceroporin 3. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(4), 703–711. <https://doi.org/10.1071/RD15164>

Prieto, N., Vilagran, I., Morató, R., Rivera, M., Rodríguez, J., Bonet, S., & Yeste, M. (2017). Relationship of aquaporins 3 (AQP3), 7 (AQP7), and 11 (AQP11) with boar sperm resilience to withstand freeze–thawing procedures. *Andrology*, 5(6), 1153–1164. <https://doi.org/10.1111/andr.12410>

Prieto, N., Vilagran, I., Morató, R., Rodríguez, J., Yeste, M., & Bonet, S. (2016). Aquaporins 7 and 11 in boar spermatozoa: Detection, localisation and relationship with sperm quality. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(6), 663–672. <https://doi.org/10.1071/RD14237>

Ratto, M., Johnson, W., Silva, M., Morrell, J., & Abraham, M. (2020). Semen handling in South American camelids: State of the art. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 586858. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.586858>

Ribeiro, J., Alves, M., Yeste, M., Cho, Y., Calamita, G., & Oliveira, P. (2021). Aquaporins and (in)fertility: More than just water transport.

Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 1867(3), 166039. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166039>

Saito, K., Kageyama, Y., Okada, Y., Kawakami, S., Kihara, K., Ishibashi, K., & Sasaki, S. (2004). Localization of aquaporin-7 in human testis and ejaculated sperm: Possible involvement in maintenance of sperm quality. *Journal of Urology*, 172(5), 2073–2076. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000141499.08650.ab>

Sales, A., Lobo, C., Carvalho, A., Moura, A., & Rodrigues, A. (2013). Structure, function, and localization of aquaporins: Their possible implications on gamete cryopreservation. *Genetics and Molecular Research*, 12(4), 6718–6732. <https://doi.org/10.4238/2013.december.13.5>

Salkie, M. (1996). A retrospective study of the relative utility of electrophoresis, immunoelectrophoresis, immunofixation, and nephelometry in the investigation of serum proteins. *Clinical Biochemistry*, 29(1), 39–42. [https://doi.org/10.1016/0009-9120\(95](https://doi.org/10.1016/0009-9120(95)

Santiago, J., Pequeño, B., Martínez, B., Castaño, C., Bóveda, P., Velásquez, R., Toledano, A., Álvarez, M., & Rodríguez, H. (2022). Expression of aquaglyceroporins in spermatozoa from wild

ruminants is influenced by photoperiod and thyroxine concentrations.
International Journal of Molecular Sciences, 23(6), 2903.
<https://doi.org/10.3390/ijms23062903>

Santiani, A., Huanca, W., Sapaná, R., Huanca, T., Sepúlveda, N., & Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology*, 7(3), 303–309.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x>

Vicente, A., Ekwall, H., Álvarez, M., & Rodríguez, H. (2016). Membrane stress during thawing elicits redistribution of aquaporin 7 but not of aquaporin 9 in boar spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 665–679. <https://doi.org/10.1111/rda.12728>

Yeste, M., Morató, R., Rodríguez, J., Bonet, S., & Prieto, N. (2017). Aquaporins in the male reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 12–27. <https://doi.org/10.1111/rda.13082>

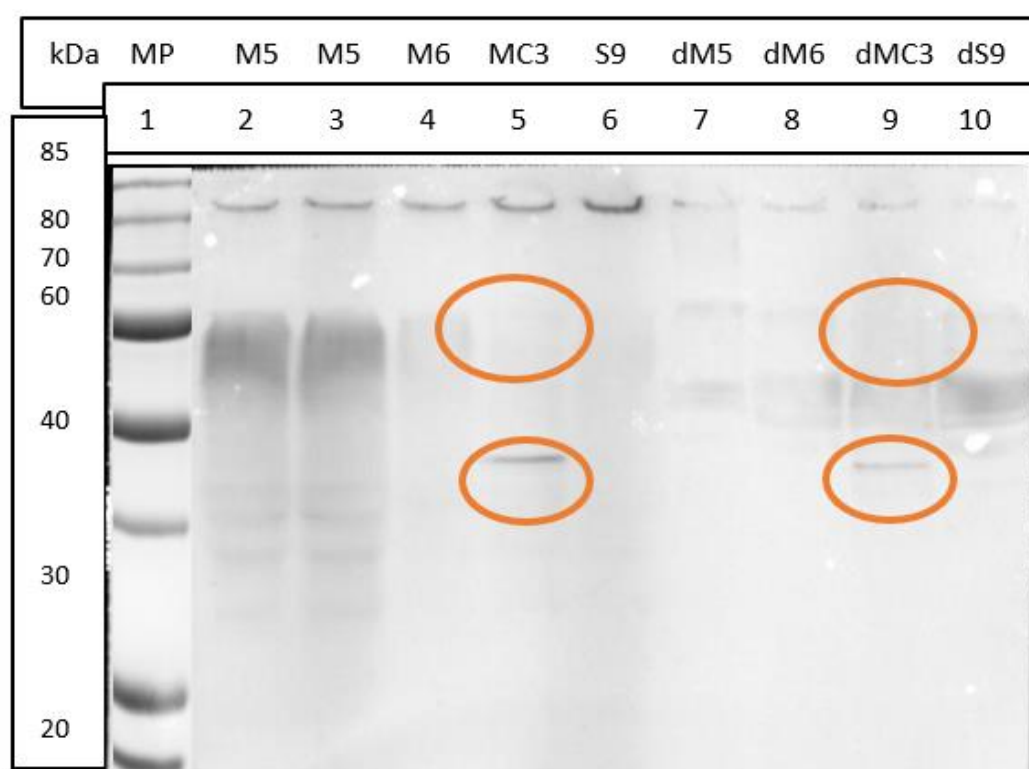
Yeung, C., & Cooper, T. (2010). Aquaporin AQP11 in the testis: Molecular identity and association with the processing of residual cytoplasm of

elongated spermatids. *Reproduction*, 139(1), 209–216.

<https://doi.org/10.1530/REP-09-0298>

ANEXOS

Anexo 1. Figura de las bandas de electroforesis correspondientes a la acuaporina 3



Western Blot AQP3, carril 1: marcador de peso molecular, carril 2: control interno (M5), carriles 3-6: muestras frescas (60ug) y carriles 7-10: muestras descongeladas (60ug). En la muestra fresca y descongelada del MC3 se observa las bandas de migración de AQP3 con un peso de 37 kDa. Fuente propia.

Anexo 2. Análisis estadístico

Prueba Test-fisher

AQP3 Ausente Presente

GRUPO

Buena calidad 3 3

Mala calidad 6 0

> summary(tabla_1)

Call: xtabs(formula = ~GRUPO + AQP3, data = q3)

Number of cases in table: 12

Number of factors: 2

Test for independence of all factors:

Chisq = 4, df = 1, **p-value = 0,0455**

> assocstats(tabla_1)

X² df P(> X²)

Likelihood Ratio 5,1783 1 0,022871

Pearson 4,0000 1 0,045500

Phi-Coefficient : 0,577

Contingency Coeff.: 0,5

Cramer's V : 0,577

Anexo 3. Cuadro de los parámetros espermáticos post-congelación

Parámetros espermáticos post-congelación					
ARETE	M.T.	M.P.	VIABILIDAD	ACROSOMA	HOST
M6	15,2	101,4	24,80	14,20	15,00
M6	14,7	8,8	26	10	12,5
M-6	17,2	8,5	27,5	9,8	13
M-6	17,5	9,5	22,6	9,3	12
M-6	14,2	7,2	26,8	9	10,3
Promedio	15,76	8,88	25,54	10,46	12,56
MC3	20	11,1	17,2	15	16,5
Mc3	23	12,3	18,00	16	16,6
MC-3	19,00	10	17,80	12,00	14,90
MC-3	18	11	19,00	17,00	17,90
MC-3	22	13	18	15	17
Promedio	20	11,1	18	15	16,58
M-5	6,6	1	12	8	14,5
M-5	8,5	2	14	9	13,8
M-5	5,8	0,8	11,8	7,9	15
M-5	7,3	1,2	11	8	16,8
M-5	5,1	1,1	11	7,1	15
Promedio	6,66	1,22	11,96	8	15,02
s-9	9	4,5	24,60	7,50	14,00
S-9	10	5,3	22	6,5	13,3
S-9	10,5	5	22,6	6	13
S-9	11	3,8	20,00	8	12
S-9	8	6,7	21	7	14,2
Promedio	9,7	5,06	22,04	7	13,3

Anexo 4. Fotografías

Panel Fotográfico





