

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SEGUNDA ESPECIALIDAD



“EFECTO DE TRES NIVELES DE CONGELAMIENTO DE
ESPERMATOZOIDES DEL CONDUCTO DEFERENTE EN
ALPACAS (*Vicugna pacos*)”

TESIS

PRESENTADA:

JULIO CÉSAR ARIZÁBAL GUZMÁN

PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

SEGUNDA ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE LA
REPRODUCCIÓN ANIMAL

PUNO – PERU

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

SEGUNDA ESPECIALIDAD



“EFECTO DE TRES NIVELES DE CONGELAMIENTO DE
ESPERMATOZOIDES DEL CONDUCTO DEFERENTE EN ALPACAS
(*Vicugna pacos*)”

TESIS

Presentada a la Coordinación de Investigación de la Segunda Especialidad de la Carrera Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, para optar el Título de Segunda Especialidad en Biotecnología de la Reproducción Animal.

APROBADA POR:

Presidente

:
Dr. Uberto Olarte Daza

Primer Miembro

:
M.Sc. Jesus Quispé Coaquira

Segundo Miembro

:
M.Sc. Hugo Vilcanqui Mamani

Asesor

:
Dr. Guido Pérez Durand

Puno, 15 de Abril del 2018

Puno – Perú

2019

INDICE

	Pag.
Resumen	05
Summary.	06
I. Introducción.....	07
II: REVISIÓN DE LITERATURA.	
2.1 Generalidades de la Anatomía del Aparato Reproductor del macho.	09
2.2 Característica Microscópicas del Semen.....	10
2.2.1 Concentración espermática.....	10
2.2.2 Motilidad.....	10
2.2.3 Vitalidad	11
2.2.4 Test hiposmótico.....	11
2.2.5 Integridad de acrosoma.....	12
2.3 Principios de la Crioconservación del de Semen.....	12
2.4 Tasas de Congelamiento de Semen.....	15
2.5 Congelamiento de Espermatozoides de Epidídimo.....	16
2.6 Congelamiento de Espermatozoides de Conducto Deferente.....	18
III: MATERIAL Y METODOS.	
3.1 Lugar de Estudio.....	21
3.2 Material Biológico.....	21
3.3 Diseño de la Investigación.....	21
3.4 Metodología.....	22
3.4.1 Congelación de Espermatozoides.....	22
3.4.2 Evaluación Microscópica.....	23

3.4.2.1 Prueba Hipo-osmótica.....	23
3.4.2.2 Motilidad Total.....	24
3.4.2.3 Motilidad Progresiva.....	24
3.4.2.4 Vitalidad.....	25
3.4.2.5 Integridad de Acrosoma.....	26
3.4.3 Preparación del Dilutor.....	27
3.4.4 Enfriamiento de los Espermatozoides.....	28
3.4.5 Fraccionamiento de los Espermatozoides en Pajillas.....	28
3.4.6 Congelamiento en Vapores de Nitrógeno Líquido.....	29
3.4.7 Descongelado de la Dilución de Espermatozoides.....	30
3.4.8 Evaluación de los Espermatozoides al descongelado.....	30
3.4.9 Método Estadístico.....	31
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
4.1 Pre congelamiento.....	32
4.2 Motilidad Total.....	33
4.3 Motilidad Progresiva.....	35
4.4 Vitalidad.....	36
4.5 Test Hiposmótico.....	37
4.6 Integridad de Acrosoma.....	38
V. CONCLUSIONES.....	41
VI. RECOMENDACIONES.....	42
VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS.	

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad nacional del Altiplano, a 3823 msnm. Tiene el propósito principal la evaluación del efecto de tres niveles de congelamiento de espermatozoides del conducto deferente en Alpacas (*Vicugna pacos*). Dos machos reproductores, de la raza Huacaya fueron utilizados como donadores de espermatozoides. Se realizaron congelamiento de una dilución de espermatozoides de conducto deferente a tres diferentes niveles (3, 5 y 7 cm) por encima de la superficie del nitrógeno líquido. Previamente se realizó un estudio de los espermatozoide a la pre congelación, de los siguientes parámetros: motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad, test hiposmótico e integridad de acrosoma. Seguidamente, se evaluaron estos mismos parámetros a la descongelación de tres niveles de congelación (3,5 y 7 cm), por encima de la superficie del nitrógeno líquido. Es el segundo nivel de congelación (5 cm por encima del nivel del nitrógeno líquido) es el que tuvo los mejores resultados a la descongelación: motilidad total 34 %, motilidad progresiva 23%, vitalidad 36%, test hiposmótico 31% e integridad de acrosoma 82%. Este sería el nivel más recomendable para el congelamiento de espermatozoides del conducto deferente en Alpacas.

Palabras clave: Célula germinal, epidídimo, preservación de espermatozoides.

SUMMARY

This research work was carried out in the Animal Reproduction Laboratory of the Faculty of Veterinary and Animal Medicine of the National University of the Altiplano, at 3823 meters above sea level. It Has the main purpose of evaluating the effect of three levels of sperm freezing of the vas deferens in Alpacas (*Vicugna pacos*). Two breeding males of the Huacaya breed were used as sperm donors. Freezing of a deferential duct sperm dilution at three different levels (3, 5 and 7 cm) Was made by oak from the surface of the liquid nitrogen. Previously, a study of sperm was performed. An evaluation of the sample Was made to the pre-freezing, of the following parameters: Total Motility, Progressive Motility, Vitality, Hiposmótico Test and Acrosome Integrity. Then, these same parameters were evaluated to the thawing of three Freezing Levels (3.5 and 7 cm), above the surface of the liquid nitrogen. It is the second level of freezing (5 cm above the liquid nitrogen level) that had the best defrosting results: Total Motility 34%, Progressive Motidad 23%, Vitality 36%, Hiposmótico Test 31% and Integrity of Acrosome 82%. This would be the most recommended level for sperm freezing of the vas deferens in Alpacas.

Key words: Germ cell, epididymis, preservation of spermatozoa.

I. INTRODUCCION

Se denomina criobiología al estudio de los procesos que ocurren durante la exposición de material biológico a temperaturas bajas (Hogan *et al.* 1994). La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas, por lo que es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde su colección, hasta su fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil (Choez 2010).

Esta preservación en frío se basa en el hecho de que en las reacciones metabólicas ocurren más lentamente a medida que desciende la temperatura; y se considera que por debajo de -140°C toda actividad biológica, prácticamente se detiene (Aisen, 2015). La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante la inseminación artificial han causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana, debido a que favorece el comercio de razas, formación de bancos de germoplasma, reserva genética y conservación de especies (Aller *et al.* 2003).

Los Camélidos sudamericanos, son los que más dificultades presentan a la colección y congelación exitosa de semen, por ser altamente viscoso; razón por la que se realiza la desviación quirúrgica del conducto deferente, técnica que elimina toda presencia de secreciones de las glándulas anexas (Bravo 1995, Paricahua 2001 y Quintano 2002).

En tal sentido, La alpaca (*Vicugna pacos*) es una especie muy valorada tanto en el plano económico como en el genético. Podemos mencionar que el proceso

de criopreservación que es una herramienta de preservación de materiales genéticos ricos y preciados como el de la alpaca, es tema central de varios proyectos de investigación, cuyos resultados no son los esperados principalmente para el poblador alto-andino quien es criador de esta especie, afectando negativamente los éxitos de muchos programas de inseminación artificial así como de las fecundaciones in vitro (Canorio 2008).

A la descongelación de espermatozoides del conducto deferente en Alpacas, se encontró una motilidad entre 24.51 y 33.18% y a la prueba hipo-osmótica un 20.06 y 32.18% (Pérez *et al.* 2016). Según Bravo *et al.* (1996), usando semen de Alpaca obtuvo un porcentaje de motilidad post congelamiento de 46.7 %. Santiani *et al.* (2005), reportó la obtención de motilidades post descongelamiento entre 4 a 20%.

Por estas consideraciones se realizó el presente trabajo de investigación, para lograr un protocolo de congelación con mayores índices de recuperación de células espermáticas colectadas del conducto deferente.

- Evaluar las características microscópicas (motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad, integridad de membrana y acrosoma), a la pre-congelación.
- Evaluar la sobrevivencia de los espermatozoides sometidos a la congelación/descongelación a tres niveles sobre la superficie del nitrógeno líquido; a través de la motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad, integridad de membrana y acrosoma.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1 Generalidades de la Anatomía de Aparato Reproductor del Macho.

2.1.1 Testículo.

Los testículos en los Camélidos Sudamericanos tienen una forma ovoide-redondeada y están ubicados en una posición bastante particular, a la altura de la tuberosidad isquiática y con la base dirigida hacia la zona caudal. Están recubiertos por un escroto cuya piel no es muy flácida y el tamaño en un individuo adulto es: polo mayor 4 cm, el ancho es de aproximadamente 2.5 cm (chato o aplastado). Los testículos quedan ocultos por la cola cuando el animal la tiene baja y representan la única forma precisa de identificación de los sexos dado el escaso dimorfismo sexual que presentan estos animales. Aún en el individuo adulto presentan bastante movilidad, moviéndose hacia adelante y abajo en diversas circunstancias y desapareciendo del escroto, sin que esto signifique una posición anormal (Morton *et al.* 2008).

2.1.2 Glándulas Anexas.

Las glándulas anexas al aparato reproductor masculino de los Camélidos son: glándulas bulbo-uretrales, glándulas uretrales, próstata y epidídimo. Este último resulta difícil de palpar en el animal sano ya que se encuentra entre el testículo y el cuerpo y es aplanado en sentido caudo-craneal. Las funciones del epidídimo son fundamentalmente de almacenamiento de espermatozoides y el aporte de sustancias al plasma seminal y una sustancia compleja llamada "factor de discapacitación" que contribuye a facilitar la viabilidad del espermatozoide almacenado (la hembra posee el factor de capacitación; en los oviductos). Las otras

glándulas anexas también contribuyen a la formación del plasma seminal y se destaca la ausencia de la vesícula seminal en esta especie animal. La próstata tiene forma de T o de "silla de montar" y las bulbo-uretrales son dos promontorios ubicados a la altura de la tuberosidad isquiática (Morton *et al.* 2008).

2.1.3 Conducto deferente.

El conducto deferente es un órgano que se inicia en la cola de epidídimo y finaliza en la uretra pelviana, la cual llega a la cavidad abdominal. Posee dos porciones: una anterior delgada, en su inicio de 2 mm de diámetro que continúa a la cola del epidídimo, libre de glándulas corresponde al conducto deferente y otra porción posterior cerca de la uretra con un grosor de 4 mm y de aspecto glandular (Fernández-Baca 1991).

2.2 Características Microscópicas del Semen.

2.2.1 Concentración espermática.

Viene a ser el número de espermatozoides por unidad de volumen de semen (Salisbury *et al.* 1982).

En Alpacas con desviación de los conductos deferentes reportan diferentes concentraciones, con un promedio de 515.0×10^4 esp/mm³ (Paricahua 2001), con $23,87 \times 10^4$ esp/mm³ (Quintano 2002) y $25,53 \times 10^4$ esp/mm³ (Deza 2004).

2.2.2 Motilidad.

Los espermatozoides, son células con un solo objetivo de penetrar al óvulo, la capacidad de movilidad progresiva se desarrolla a medida que el espermatozoide madura, los espermatozoides tienen un aparato de propulsión llamado

flagelo, compuesto por proteínas contráctiles que se halla en órganos longitudinales y fibras burdas que proporcionan la fuerza propulsiva necesaria para vencer la resistencia estructural interna y externa, dada por la viscosidad de los líquidos, el flagelo propaga ondas sinusoides repetitivas en ciclos alternos de contracción-relajación (Hafez 1989).

La motilidad lograda a través de la desviación de los conductos deferentes reportan una motilidad individual del 64.81% al 67.37 % (Quintano 2002) y 71.89 % (Deza 2004).

2.2.3 Vitalidad.

Las tinciones permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos, así la cabeza de los espermatozoides muertos tiene la propiedad de dejar pasar los colorantes por perturbación de la membrana cefálica (Lubos 1983).

En algunas investigaciones con espermatozoides de alpacas procedentes de los conductos deferentes hallaron para la vitalidad un 58.99% (Paricahua 2001) y de 41.75 al 86.25% (Quintano 2002).

2.2.4 Test hiposmótico.

Está basado en la presión osmótica del espermatozoide, en su interior la presión osmótica es de 325 Osm/Kg el introducir el semen en una solución de 100 mOsm/Kg, la diferencia de presión entre el medio y el espermatozoide hará que libere líquido para igualar la presión osmótica, produciéndose así un enrollamiento del flajelo sobre si mismo, pudiéndose valorar microscópicamente la cantidad de espermatozoides vivos. Los muertos permanecen intactos, ya que al tener rota la membrana protectora, no libera líquido al medio y quedan con el flagelo sin enrollar (Jiménez 1994).

Se considera normal la prueba cuando más del 60% de espermatozoide presentan hinchamiento de la cola después del test hiposmótico en espermatozoides recién colectados (Gonzales 1998).

2.2.5 Integridad de acrosoma.

El acrosoma es una organela membranosa de doble capa ubicada en la parte apical de la cabeza espermática, que contiene distintas enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina. La determinación de la Integridad acrosomal es uno de los parámetros espermáticos de importancia debido a su papel en la reacción acrosomal. La reacción acrosomal es un proceso exocitótico que consiste en la fusión del acrosoma con la membrana plasmática, resultando en la exposición y liberación del contenido acrosomal al medio extracelular, permitiendo que se realice la fecundación del ovocito. La liberación del contenido acrosomal se lleva a cabo cuando el espermatozoide entra en contacto con mecanismos de señalización que se encuentra en la zona pelúcida y esta mediado por la progesterona, además de estar regulado por el incremento intracelular del calcio (Harrison 1998).

En una evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo, se encontró que el promedio porcentual de espermatozoides vivos fue de 63.38%, espermatozoides con integridad acrosomal 95.19% y espermatozoides vivos con integridad acrosomal de 61.13% (Ugarelli *et al.* 2017).

2.3 Principios de la Crioconservación de Semen.

El espermatozoide fue una de las primeras células en las cuales se aplicó con éxito la congelación profunda. El objetivo principal de la criopreservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a -130°C para detener completamente los procesos metabólicos

(Medeiros *et al.* 2002). La supervivencia a la congelación es el producto de numerosos factores que interaccionan entre sí (Boiso 2001).

La criopreservación de cualquier material biológico se efectúa indispensablemente dentro de una solución que otorgue propiedades físico- químicas favorables para la sobrevivencia durante la congelación y descongelación (Vila 1984). Cuando la suspensión alcanza temperaturas entre -5 y -10°C se forman núcleos de hielo, que se distribuyen aleatoriamente en el medio extracelular. La membrana plasmática del espermatozoide constituye una barrera que detiene la formación de hielo dentro de la célula (Vila y García 1983, Holt 2000).

La cristalización en el medio extracelular da lugar a hielo puro, dejando los solutos progresivamente más concentrados en la fracción líquida. Este proceso recibe el nombre de crioconcentración. La fracción líquida se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata (Boiso 2001). El punto eutéctico refleja la máxima concentración de solutos que puede alcanzarse justo antes de que el agua y los solutos se solidifiquen conjuntamente (Grossmann y Santaló 1991).

Cuando la temperatura baja hasta alcanzar el punto eutéctico, la fracción no congelada y los solutos se solidifican (Vila y Carretero 1985). Al ocurrir la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación. Esto eleva transitoriamente la temperatura de la solución. Este proceso de aumento y disminución rápida de la temperatura es perjudicial para las células (Boiso 2001).

Mientras se produce la congelación de una suspensión celular ocurren cambios en los medios intra y extracelulares. Al comienzo, parte del agua extracelular se congela, y el medio circundante

aumenta su concentración. El medio interno permanece aún sin congelar, dado que la membrana plasmática actúa como una barrera ante la propagación del hielo. Puesto que el punto de congelación de una solución disminuye a medida que aumenta su concentración osmolar, este medio permanece todavía en estado líquido, pero con mayor proporción de solutos. Esta condición de hipertonidad causa una salida de agua intracelular (que se congela en el exterior) por diferencia de presión osmótica, deshidratando a la célula. Para el caso de los espermatozoides, al prolongarse esta condición, puede disminuir bruscamente la sobrevivencia de los mismos debido a la elevada concentración de solutos, cambios de pH, precipitación de sales y proteínas. Si la velocidad de congelación es alta, no se produce el efecto de solución mencionado, pero el agua intracelular no abandona la célula, congelándose en forma de grandes cristales de hielo. Si la velocidad de congelación es baja, no se producirá la formación de cristales grandes de hielo intracelular, pero, se comprometerá la vida celular por aumento de la concentración de solutos en el citoplasma (Aisen 2015).

La velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente (Boiso 2001). Consecuentemente, se produce una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur 1984).

Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiendo llegar al colapso celular (Boiso 2001). La deshidratación severa produce la desnaturalización de macromoléculas y una reducción excesiva del

tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática (Mazur 1984).

Por tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones hiper-osmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular. La supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es específica para cada tipo celular (Holt 2000). La velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular (Kumar *et al.* 2003).

2.4 Tasas de Congelación de Semen.

A medida que la tasa de enfriamiento aumenta, la probabilidad de que el hielo intracelular pueda formarse también aumenta. Para cada célula hay una óptima tasa de enfriamiento la cual depende de varios factores, particularmente el volumen celular y la composición de la membrana (Avila-Portillo 2006).

Es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen entre 30 °C y 0°C induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperaturas, debe ser realizado cuidadosamente (Watson, 1995). Un enfriamiento lento induce estrés sobre la membrana del espermatozoide. Este hecho se relacionaría con un cambio de la fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana (Crowe 1989). El shock de frío es causado por un cambio de fase de los lípidos de la membrana. El estrés de la membrana puede continuar por debajo de 0°C sin que el cambio de fase sea completo a 0°C, sin embargo es conocido que los cambios de fase ocurren en su mayoría entre los 5°C y 15°C (Dobrins 1993).

Se ha demostrado la importancia de la composición lipídica del medio ambiente donde se encuentra la membrana plasmática durante el enfriamiento, esto relaciona al componente lipídico en el mecanismo de injuria (Watson 1981).

En un estudio, sobre la influencia de las tasas de congelamiento de los espermatozoides bovinos envasados en pajillas de 0,25 y 0,5 ml; determinaron que la tasa de enfriamiento tenía poca influencia en la recuperación del post-deshielo en las pajillas de 0,5 ml. Sin embargo, en las pajillas de 0,25 ml mejoraron la recuperación post-deshielo. Así cuando congelaron en vapores de nitrógeno de -140°C, -110°C y -80°C y en pajillas de 0,25 o 0,5 ml con medios tales como yema de huevo-citrato, yema de huevo-TRIS y leche descremada obtuvieron los resultados siguientes: a -140 °C para leche descremada, 27.2% (0.25 ml) y 28.1% (0.5 ml), para yema de huevo-citrato a 33.3% (0.25 ml) y 39.2% (0.5 ml) y yema de huevo-TRIS 44.7% (0.25 ml) y 52.2% (0.5 ml); a -110 °C para leche descremada, 26.7% (0.25 ml) y 26.9% (0.5 ml), para yema de huevo-citrato a 34.7% (0.25 ml) y 46.4% (0.5ml) y yema de huevo-TRIS 49.7% (0.25 ml) y 51.7% (0.5 ml); a -80 °C para leche descremada, 28.5% (0.25 ml) y 26.7% (0.5ml), para yema de huevo-citrato a 38.9% (0.25 ml) y 36.9% (0.5 ml) y yema de huevo-TRIS 50.8% (0.25 ml) y 51.9% (0.5 ml) (Senger *et al.* 2009).

En Vacunos mediante vapor de nitrógeno líquido ($N_{2(liq)}$) a una temperatura de congelación de -120°C, las pajuelas se sumergen en el nitrógeno líquido para alcanzar una temperatura definitiva de -196°C. Este proceso tarda entre 10 y 30 minutos (Souza 2013).

2.5 Congelamiento de Espermatozoides de Epidídimo.

Cuando se pretenden congelar y descongelar gametos de un macho, es importante considerar las diferencias que existen entre

los espermatozoides del eyaculado y los que son extraídos del epidídimo, tanto morfológico como funcional; tales diferencias, en el momento de la congelación, pueden influir en la estabilidad de la membrana frente al choque térmico y a la presión osmótica. Por lo tanto los métodos empleados para criopreservar espermatozoides eyaculados no son convenientes para ser usados con los espermatozoides obtenidos del epidídimo, a menos que sean añadidos componentes similares a los encontrados dentro del epidídimo, en la solución de congelamiento (Hewitt *et al.* 2001).

Al estudiar la viabilidad de espermatozoides de toros colectados del epidídimo, refrigerados a 4 °C, 24 horas después del sacrificio y encontraron resultados similares al de semen eyaculado. El promedio de la motilidad y del vigor espermático fue 60,2% y 3,1 respectivamente. El número promedio de espermatozoides colectados de la cola de los epidídimos fue de $1,7 \times 10^9$, siendo el mínimo de $0,26 \times 10^9$ y el máximo de $4,2 \times 10^9$. En cuanto a la morfología se obtuvo un promedio de 68,9% de espermatozoides normales, siendo el mínimo de 31,5% y el máximo de 89,3%, donde la mayoría de los defectos fueron gotas citoplasmáticas distales. Cuando se congelaron los espermatozoides obtenidos de los 4 epidídimos (2 toros), siendo que en 2 epidídimos los espermatozoides fueron colectados a las 6 horas y los dos restantes, a las 24 horas del sacrificio. En este análisis, los espermatozoides congelados 6 horas después del sacrificio se mantuvieron viables después de la descongelación (motilidad y vigor espermático de 50% y 3 respectivamente). Sin embargo, para los espermatozoides colectados 24 horas después del sacrificio los resultados fueron inferiores, con una motilidad de 10% y vigor 1 (Castro *et al.* 2009).

En otro estudio, en espermatozoide epididimales de vacunos sacrificados que estuvieron a temperaturas ambientales,

encontraron para concentración post-descongelación 357.5×10^6 ml y obtuvieron una motilidad progresiva post descongelación de 7.3%; para la prueba hipo-osmótica post-descongelación 24.21% (Nield *et al.* 2006).

En la congelación de espermatozoides del epidídimo de ciervos rojos, investigando los niveles de yema de huevo, glicerol y enfriamiento. Las muestras fueron empacadas en pajillas de 0.25 ml y congeladas por 10 min a 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido, donde el vapor del nitrógeno líquido estuvo a -120°C y con 20% de yema de huevo, 6% de glicerol y tasa de enfriamiento lento ($4.3^\circ\text{C}/\text{min}$), reportaron 51.2 % de motilidad total, vitalidad 66.7%. Host 52.8% (Fernandez-Santos *et al.* 2006).

Usando plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides epididimarios en equinos, se obtuvo una motilidad progresiva post-descongelación de 16.4%, valor muy por debajo de lo requerido para su uso en programas de inseminación Artificial (Mauricio *et al.* 2015).

Así se reportó el congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca, obteniendo 18% de motilidad y 80% de integridad acrosomal al descongelamiento; en tanto que Gonzales (2008) reporta una tasa de supervivencia de solo 5% con espermatozoides epididimarios de alpaca (Morton *et al.* 2008).

2.6 Congelamiento de Espermatozoides de Conducto Deferente.

En un estudio sobre criopreservación de semen obtenido del conducto deferente de bóvidos post-morten, se tuvo una motilidad progresiva de 40.8% y el 51.3% de viabilidad (Olivo-Zepeda *et al.* 2017).

Con el fin de coleccionar espermatozoides libres de la secreción de las glándulas anexas en alpacas, se desarrollaron las técnicas

de la desviación de los conductos deferentes y la extirpación de la próstata; la primera técnica intenta coleccionar espermatozoides directamente de su reservorio, la cola del epidídimo, sin que estos tengan contacto con las secreciones de las glándulas anexas, desviando quirúrgicamente los conductos deferentes hacia la región ventral del animal ó la cara interna del muslo, formando una fístula permanente en la piel desde donde se puedan coleccionar continuamente sin la necesidad de tener hembra receptiva ni someter a los espermatozoides a la acción de enzimas proteolíticas que intenten licuefactar el coágulo del eyaculado para un mejor manejo espermático (Paricahua 2001, Quintano 2002).

Sin embargo, es posible recuperar repetidamente espermatozoides de conductos deferentes desviados quirúrgicamente de alpacas y llamas macho y también facilitó la evaluación del volumen, concentración, motilidad, anormalidades y posterior criopreservación, logrando mayor a 20% de sobrevivencia espermática a la descongelación (Pérez *et al.* 2006).

Por otro lado, como alternativa de generar la tecnología de IA, se tiene la colección de espermatozoide por plastía de los conductos deferentes en forma temporal. Esta técnica vendría a cubrir parte de las expectativas que se pretende desarrollar la técnica de inseminación artificial el alpacas (Pérez *et al.* 2014).

En espermatozoides procedente de los conductos deferentes posterior a la congelación, al evaluar la acción de diferentes concentraciones de yema de huevo y de la glicerina, reportó valores a la descongelación para Alpacas diluido con el 10% de yema de huevo más 2.5, 5.0 y 7.5% de glicerina; fue de 22.5, 27.7 y 34.4% respectivamente; y con 20% de yema de huevo fue 31.4, 39.2 y 41.0% respectivamente; y con 30% de glicerina fue 32.4, 36.2 y 38.7% respectivamente. Para Llamas con 10% de yema de huevo fue de 20.0, 18.8, y 19.5% respectivamente; para el 20% de yema

de huevo fue 31.3, 35.8 y 28.2%; y para el 30% fue 34.6, 43.0 y 24.4% respectivamente (Deza 2004).

En otro estudio sobre viabilidad *in vitro* e *in vivo* de los espermatozoides congelados/descongelados del conducto deferente de alpacas, una motilidad de 24.5% y 33.2% para dos donadores diferentes, y la prueba hiposmótica de 20% y 32 %, respectivamente (Pérez *et al.* 2016).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Lugar de Estudio.

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, el cual se encuentra ubicado en la ciudad universitaria de la Universidad Nacional del Altiplano, a 3823 msnm; durante los meses de Junio y Julio.

3.2 Material Biológico.

Espermatozoides de Alpaca colectados de conducto deferente, en el laboratorio de Reproducción Animal de la UNA – Puno.

3.3 Diseño de la Investigación.

Tabla 1: Observaciones que se realizaron para la determinación de sobrevivencia de espermatozoides pre congelados y a diferentes niveles de congelamiento.

Variables \ Distancia Sobre N ₂	Pre/Cong	Congelamiento/Descongelamiento		
		3 cm	5 cm	7cm
Motilidad Total	100 Obs	100 Obs	100 Obs	100 Obs
Motilidad Progresiva	100 Obs	100 Obs	100 Obs	100 Obs
Porcentaje de vivos	100 Obs	100 Obs	100 Obs	100 Obs
Acrosoma	100 Obs	100 Obs	100 Obs	100 Obs
Test Hiposmótico	100 Obs	100 Obs	100 Obs	100 Obs

Dentro del proceso de congelamiento en vapores de nitrógeno líquido, la gradilla en donde se colocaron las pajillas, se colocó a 3, 5 y 7cm por encima de la superficie del nitrógeno.

Se observaron 5 pajillas para cada uno de los niveles de congelamiento.

3.4 Metodología.

3.4.1 Colección de Espermatozoides.

La colección de espermatozoides se realizó de acuerdo a la técnica recomendada por Pérez y col. (2014), ligeras modificaciones, describe en forma breve:

- La colección se realizó en sombra evitando la incidencia de rayos solares sobre los espermatozoides.
- Dos (02) machos reproductores, de la raza Huacaya, fueron usados como donadores de espermatozoides.
- El animal fue derribado y colocado en posición de cúbito lateral (derecha – izquierda), limpiando la zona de colección utilizando suero fisiológico, con la ayuda de una torunda de algodón, luego se secó la zona de colección.
- Seguidamente se realizaron masajes, aproximadamente desde la cola del epidídimo siguiendo la dirección de los conductos deferentes, facilitando la salida de los espermatozoides a través del conducto deferente.
- Las microgotas de espermatozoides se recogieron con un tips de 5 µl de capacidad adosados a una jeringa de tuberculina y se colocaron dentro los 0.5 ml de dilutor que estuvo dentro un tubo graduado y que a la vez estuvo protegido en baño de agua a una temperatura de 37°C.
- Para su evaluación y enfriamiento el tubo con los espermatozoides diluidos se transportaron a otro recipiente de 500 ml de capacidad y fueron colocados dentro una refrigeradora a 5°C por espacio de 3 h.
- Para la congelación se adicionó 0.5 ml de volumen de dilutor que contiene el 7% de glicerol y cada dosis se

ajustó a 20×10^6 de espermatozoides motiles en pajillas de 0.25 ml

- Se sellaron con Polivinilo de Cloruro, y se mantuvieron a 5°C por espacio de 45 min para su equilibrio.
- Para la congelación se utilizó el protocolo descrito por Soler et al. (2003).
 - Una vez empajillado los espermatozoides diluidos, las pajillas fueron colocadas equidistantes unas de otras en forma horizontal sobre la rejilla de congelación.
 - En una caja de tecnopor, se vertió $\text{N}_2(\text{liq})$ hasta una altura de 5 cm en el se encuentra la rejilla con las pajillas por un tiempo de 10 min.
 - Después se sumergen lentamente en el nitrógeno líquido.
- La descongelación de las pajillas se realizó a una temperatura de 37°C por espacio de 30 s.

3.4.2 Evaluación Microscópica

3.4.2.1 Prueba Hipo-osmótica.

La solución para la prueba hipo-osmótica se preparó con fructuosa (1351 mg) y citrato sódico (735 mg) disuelto en 100 ml de agua bidestilada, de acuerdo a lo descrito por Jeyendran et al. (1992). En un Termo con agua a 37°C , se colocó 1ml de solución hipo-osmótica, en un tubo de ensayo, posteriormente se añadió una gota de espermatozoides diluidos. Esta mezcla se dejó en incubación por un periodo de 30 min, para posteriormente hacer la lectura de 100 espermatozoides. Los espermatozoides con cola

enrollada, son los que reaccionaron positivamente al Test hipo-osmótico. La evaluación de la reacción hipo-osmótica de los espermatozoides se realizó a las 0 h (37°C), y a la descongelación con ayuda de un microscopio óptico Marca Leica a una magnificación de 40X, se contaron 100 espermatozoides por muestra.

Test Hiposmótico

$$\left(\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides con cola doblada}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de espermatozoides}} \right) \times \left(100 \right)$$

3.4.2.2 Motilidad Total

En láminas portaobjetos pre templadas a 37°C, se colocaron 10 µl de la dilución espermática y se visualizó en microscopio óptico a 40X para finalmente sacar un promedio del porcentaje de motilidad obtenido. Este procedimiento se realizó antes de la congelación y de manera separada e individual para cada muestra sometida a cada tratamiento. La lectura se realizó dividiendo el número de espermatozoides móviles, entre el número total de espermatozoides observados, para finalmente multiplicarlos por 100.

Motilidad Total

$$\left(\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides móviles}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de espermatozoides}} \right) \times \left(100 \right)$$

3.4.2.3 Motilidad Progresiva

En láminas portaobjetos pre templadas a 37°C, se colocaron 10 µl de la dilución espermática y se

visualizó en microscopio óptico a 40X para finalmente sacar un promedio del porcentaje de motilidad obtenido. Este procedimiento se realizó antes de la congelación y de manera separada e individual para cada muestra sometida a cada tratamiento. La lectura se realizó dividiendo el número de espermatozoides que cruzaron el campo, entre el número total de espermatozoides observados, para finalmente multiplicarlos por 100.

Motilidad Progresiva

$$\left(\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de espermatozoides q cruzan el campo}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de espermatozoides}} \right) \times \left(100 \right)$$

3.4.2.4 Vitalidad.

Para la determinación de espermatozoides vivos y muertos pre y post-descongelación se empleó la técnica descrita por Evans y Maxwell (1987), haciendo el uso de la tinción de Eosina-Nigrosina, para lo cual se usó un portaobjeto templado a 37 °C aproximadamente, otro portaobjeto para realizar el frotis y un microscopio, procediéndose de la siguiente manera:

- En el extremo del portaobjeto, se colocó 10 µl de dilución espermática, y 10 µl de Eosina al 2 % + 10 µl Nigrosina al 1%, se homogenizó.
- Se procedió a extender sobre el portaobjetos, de tal manera que se forme una delgada película sobre el portaobjetos.
- Se dejó secar la muestra, y se procedió a observar al microscopio con aumento de 40x

- Contando 100 células del total, se determinó los espermatozoides vivos y muertos en porcentaje.

Para diferenciar los vivos de los muertos con la coloración de la Eosina-Nigrosina, se tomaron en cuenta los resultados obtenidos por diferentes autores, los que señalan que los espermatozoides muertos a diferencia de los vivos se tiñen con la Eosina (color rojo) en especial sus cabezas (por permeabilidad celular), mientras que los vivos permanecen incoloros según se aprecia contra el fondo oscuro de Nigrosina (Torres 1992).

Porcentaje de espermatozoides vivos/muertos

$$\left(\frac{\text{Nº de espermatozoides vivos/muertos}}{\text{Nº total de espermatozoides}} \right) \times \left(100 \right)$$

3.4.2.5 Integridad de Acrosoma.

Con la misma tinción que se utilizó para determinar los vivos y los muertos, se procedió a determinar la integridad de Acrosoma de los espermatozoides objetos de estudio. Este procedimiento se realizó antes de la congelación y de manera separada e individual para cada muestra sometida a cada tratamiento.

$$\left(\frac{\text{Nº de espermat. con acrosoma intacto}}{\text{Nº total de espermatozoides}} \right) \times \left(100 \right)$$

3.4.3 Preparación del Dilutor.

La dilución de los espermatozoides colectados del conducto deferente, para su posterior congelamiento se realizó mediante el siguiente preparado:

• TRIS	2.42 g
• Fructuosa	1.00 g
• Ácido cítrico	1.40 g
• Yema de huevo	20 %
• Glicerol	7 %
• Estreptomicina	1 mg
• Penicilina	100 000 UI
• Agua destilada csp	100 ml

La preparación del dilutor fue del modo siguiente:

- La yema de huevo separada de un huevo fresco, se colocó sobre papel absorbente y se mueve de un lado al otro, haciéndolo rodar suavemente para eliminar los restos de clara.
- Luego con una aguja se procedió a romper la membrana protectora de la yema, y con una jeringa de tuberculina se extrajo 1 ml de yema, el que se llevó a un tubo de ensayo estéril, para luego agrega dilutor 3.65 ml de solución madre (dilutor) y mezclar.
- En seguida se llevó a centrifugar a 3000 rpm por un tiempo de 10 min, para sedimentar los gránulos de grasa de la yema de huevo.
- Por último, con una jeringa de tuberculina se extrajo 0.5 ml (pre dilución) del sobrenadante del dilutor preparado y se colocó en el tubo de ensayo temperado dentro del

termo con agua a 37 °C y finalmente se procedió a la colección de los espermatozoides.

3.4.4 Enfriamiento de los Espermatozoides

La muestra de espermatozoides, se llevó a un refrigerador dentro de un vaso de precipitación de 500 ml de capacidad que previamente sirvió de “Baño María”. De esta forma se consiguió un enfriamiento lento de 37°C a 5 °C, por un espacio de 3 horas, fase en la que se colocó la fracción B compuesta por Dilutor/yema de huevo y glicerol (0.35 ml que representa el 7% del dilutor).

3.4.5 Fraccionamiento de los Espermatozoides en Pajillas.

Se procedió de la siguiente manera:

- Mientras que se esperaba que la dilución de los espermatozoides lleguen a 5 °C, se rotularon las pajillas con lapiceros de tinta permanente, en el que se consideró la clave de identificación para cada Tasa de congelamiento.
- Rotuladas las pajillas, fueron colocados en tubos de ensayo estériles.
- Las pajillas, el Polivinilo de Cloruro y una jeringa con aguja de 1.5 cm fueron colocados en la heladera.
- Se homogenizó bien el espermatozoide diluido antes de proceder al llenado de las pajuelas.
- Las pajuelas se cargaron pipeteando las dosis a través del tapón triple (algodón-polivinilo de cloruro-algodón), sumergiendo el extremo sin tapón en la dilución de espermatozoides.

- Para proceder al llenado de las pajuelas, se las tomó del extremo con tapón (para no transmitir el calor de la mano a la dilución de espermatozoides).
- El Polivinilo de Cloruro del tapón triple gelificó y selló en contacto con el líquido.
- En el extremo sin tapón, se creó una cámara de aire de 1.5 cm (con jeringa con aguja), se secó con papel absorbente y se selló con golpes suaves a una placa que contuvo Polivinilo de Cloruro.
- Se quitó el excedente de Polivinilo de Cloruro para que las pajuelas no se adhirieran entre sí. Las pajuelas se sumergieron inmediatamente en un recipiente con agua a 5 °C, de tal forma de conservar la dilución de espermatozoides a baja temperatura; el tapón recién formado gelificó y selló al contacto con el agua.

3.4.6 Congelamiento en Vapores de Nitrógeno Líquido.

- Se contó con una caja de tecnopor, con tapa, de aproximadamente 40 cm de largo por 30 cm de ancho por 35 cm de altura.
- Asimismo se contó con una gradilla y un soporte metálico para pajuelas, de 11 cm de largo, 7 cm de ancho y 2 cm de altura.
- El soporte metálico estuvo sujeto a través de lancetas metálicas colocadas gradualmente.
- Se agregó nitrógeno líquido en la caja de tecnopor hasta 5 cm respecto del fondo.
- En el interior de la caja se colocó el marco de aluminio sobre las lancetas metálicas y la gradilla.
- Se tapó por unos minutos hasta que se enfrió su interior.

- Luego de secar las pajuelas, se colocaron sobre el marco de aluminio, apoyando sólo sus extremos y cuidando de que no se toquen entre sí. Se tapó la caja por 10 minutos.
- Este procedimiento se realizó de manera sucesiva a 3, 5 y 7 cm sobre la superficie del nitrógeno.
- Finalmente las pajuelas se colocaron directamente en el nitrógeno y se almacenaron en porta pajuelas en un termo de nitrógeno líquido.

3.4.7 Descongelado de la Dilución de Espermatozoides.

- Se retiró la pajilla del termo criogénico por medio de una pinza.
- Una vez sujeta la pajilla, se sumergieron en un “Baño María” a 36 °C, moviéndolas con una pinza durante 30 segundos bajo el agua.
- Luego de su descongelamiento, la pajuela se sacó del agua, procediéndose al secado y cortado del tapón del extremo con cámara de aire.
- El extremo libre se tapó con un dedo antes de cortar el otro extremo y se destapó al momento de vaciar el contenido de la pajuela en un tubo de ensayo previamente colocado en “Baño María”.

3.4.8 Evaluación de los espermatozoides al descongelamiento.

Luego de su descongelamiento, se procedió a la examinación microscópica de una gota de semen en un portaobjeto templado (100 aumentos) sobre platina térmica. Se observó y valoró los parámetros antes descritos (Prueba hipo-osmótica, motilidad total y progresiva, porcentaje de

vivos y muertos e integridad de acrosoma), previos al congelamiento.

3.4.9 Método Estadístico.

Los datos encontrados se sometieron a medidas de tendencia central como el promedio y a medidas de dispersión como la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad.

A su vez, los datos fueron analizados en Diseño Completo al Azar (DCA), siendo modelo aditivo lineal el siguiente:

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij}	=	Variable respuesta
U	=	Media general
T_i	=	Efecto del i-ésimo tratamiento
E_{ij}	=	Error experimental

Los datos nominales fueron transformados a raíz cuadrada para el supuesto de normalidad del análisis de variancia y analizados en el Sistema Estadístico SAS, versión 9.4.

Se Trabajó con una probabilidad de 95% ($p < 0,05$).

Los promedios fueron comparados a través de la Prueba de Comparación Múltiple de Tukey.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Pre congelamiento

Tabla N° 2. Valores de la evaluación de espermatozoides de conducto deferente de Alpaca a la pre congelación.

Pre-congelado	Porcentaje	Valores Extremos	
		Mínimo	Máximo
Motilidad total	63.80	59	67
Motilidad progresiva	45.80	43	51
Vitalidad	65.80	60	71
Test-hiposmótico	55.40	52	59
Integridad de acrosoma	83.00	76	87

Fuente: Propia.

Se presenta los diferentes datos de las características microscópicas de los espermatozoides colectados del conducto deferente de Alpaca, previamente diluido, antes de ser sometidos a los diferentes niveles de congelamiento por encima de los vapores de nitrógeno líquido. Estos datos serán referenciales para el posterior análisis del congelamiento de espermatozoides a diferentes niveles por encima de los vapores de nitrógeno.

Datos similares obtuvo Deza (2004), con una vitalidad 58.25%. Otros estudios reportan para espermatozoide colectados del conducto deferente en Alpacas, una vitalidad de 44.14%, test hiposmótico de 57.40% (Quintanilla 2009).

4.2 Motilidad Total

Tabla N° 3. Motilidad Total de espermatozoides de conducto deferente de Alpaca a diferentes niveles de congelamiento sobre el nitrógeno líquido.

Niveles de Congelamiento	Porcentaje	Valores Extremos	
		Mínimo	Máximo
Congel/Descong 3 cm	18.20 ^d	15	21
Congel/Descong 5 cm	34.20 ^b	31	37
Congel/Descong 7 cm	29.00 ^c	26	33
Pre congelado	63.80 ^a	59	67

Fuente: Propia. ($p \leq 0,05$).

Al análisis estadístico, existe diferencia significativa entre las tres niveles de congelamiento de la variable evaluada ($p \leq 0,05$).

Es importante remarcar que, la distancia entre la pajilla y el baño en vapor de nitrógeno por encima de la superficie del nitrógeno líquido, determina el gradiente térmico durante el periodo en el que cambia el estado de agregación del medio de líquido a sólido. Así se puede apreciar que en el segundo tratamiento, 5 cm por encima del baño en vapor de nitrógeno líquido, permitió la mayor recuperación de espermatozoide móviles. Datos similares se obtuvieron en estudios de esperma de Gallo, en donde los mejores resultados tuvieron lugar en el rango de 1 – 5 cm, por encima de la superficie del nitrógeno líquido (36% de móviles); y que el rango de 7 – 10 cm, proporcionaba velocidades

de enfriamiento más lentas que estaban asociadas a mayor daño celular y pérdida de la motilidad, teniendo sólo 26% de espermatozoides móviles (Madeddu *et al.* 2016).

Así también tenemos otros estudios previos que muestran resultados similares a la descongelación de espermatozoides de Alpaca. Quintanilla (2009) precisó en espermatozoides descongelados del conducto Deferente en Alpacas (*Vicugna pacos*), una Motilidad de 22.20%. Pérez *et al* (2014) encontró, a la recuperación de espermatozoides de Alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva 56.8% de Motilidad. Deza (2004) determinó que la Motilidad de semen descongelado de Alpaca diluido con el 10% de yema de huevo fue 22.5%, 27.7% y 34.4% con el 2.5%, 5,0% y 7.5% de Glicerina respectivamente, diluido al 20% de yema de huevo mas el 2.5%, 5,0% y 7.5% de glicerina encontró una motilidad de 31.4%, 39.2% y 41.0% y con el 30% de yema de huevo más el 2.5%, 5,0% y 7.5% de glicerina; la motilidad fue de 32.4%, 36.2% y 38.7% respectivamente.

A 5°C la permeabilidad de los cationes de Calcio, se incrementan por lo que supera la capacidad de eliminación de estos iones por medio de las “Bombas de Calcio”, acumulándose este catión en niveles tóxicos en los espermatozoide, por lo que este daño se manifiesta en una disminución de la motilidad (Palma 2001).

4.3 Motilidad Progresiva

Tabla N° 4. Motilidad Progresiva de espermatozoides de conducto deferente de Alpaca a diferentes Niveles de congelamiento sobre el nitrógeno líquido.

Niveles de Congelamiento	Porcentaje	Valores Extremos	
		Mínimo	Máximo
Congel/Descong 3 cm	10.20 ^b	8	12
Congel/Descong 5cm	23.20 ^a	18	33
Congel/Descong 7 cm	18.40 ^a	17	21
Pre congelado	45.80 ^c	43	51

Fuente: Propia. ($p \leq 0,05$).

Al análisis estadístico, no existe diferencia significativa entre los niveles de congelamiento segundo y tercero, pero si existe diferencia entre éstos y la primera evaluada ($p \leq 0,05$). Sin embargo, se puede apreciar que con el segundo nivel, obtuvimos mejores resultados. Estos datos corroboran las consideraciones establecidas en la variables evaluada anteriormente.

Purdy *et al* (2009) encontró en un estudio similar, una motilidad progresiva entre el 15 – 18 % en semen de Gallo; después de congelar en vapor de nitrógeno líquido a una distancia de 1 cm sobre la superficie líquida por 7 min y el descongelado subsecuente.

A cada distancia por encima de la superficie del nitrógeno líquido, corresponde una curva de congelación diferente; por lo que se congelará más rápido, aquellas que se encuentren más cerca de la superficie del nitrógeno líquido y demorará más aquellas que se

encuentren más lejos. Así nuestros datos obtenidos, están similares a los encontrados por Valdivia *et al* (1999) en semen pos-descongelación, quien encontró una motilidad progresiva en Alpacas entre 15 – 20%. Calderón (2015) encontró a la descongelación una Motilidad Progresiva de 11.22% utilizando como dilutor TRIS+Plasma Seminal de Toro (*Bos Taurus*), y con TRIS+YH 9.97%. Harshan *et al*. (2006), un en estudio que realizó en Búfalos, obtuvo una Motilidad progresiva a la descongelación de 51.58% en espermatozoides de epidídimo de animales recientemente sacrificados.

Por consiguiente, al tener los más bajos resultados con 3cm por encima de los vapores de Nitrógeno, es probable, que al reducir la temperatura más rápidamente por la cercanía al nitrógeno líquido, el espermatozoide comience a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, sobre todo cuando se somete a temperaturas entre los 0°C y los -20°C, o hasta los -60°C, en donde el espermatozoide sufre los efectos de descompensación iónica y de líquidos lo suficientemente graves para causar un shock térmico. En tal sentido, se comprendería que por estas consideraciones el espermatozoide disminuiría la motilidad, por la disminución de energía debido al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salida de iones (Palacios 1994).

Con estos resultados, estaríamos confirmando que se requieren Tasas de Congelamiento no muy rápidas para reducir el

daño a las células espermáticas de la Alpaca durante el proceso de congelación.

4.4 Vitalidad

Tabla N° 5. Vitalidad de espermatozoides de conducto deferente de Alpaca a diferentes Niveles de congelamiento sobre el nitrógeno líquido.

Niveles de Congelamiento	Porcentaje	Valores Extremos	
		Mínimo	Máximo
Congel/Descong 3 cm	22.40 ^c	19	25
Congel/Descong 5 cm	36.20 ^b	34	39
Congel/Descong 7 cm	32.40 ^b	30	35
Pre congelado	65.80 ^a	60	71

Fuente: Elaboración propia. ($p \leq 0,05$).

Al análisis estadístico, no existe diferencia significativa entre los niveles de congelamiento segundo y tercero, pero si existe diferencia entre éstos y el primero del parámetro evaluado ($p \leq 0,05$).

Calderón (2015) obtuvo una Vitalidad de 14.77% a la descongelación utilizando como dilutor TRIS+Plasma Seminal de Toro (*Bos Taurus*), y con TRIS+YH 12.67. Quintanilla (2009) precisó en espermatozoides descongelados del conducto Deferente en Alpacas (*Vicugna pacos*), una Vitalidad de 30.10%. Pérez *et al* (2014) encontró, a la recuperación de espermatozoides de Alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva una vitalidad de 47.8%. Musthtaq *et al* (2015), precisó en un estudio hecho en Ciervos

una Vitalidad de 82.0% y 65.4% a moderado y rápido congelamiento respectivamente; hallando al igual que nuestro estudio, diferencias significativas.

Entonces, de lo observado en nuestros resultados, probablemente el daño espermático que resulta del “Choque Térmico” no solo es debido a la baja temperatura, sino también por la velocidad con que esta ocurra.

4.5 Test Hiposmótico

Tabla N° 6. Test Hiposmótico de espermatozoides de conducto deferente de Alpaca a diferentes Niveles de congelamiento sobre el nitrógeno líquido.

Niveles de Congelamiento	Porcentaje	Valores Extremos	
		Mínimo	Máximo
Congel/Descong 3 cm	18.40 ^c	14	24
Congel/Descong 5 cm	31.40 ^b	28	35
Congel/Descong 7 cm	27.00 ^b	24	32
Pre congelado	55.40 ^a	52	59

Fuente: Propia. ($p \leq 0,05$).

Al análisis estadístico, no existe diferencia significativa entre los niveles de congelamiento segundo y tercero, pero si existe diferencia entre éstos y el primero del parámetro evaluado ($p \leq 0,05$).

Este análisis corrobora el resultado del parámetro anteriormente evaluado. Del mismo modo, nuestros resultados están muy relacionados a los obtenidos por otros investigadores. Así,

Calderón (2015) encontró una Integridad de Membrana a la descongelación de 27.24% utilizando como dilutor TRIS+Plasma Seminal de Toro (*Bos Taurus*), y con TRIS+YH 21.54%. Quintanilla (2009) precisó en espermatozoides descongelados del conducto Deferente en Alpacas (*Vicugna pacos*), una Integridad de Membrana de 33.90%. Quispe *et al* (2015) encontró en espermatozoide recuperados del Conducto Deferente una Integridad de Membrana de 38.93%.

4.6 Integridad de Acrosoma

Tabla N° 7. Integridad de Acrosoma de espermatozoides de conducto deferente de Alpaca a diferentes Niveles de congelamiento sobre el nitrógeno líquido.

Niveles de Congelamiento	Porcentaje	Valores Extremos	
		Mínimo	Máximo
Congel/Descong 3 cm	77.40 ^b	73	83
Congel/Descong 5 cm	82.40 ^{ab}	80	84
Congel/Descong 7 cm	81.40 ^{ab}	80	83
Pre congelado	83.00 ^a	76	87

Fuente: Propia. ($p \leq 0,05$).

Al análisis estadístico, no existe diferencia significativa entre los niveles de congelamiento estudiados, ($p \leq 0,05$).

Nuestros datos difieren a lo determinado por Calderón (2015) quién encontró una Integridad de Acrosoma a la descongelación de 28.83% en Alpacas (*Vicugna pacos*), utilizando como dilutor

TRIS+Plasma Seminal de Toro (*Bos Taurus*), y con TRIS+YH 25.12%.

Sin embargo, Ugarelli (2017) determinó en una evaluación de la Integridad Acrosomal en espermatozoides epididimarios de Alpaca (*Vicugna pacos*), mediante Citometría de Flujo, un 93.30%, dato este que se aproxima al obtenido en nuestro trabajo.

Harshan, H., *et al.* (2006), un en estudio que realizó en Búfalos, obtuvo una Integridad de Acrosoma a la descongelación de 66.83% en espermatozoides de epidídimo de animales recientemente sacrificados.

V. CONCLUSIONES

1. Las características microscópicas de los espermatozoides colectados de conducto deferente en Alpacas se encuentran dentro de los parámetros aparentemente normales obtenidos en estudios realizados con la misma técnica.
2. Es el segundo nivel de congelamiento (5 cm encima de la superficie del nitrógeno líquido), con el que se obtuvieron mejores resultados, a la congelación/descongelación de espermatozoide colectados de Conducto Deferente en Alpacas.

VI. RECOMENDACIONES

1. Realizar los Trabajos de congelamiento de espermatozoides procedentes de conducto deferente en Alpacas, a 5 cm por encima del nitrógeno líquido, por cuanto a este nivel se obtuvieron los mejores resultados, según los parámetros establecidos tales como Motilidad Total y Progresiva, viabilidad, Test Hiposmótico e Integridad de Membrana.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- AISEN, E. 2015. Principios Físicos-Químicos Aplicados a la Criopreservación de los Espermatozoides. Laboratorio de Teriogenología. Facultad de ciencias Agrarias. Universidad Nacional del Comahue. Rio Negro. Argentina.
- ALLER J, REBUFFI G, CANCINO K Y ALBERIO R. 203. Influencia de la Criopreservación sobre la Motilidad, Viabilidad y Fertilidad de los Espermatozoides de Llama (*Lama glama*). Arch Zootec 52: 15-23.
- AVILA-PORILLO, L. 2006. Fundamentos de Cripreservación. Revista Colombiana. Vol 57. N°4.
- BOISO, I. 2001. Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 18, 127-131.
- BRAVO PW; ORDOÑEZ C; ALARCÓN V. 1996. Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. In proceedings of the 13 the international congress on animal 67 reproduction, Sydney, Australia Pp 2-3. International congress on animal reproduction: Sydney.
- BRAVO, P.W. 1995. Physiology of Reproducction in the Female Alpaca. Rev. Camelids N° 7, Ed. Pos Graduate Foundation in Veterinary Science, Sidney Australia.
- BUSTINZA, V. 2001. La Alpaca, primera edición, Tomo I, Editorial. Puno Perú.
- CALDERÓN D. 2015. Efecto de la Adición del Plasma Seminal de Toro (*Bos taurus*) sobre la Viabilidad de los Espermatozoides Crioconservados Colectados de los Conductos Deferentes en Alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis FMVZ-UNA- Puno.
- CANORIO P. MILAGRO. 2008. Criocapacitación del Espermatozoide de Alpaca. Facultad de ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- CASTRO JB, CASAS V, SOUZA F. 2009. Viabilidade dos espermatozóides colhidos do epidídimo de touros 24 horas post-mortem. *Resúmenes*

del Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Brasil, Pp 379.

CHOEZ A, KATHERINE. 2010. Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. Perú.

CROWE, J. 1989. Are Freezing and Dehydration Similar Stress Vectors? A Comparison of Modes of interaction of Stabilizing Solutes with Biomolecules. Symposium on Cryosensitizing and Cryoprotective Agents. 26 th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Charleston, South Caroline.

DEZA, H. 2004. Conservación de Espermatozoides Obtenidos a través del Conducto deferente en Alpacas (*Vicugna pacos*) y Llama (*Lama glama*) y su Posterior Viabilidad. Tesis FMVZ-UNA-Puno.

DOBRINS, EZ. 1993. Cold Shock Damage is Due to Lipid Phase Transition in Cell Membranes: A Demonstration using Sperm as a Model. 265:432-437.

EVANS G, MAXWELL WMC. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Buterworths Pty. Limited, Sydney. Australia.

FERNANDEZ-BACA S. 1991, Avances y perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Editor, Santiago de Chile.

FERNANDEZ-SANTOS M, ESTESO M, SOLER A Y GARDE J. 2006. Cryopreservation of Iberian Red Deer (*Cervus elephas hispanicus*) Epidymal spermatozoa: Effects of Egg Yolk, Glycerol and Cooling Rate.

GONZALES G. 1998. Manual de diagnóstico de la pareja infértil. Ediciones: Instituto de Investigación de la altura. Universidad peruana Cayetano Heredia. Lima – Perú,

GONZALES H. 2008. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. Scientia 10: 223-234.

GROSSMANN, M., SANTALÓ, J. 1991. Aspectes teòrics de la congelació de gàmetes i d'embrions. Treb Soc Cat Biol. 42, 87-108.

- HAFEZ E. 1989. Reproducción e inseminación artificial en animals 5ta Edición. Editorial Interamericana, México,
- HARRISON R. 1998. Sperm evaluation: what should be testing? In: 6a MAFF international Wordshop on Genetic nresources.Tsukuba Japan.
- HARSHAN, H., SINGH, L., ARANGASAMY, A., ANSARI, M., AND S., KUMAR . 2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and *in vitro*fertility of buffalo cauda spermatozoa.*Anim. Reprod. Sc.* 93: 124-133.
- HEWITT, D.A., LEAHY, R., SHELDON, I.M., AND ENGLAND, G.C.W. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*
- HOGAN B, BEDDINGTON R, COSTANTINI F, LACEY E (EDS). 1994. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual (2nd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- HOLT, W.V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.
- JEYENDRAN R.S., VAN DER VENN H.H., ZANEVELED L.J.D. 1992 The hipoosmotic swelling test: an update. *Ach Androl* 29, 105-116.
- JIMENEZ, C. 1994. Descripción de aspectos microscópicos al examen de espermatozoides. *Revista Argentina de Producción Animal*.Vol 23, pp 121 – 126.
- KUMAR, S., MILLAR, J.D. Y WATSON, P.F. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*. 46, 246-253.
- LUBOS H. 1983. Bases de la Reproducción Boviva. 1ra Edición. Editorial Diana. México.

- MAZUR, P. 1984. Freezing of living cells: mechanism and implications. The American Journal of Physiology. 247, 125-142.
- MADEDDU, M., MOSCA, F., ZANIBONI, L., CEROLINI, S., COLOMBO, E. 2016. Effect of cooling rate on the survival of cryopreserved rooster sperm: Comparison of different distances in the vapor above the surface of the liquid nitrogen. Department of health, Animal science and food safety, Universitat degli Studi di Milano.
- MAURICIO H, RODRIGUEZ C, OROPEZA A, LLANOS J Y GONZALES H. 2015. Use of Seminal Plasma in Equine Epididimal Spermatozoa Cryopreservation. Rev Inv Vet Perú.
- MEDEIROS, C.M., FORELL, F., OLIVEIRA, A.T. Y RODRIGUES, J.L. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. Theriogenology. 57, 327-344.
- MORTON, KATHERINE; VAUGHAN, JANE AND MAXWELL, CHIS. 2008. Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. Australian Government. Rural Industries Research and Development Corporation. Sydney.
- MUSHTAQ, A, RASHAD N. Y NASIM A. 2015. Effect of Cooling rate and Equilibration Time on Pre-freeze and Post-thaw Survival of Buck Sperm. Faculty of veterinary Science. University of Veterinary and Animal Sciences Lahore 54000, Pakistan.
- NIELD D, MIRAGAYA M, CHAVEZ G, PINTO M, Y AGÜERO A. 2006. Cryopreservation of Cauda epididymidis Spermatozoa from Slaughterhouse Testicles 24 h After Ground Transportation. J animal Production Science.
- OLIVO-ZEPEDA ET AL. 2017. Cryopreservation of Semen Obtained from Epididymis Versus Vas Deferent of Post-Mortem Bulls: Preliminary Results. Actas Iberoamericanas en conservación Animal, AICA. Mexico.
- PALACIOS, A.A. 1994. Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. Vet. Méx. 25:207-210.

- PALMA, GA. 2001. Biotecnología de la Reproducción. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina.
- PARICAHUA, E. 2001. Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- PÉREZ ET AL. 2016. Viabilidad in Vitro e in Vivo de los Espermatozoides Congelados/descongelados del conducto Deferente de Alpacas. Revista de Investigación Altoandina. Vol 18 N°2: 223 – 230.
- PÉREZ MG, APAZA E, DEZA H. 2006. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos. Alpaca, revista de investigación del IIPC Vol. 11 Nro 01. p. 17-23. Puno Perú.
- PEREZ, M.G., J. ZEVALLOS, U.H. PEREZ. 2014. Recuperación de los espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. Spermova, 4(2): 139-144.
- PURDY, P.H. 2009. Evaluation of Glycerol Removal Techniques, Cryoprotectants, and Insemination Methods for Cryopreserving Rooster Sperm with Implications of Generation of Breed or Line or Both.
- QUINTANILLA, R. 2009. Efecto del Empajillado y Método de Congelación sobre la Sobrevivencia de los Espermatozoide del Conducto Deferente de Alpacas. Tesis FMVZ-UNA-Puno.
- QUINTANO, J. 2002. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (lama pacos) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- QUISPE ET AL. 2015. Test Hipoosmótico de Espermatozoide de Alpaca (*Vicugna pacos*) recuperados del conducto Deferente. Asociación Peruana de reproducción Animal. Spermova 5(1):10-14.
- SALISBURY G, VAN DERNARK I, LODGE J. 1982. Fisiología de la Reproducción Animal e inseminación Artificial de los Bóvidos. Segunda Edición. Editorial Acribia. Zaragoza España,

- SANTIANI A; HUANCA W; SAPANA R; HUANCA T; SEPULVEDA N; SANCHEZ R. 2005. Effects on the quality of frozen thawed. Alpaca (vicugna pacos). And extenders. Asian j. androl pp 303-309.
- SENGER ET AL. 2009. Influence of Cooling Rates and Extender Upon Post-Thaw Viability of Bovine Spermatozoa Packaged in 0.25 and 0.5 ml French Straws. American society of Animal Science.
- SOLER, A.J., A.J. GARCIA, M.R. FERNANDEZ-SANTOS, M.C. ESTESO, J.J. GARDE. 2003. Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of Red Deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. J. Androl., 24: 5, 746-756.
- SOUZA, A. 2013. Uso de semen sexado en explotaciones de ganado lechero y de carne. Dairy Advisor at University of California. CEVA SA – Brasil. Revisado.
- TORRES H. 1992. South American Camelids. An action plan for their conservation. (Editor). IUCN/SSC South American Camelid Specialist Group. Gland, Suiza.
- UGARELLI A., EVANGELISTA S., SANTIANI A. 2017. Evaluación de la Integridad Acrosomal en Espermatozoides epididimarios de Alpaca Mediante Citometría de Flujo. Revista de Investigación Perú.
- VALDIVIA ET AL. 1999. Criopreservación del Semen de Alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos, Cusco Perú.
- VILA, L. Y GARCÍA, T. 1983. Revisión de los aspectos termodinámicos y cinéticos implicados en un proceso de criopreservación biológica. Biol Clin Hematol. 5, 135-142.
- VILA, L. 1984. Principios químico-físicos de la criopreservación de material biológico. Biol Clin Hematol. 6, 227-236.
- VILA, L. Y CARRETERO, F. 1985. Manejo de congeladores programables. Biol Clin Hematol. 7, 61-67.
- WATSON PF. 1981. The Roles of Lipid and protein in the Protection of Rat Spermatozoa at 5°C by Egg-yolk Lipoprotein. J Reprod. Fert. 62:483-492.

WATSON PF. 1995. Recent Developments and Concepts in the Cryoconservation of Espermatozoa and Assessment of their Post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 7:781-791

ANEXOS

ANEXO 1.

MOTILIDAD TOTAL ESPERMATICA					
REPETICIONES	TRES	CINCO	SIETE	CONTROL	
1	20	31	31	59	
2	21	35	28	63	
3	15	37	26	66	
4	18	36	33	64	
5	17	32	27	67	
PROMEDIO	18.20	34.20	29.00	63.80	
DS	2.39	2.59	2.92	3.11	
CV	13.12	7.57	10.05	4.88	
MAX	21.00	37.00	33.00	67.00	
MIN	15.00	31.00	26.00	59.00	
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	36.61546	12.2051533	204.84	<.0001
Error	16	0.95336	0.059585		
Total corregido	19	37.56882			
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	NUM Media		
0.974624	4.160566	0.2441	5.867		
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT		
A	7.986	5	4		
B	5.846	5	2		
C	5.38	5	3		
D	4.256	5	1		

ANEXO 2.

MOTILIDAD PROGRESIVA					
REPETICIONES	TRES	CINCO	SIETE	CONTROL	
1	12	22	19	47	
2	12	24	17	43	
3	8	33	17	44	
4	11	19	21	44	
5	8	18	18	51	
PROMEDIO	10.20	23.20	18.40	45.80	
DS	2.05	5.97	1.67	3.27	
CV	20.09	25.75	9.09	7.14	
MAX	12.00	33.00	21.00	51.00	
MIN	8.00	18.00	17.00	43.00	
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	35.49562	11.8318733	359.52	<.0001
Error	16	0.52656	0.03291		
Total corregido	19	36.02218			
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	NUM Media		
0.985382	3.811959	0.181411	4.759		
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT		
A	6.014	5	2		
A	5.692	5	3		
B	4.728	5	1		
C	2.602	5	4		

ANEXO 3.

PORCENTAJE DE VIVOS

REPETICIONES	TRES	CINCO	SIETE	CONTROL
1	22	34	35	60
2	25	39	31	69
3	19	37	30	63
4	24	35	35	66
5	22	36	31	71

PROMEDIO	22.40	36.20	32.40	65.80
DS	2.30	1.92	2.41	4.44
CV	10.28	5.31	7.43	6.75
MAX	25.00	39.00	35.00	71.00
MIN	19.00	34.00	30.00	60.00

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	30.4558	10.1519333	198.12	<.0001
Error	16	0.81988	0.0512425		
Total corregido	19	31.27568			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	NUM Media
0.948191	7.619012	0.367427	4.8225

Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT
A	8.11	5	4
B	6.014	5	2
C	5.692	5	3
D	4.728	5	1

ANEXO 4.

TEST HIPOSMOTICO (integridad de membrana)					
REPETICIONES	TRES	CINCO	SIETE	CONTROL	
1	24	35	32	55	
2	20	28	26	57	
3	17	32	24	52	
4	17	31	29	54	
5	14	31	24	59	
PROMEDIO	18.40	31.40	27.00	55.40	
DS	3.78	2.51	3.46	2.70	
CV	20.55	7.99	12.83	4.88	
MAX	24.00	35.00	32.00	59.00	
MIN	14.00	28.00	24.00	52.00	
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	26.63632	8.87877333	92.55	<.0001
Error	16	1.53496	0.095935		
Total corregido	19	28.17128			
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	NUM Media		
0.945513	5.505399	0.309734	5.626		
Tukey Agrupamiento	Media	N	TRAT		
A	7.442	5	4		
B	5.602	5	2		
B	5.19	5	3		
C	4.27	5	1		

ANEXO 5.

INTEGRIDAD DEL ACROSOMA					
REPETICIONES	TRES	CINCO	SIETE	CONTROL	
1	83	80	83	85	
2	79	84	80	84	
3	75	81	81	87	
4	77	83	83	83	
5	73	82	80	76	
PROMEDIO	77.40	82.00	81.40	83.00	
DS	3.85	1.58	1.52	4.18	
CV	4.97	1.93	1.86	5.04	
MAX	83.00	84.00	83.00	87.00	
MIN	73.00	80.00	80.00	76.00	
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	3	0.28986	0.09662	3.29	0.048
Error	16	0.47024	0.02939		
Total corregido	19	0.7601			
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	NUM Media		
0.381345	1.905893	0.171435	8.995		
Tukey Agrupamiento		Media	N	TRAT	
		A	9.11	5	4
B		A	9.056	5	2
B		A	9.02	5	3
B			8.794	5	1