



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



“VIABILIDAD IN VITRO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE
ALPACAS CONGELADOS/DESCONGELADOS CON DILUTORES
A BASE DE LECHE DESCREMEDA”

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. MIDWAR ALI CABRERA PACHO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2017



DEDICATORIA

A mis queridos padres Pedro Cabrera y Valeriana Pacho, con aprecio y mucho agradecimiento por darme lo más valioso de todo ser humano que es la Vida, Amor, educación y sobre todo valores con ejemplos de superación y Perseverancia ayudaron a lograr este anhelo y lograr llegar a esta meta.

*A mi hermano Pedro Pablo, que sin saberlo fue inspiración
Y ganas de salir adelante ante todo obstáculo, logrando
Superar todas las piedras existentes en mi camino.*

*A mi esposa Luz Marina y mi hermosa hija Alizee Cabrera,
Por ser el motor y motivo de mis logros y tenerme paciencia
Donde estuvieron en todo momento para ayudarme a conseguir
Mi meta tan anhelada.*

*A mis padres políticos Juana y Cecilio (+) y hermanos políticos
Claudio, Yessica, Felipe y Magaly gracias por su apoyo y consejos.*

*A todos mis amigos y compañeros de nuestra Gloriosa facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia
Por estar siempre a lado mío y conseguir todos nuestra formación profesional.*

Midwar Cabrera...



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano, por ser una de las mejores universidades del sur de nuestro Perú, por se ser la primera unidad formadora de grandes profesionales.

A nuestra grandiosa y gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia por ser una escuela de formación de conocimientos en beneficio de los pobladores de nuestro país.

A mi director y maestro Dr. Guido Manuel Pérez Durand, por su enseñanza y consejos en toda mi formación profesional y ejecución de esta tesis, por permitirme desarrollarme como profesional en el laboratorio de Reproducción Animal.

A mi asesor y gran amigo MVZ. Jorge M. Torres Gonzales por su apoyo incondicional en todo momento.

A los miembros del jurado revisor MVZ. Ciriaco T. Zuñiga Zuñiga, Mg. Sc. Bilo W. Calsin Calsin, Mg. Sc. Nubia Catacora Flores, por sus consejos, apoyo y adecuada intervención en la corrección de la redacción de mi borrador de tesis, gracias por ser mis maestros en toda mi formación profesional.

Un agradecimiento muy especial a un maestro y amigo Dr. Víctor Meliton Zanabria Huisa, por sus consejos y apoyo para ser un buen profesional y culminación de la presente tesis.

Un agradecimiento muy especial a todos mis maestros de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia que apoyaron en toda mi formación profesional espero no defraudarlos.

A una gran amiga y colega MVZ. Evila suasaca Surco por el apoyo moral en todo momento de nuestra formación profesional en la FMVZ y estar pendiente en la culminación de mi tesis.

Midwar Cabrera...



INDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 9

ABSTRACT..... 10

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION 12

1.1.1. Objetivo General..... 12

1.1.2. Objetivos Específicos 12

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES..... 13

2.1.1. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACA..... 13

2.2. MARCO TEORICO 13

2.2.1. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS 13

2.2.2. CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA. 21

2.2.2.1. Principios de criopreservación. 22

2.2.2.2. Dilutores y Criopreservadores 25

2.2.3. FACTORES QUE AFECTAN AL ESPERMATOZOIDE DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN..... 33

2.2.4. CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACAS. 35

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ZONA DE ESTUDIO 41

3.2. ANIMALES..... 41

3.3. MATERIAL DE ESTUDIO 41

3.4. METODOLOGÍA..... 42

3.4.1. Desviación de los conductos deferentes..... 42

3.4.2. COLECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES..... 44



3.4.3. PREPARACION DE DILUTORES	45
3.4.4. Motilidad total y motilidad progresiva.....	46
3.4.5. Vitalidad espermática.....	47
3.4.6. Test Hipoosmótico	48
3.4.7. Integridad de Acrosoma	49
3.4.8. PROCEDIMIENTO PARA LA CONGELACION DE PAGILLAS.....	49
3.4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	51

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE LOS DILUTORES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES COLECTADAS A 37 °C.	52
4.2. EFECTO DE LOS DILUTORES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES ENFRIADAS HASTA LOS 5°C.	57
4.3. EFECTO DE LOS DILUTORES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES POST DESCONGELACIÓN.....	60
V. CONCLUSIONES	64
VI. RECOMENDACIONES	65
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
ANEXOS.....	76

Área: Reproducción Animal

Tema: Viabilidad de espermatozoides en alpacas

FECHA DE SUSTENTACION: 19 de diciembre de 2017



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Registro de las características macroscópicas y microscópicas de los espermatozoides colectados del conducto deferente (0 h) a T° medio ambiente.....	41
Cuadro 2. Registro a 5° C (enfriamiento) la motilidad, integridad de acrosoma integridad de membrana.....	42
Cuadro 3. Registro a la descongelación la motilidad, integridad de acrosoma, integridad de membrana.....	42
Cuadro 4. El tris fue preparado para 100 mL de la manera la siguiente:	45



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de los dilutores sobre las características seminales colectadas a 37°C.	52
Tabla 2. Características seminales de semen diluido en Tris, Leche descremada 100% y Leche descremada 75% + Yema de Huevo 25% y enfriadas hasta los 5°C. .	57
Tabla 3. Características seminales de semen diluido en Tris, leche descremada 100% y leche descremada 75% + yema de huevo 25% post descongelación.	60



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

CSA	:	Camélidos Sudamericanos
FMVZ	:	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
LD	:	Leche descremada
LDL	:	Lipoproteínas de baja intensidad
UNA	:	Universidad Nacional del Altiplano
YH	:	Yemas de Huevo
UHT	:	Temperatura ultra alta
IA	:	Inseminación artificial



RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue criopreservar espermatozoides del conducto deferente el cual fue realizada en el Laboratorio de Reproducción Animal de la FMVZ – UNA Puno; Donde se evaluó los tres tratamientos; T1: Tratamiento control (TRIS); T2: Leche descremada 100%; T3: Leche descremada 75%, yema de huevo 25%; Para ello se utilizó 3 alpacas macho de la raza Huacaya, mayores de 5 años de edad, a los que se sometió a la plastia de desvió de los conductos deferentes, la colección fue realizada en una fracción de 0.5 mL de cada tratamiento. Los resultados encontrados fueron los siguientes: La motilidad total de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 43.98%^a (T1), 40.53%^a (T2), 46.39%^a (T3)($p \leq 0.05$), a la refrigeración a 5°C fue 33.24%^a (T1), 42.83% (T2) y 41.98% (T3), fueron similares el (T2 y T3) ($P > 0.05$), a la descongelación fue 17.97%^a (T1) y 27.38% (T3) ($P > 0.05$), La motilidad progresiva de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 32.35 ± 4.55 ^a(T1), 29.94%(T2), ($p \leq 0.05$), a la refrigeración a 5°C fue 26.14% (T1), 41.32% (T2) y 38.82% (T3) ($P > 0.05$), a la descongelación fue 10.82% (T1) y 24.27% (T3) ($P > 0.05$). La vitalidad de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 34.73% (T1), 34.39% (T2) y 19.92% (T3), fueron similares el (T1 y T2) ($p \leq 0.05$), a la refrigeración a 5°C fue 26.45% (T1), 36.65%^a (T2), 29.47% (T3) ($P > 0.05$), a la descongelación fue 12.30% (T1) y 24.01% (T3) ($P > 0.05$). La integridad de membrana (prueba de HOST) de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 46.64% (T1), 58.78% (T2) y 49.57% (T3) ($p \leq 0.05$), a la refrigeración a 5°C fue 33.52%^a (T1), 66.18% (T2) y 53.59% (T3) ($P < 0.05$), a la descongelación fue 24.26% (T1) y 29.41% (T3) ($P > 0.05$). La integridad de acrosoma de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 44.79% (T1), 65.67% (T2) y 54.15% (T3) ($p \leq 0.05$), a la refrigeración a 5°C fue 41.26%^a (T1), 72.74% (T2) y 56.93% (T3) ($P > 0.05$), a la descongelación fue 27.67% (T1) y 63.65% (T3) ($P > 0.05$).

Palabras clave: Alpaca, criopreservación, Leche descremada, espermatozoides, Yema de huevo.



ABSTRACT

The objective of this work was to cryopreserve spermatozoa from the vas deferens, which was carried out in the Animal Reproduction Laboratory of FMVZ - UNA Puno; Where the three treatments were evaluated; T1: Control treatment (TRIS); T2: 100% skim milk; T3: Skim milk 75%, egg yolk 25%; For this, 3 male alpacas of the Huacaya race, older than 5 years of age, were used, which underwent deviation plasty of the vas deferens, the collection was carried out in a fraction of 0.5 mL of each treatment. The results found were the following: The total motility of the sperm at the collection (37oC) was 43.98% at (T1), 40.53% at (T2), 46.39a (T3) ($p \leq 0.05$), when refrigerated at 5oC it was 33.24% at (T1) , 42.83% (T2) and 41.98% (T3), were similar in (T2 and T3) ($P > 0.05$), at thawing it was 17.97% at (T1) and 27.38% (T3) ($P > 0.05$), progressive motility of the spermatozoa at collection (37°C) was 32.35 ± 4.55 at (T1), 29.94% (T2), ($p \leq 0.05$), when refrigerated at 5oC it was 26.14% (T1), 41.32% (T2) and 38.82% (T3) ($P > 0.05$), at thaw it was 10.82% (T1) and 24.27% (T3) ($P > 0.05$). The vitality of the sperm at the collection (37oC) was 34.73% (T1), 34.39% (T2) and 19.92% (T3), the (T1 and T2) were similar ($p \leq 0.05$), when refrigerated at 5oC it was 26.45% (T1), 36.65% (T2), 29.47% (T3) ($P > 0.05$), at thawing it was 12.30% (T1) and 24.01% (T3) ($P > 0.05$). The membrane integrity (HOST test) of the sperm at the collection (37oC) was 46.64% (T1), 58.78% (T2) and 49.57% (T3) ($p \leq 0.05$), when refrigerated at 5oC it was 33.52% (T1), 66.18% (T2) and 53.59% (T3) ($P < 0.05$), after thawing it was 24.26% (T1) and 29.41% (T3) ($P > 0.05$). The acrosome integrity of the sperm at the collection (37oC) was 44.79% (T1), 65.67% (T2) and 54.15% (T3) ($p \leq 0.05$), when refrigerated at 5oC it was 41.26% at (T1), 72.74% (T2) and 56.93% (T3) ($P > 0.05$), at thaw it was 27.67% (T1) and 63.65% (T3) ($P > 0.05$).

Key words: Alpaca, cryopreservation, Egg yolk, Skim milk, Semen



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La crianza de alpacas es una actividad muy importante, sin embargo, un mal manejo repercute en la economía, ecología y sociedad de los pueblos andinos, ya que pueden perder uno de sus ingresos económicos más importantes, es así que, urge aplicar programas para la conservación de material genético en esta especie que cuenta con una población con casi llega a los 3.5 millones de cabezas (INEI, 2012).

El proceso de criopreservación de espermatozoides es una técnica de reproducción asistida muy usada para poder preservar el material genético de especies de animales como el de la alpaca (Canario, 2015), actualmente se han venido realizando diversas investigaciones sobre la conservación de semen fresco, refrigerado y congelado en camélidos sudamericanos; no obstante, no se observa el éxito deseado como en otras especies domésticas. En la alpaca, una limitante para el desarrollo de la conservación del semen es la dificultad en la colección del mismo. Por su parte la técnica desviación del conducto deferente propuesta por Pérez *et al.*, (2006) permite obtener espermatozoides desprovistos de plasma seminal, constituyendo un modelo experimental para el desarrollo de estudios de conservación de semen, debido a que se encuentran en un nivel de maduración final y no están mezclados con el plasma seminal viscoso; además, su manipulación es fácil ya que la muestra obtenida no es espumosa ni viscosa y principalmente no se encuentran contaminadas con impurezas del suelo u orina, como se observa con otros métodos de colección. Existe una gran limitación en lo concerniente al desarrollo de protocolos adecuados para la conservación de espermatozoides de CSA que estandaricen el dilutor y crioprotector empleado, la temperatura de equilibrio, la



velocidad de congelación y descongelación, entre otros (Choez y Santiani, 2016). En la actualidad los dilutores con mayor frecuencia en uso son a base de TRIS, citrato, lactosa o leche descremada con glucosa o fructuosa y yema de huevo (Banda *et al.*, 2010; Choez *et al.*, 2013; Terreros *et al.*, 2015). No obstante, se observa una escasa supervivencia de los espermatozoides al proceso de criopreservación. Para mantener los espermatozoides por periodos más prolongados, se hace necesario e imprescindible la adición de sustancias que prolonguen la vida de estas células germinales. El dilutor es el elemento que contiene las sustancias necesarias para mantener o incrementar la viabilidad espermática (Illera, 1994). Watson (1981), menciona que la leche de vaca y la yema de huevo se presentan con buenas características, que pueden apoyar como agentes dilutores y crioprotectores en el semen.

1.1.OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

1.1.1. Objetivo General

Determinar la viabilidad *in vitro* de los espermatozoides del conducto deferente, de alpacas congelados/descongelados con el dilutor a base de leche, como objetivos

1.1.2. Objetivos Específicos

- Evaluar la concentración, motilidad (%), morfología (%), integridad de acrosoma (%), integridad de membrana (%), viabilidad y Concentración espermática en las muestras de colectadas.
- Evaluar durante el procesamiento la motilidad (%), integridad de acrosoma (%), integridad de membrana (%) en las muestras diluidas y enfriadas.
- Evaluar la motilidad (%), integridad de acrosoma (%), integridad de membrana (%) en espermatozoides post descongelados.



CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

2.1.1. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACA.

El semen de los Camélidos sudamericanos (CSA) presenta características limitantes particulares propia de la especie, tales como baja concentración de espermatozoides, alto porcentaje de espermatozoides anormales, extrema filancia y un plasma seminal con alta viscosidad que dificulta el veloz desplazamiento de los espermatozoides (Banda *et al.*, 2010; Casaretto, *et al.*, 2012). El semen está compuesto de 11,5 % de espermatozoides y 88,5 % de plasma seminal por volumen (Garnica *et al.*, 1993).

2.2. MARCO TEORICO

2.2.1. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

A. Motilidad Espermática.

Consiste básicamente en la capacidad de movilidad y movimiento de los espermatozoides, donde la motilidad total en camélidos no está presente como en el caso de los carneros, en camélidos es mejor referirse como motilidad individual y oscilatoria, con movimiento lento que en parte es debido a la viscosidad del semen (Bravo, 1995).

El movimiento de los espermatozoides en el semen no diluido es descrito como oscilatorio, ya que la mayoría de espermatozoides se mueven hacia atrás y adelante, y sólo del 5 al 10% de los espermatozoides tienen un movimiento progresivo hacia



adelante (Bravo *et al.* 1997). Al parecer la alta viscosidad del plasma seminal, así como la baja concentración espermática determinan los patrones de motilidad; por ello, la motilidad del espermatozoide aumenta a medida que el eyaculado se vuelve más líquido (Tibary y Memon, 1999).

Los espermatozoides de camélidos exhiben motilidad individual por la contracción del flagelo en el mismo lugar, de manera oscilatoria (Bravo, 2002). La motilidad individual es muy baja en semen no diluido, es descrita como oscilatoria y solo un 5 - 10 % de los espermatozoides motiles tienen movimiento de avance lineal, siendo necesario licuefactar el semen para observar mejor la motilidad, pues es muy dificultoso observarla en semen entero por su naturaleza viscosa (Tibary y Vaughan, 2006).

La motilidad lograda a través de la desviación del conducto deferente fue 64.81% a 67.37% Quintano (2002). Se reportó 71.89% de motilidad individual con la técnica de desviación de conductos deferentes (Deza, 2004).

B. Viabilidad Espermática

Permite saber el número de espermatozoides vivos, aunque estos no se muevan. Se utiliza una tinción que tiñe los espermatozoides muertos las tinciones permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos, así en lo referente a colorantes la cabeza tiene la propiedad de dejar pasar los colorantes por perturbación de la membrana cefálica mientras que los vivos no (Lubos, 1983).

Quispe (1987) clasifico vivos y muertos, indicando que una buena motilidad tiene más del 60% de espermatozoides vivos, motilidad regular cuando los



espermatozoides vivos están entre un 40 a 60% y motilidad baja cuando el porcentaje de espermatozoides vivos es menor al 40% en semen colectado de alpacas.

La viabilidad de los Espermatozoides presentes en el semen de alpaca varía desde un 58% a 83%, mientras que los porcentajes de espermatozoides con morfología normal están en un rango de 71% a 84% (Bravo *et al.* 1997).

El porcentaje de espermatozoides vivos es constante a pesar de incrementar la frecuencia de colección, existe una ligera disminución de la vitalidad entre colecciones, pero no es significativa (Bravo *et al.*, 1997).

El porcentaje de vitalidad más alto lo encontró Paricahua (2001) a través de la desviación del conducto deferente, con un valor de 94.25% sin embargo, Quintano (2002) encontró porcentajes de 62.47% por el mismo método de colección. Así también encontró Deza (2004) un 58.25% de espermatozoides vivos por el mismo método. Porcentajes de vitalidad encontradas en promedio 61.84% por Quispe (2008).

C. Concentración Espermática.

Es el número de espermatozoides por mililitro y se espera que haya un promedio de 100 millones en cada mililitro, las altas viscosidades del plasma seminal de la alpaca hacen difícil la adecuada colección y extensión del semen en el hemocitometro, cabe indicar que la concentración espermática en la alpaca no es de billones como en el toro, morueco o sementales, más bien está entre cientos de miles (Bravo, 1995). La concentración espermática es variable y se ve afectada por la edad, el método de colección empleado, el número de eyaculaciones al día y el volumen



del eyaculado (Tibary y Vaughan, 2006), además la interrupción de la cópula resulta en concentraciones espermáticas reducidas (Bravo *et al.*, 2002).

La concentración disminuye en sucesivas eyaculaciones, pero no hay diferencia en la concentración si se observa en un intervalo de al menos 12 h entre cada eyaculación (Bravo *et al.*, 1997b). Se han reportado concentraciones de alrededor de 100 millones de espermatozoides por ml (Bravo *et al.*, 1997b; Aller *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005).

Bravo, *et al* (1997) reportaron que la concentración desciende de 72.2×10^6 a 51.9×10^6 al segundo eyaculado y a 45.4×10^6 al tercero, por lo que no se recomienda una sobre exigencia durante la época reproductiva a fin de no causar una caída en el porcentaje de fertilidad.

La concentración espermática varía de acuerdo al método utilizado en la colección del semen, así se tiene que los investigadores van encontrando concentraciones que varían desde $7.78 \times 10^4 / \text{mm}^3$ Pacheco (1996). Quintano (2002) utilizando el método de la desviación de los conductos deferentes encontró como promedio 23.87×10^4 espermatozoides por mm^3 La concentración de los espermatozoides en el plasma seminal también se verá influenciado por el efecto de las eyaculaciones sucesivas. Mediante la desviación de conductos deferentes se obtuvo una concentración de 23.87×10^6 a 25.53×10^6 esp/ mm^3 (Paricahua, 2001; Quintano, 2002; Deza, 2004).



D. Integridad de Membrana del Espermatozoide

Esta participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones que permiten la adaptación metabólica del espermatozoide al medio circulante, proporcionándole, un sistema molecular para el reconocimiento del oocito. De aquí deriva que la evaluación estructural del espermatozoide hace énfasis en la valoración de la integridad de su MP, así como también la membrana acrosomal (MA); pudiendo en algunos casos evaluarlas juntas o por separado mediante tinciones sencillas en microscopio óptico (Zhu y Liu, 2000). La integridad de la membrana plasmática (MP) es fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible para la fecundación (Rubio *et al.*, 2009).

La integridad de la membrana espermática es de fundamental importancia en el proceso de fertilización y una evaluación de su funcionalidad es un indicador de la capacidad fertilizante del espermatozoide, la cual puede evaluarse observando la capacidad de la cola espermática de enrollarse en presencia de una solución hipoósmotica y es un signo del transporte de agua a través de la membrana cuando esta se encuentra funcional y activa (Jeyendran *et al.*, 1984).

Durante el tránsito del espermatozoide por el epidídimo y el conducto deferente, el espermatozoide experimenta un cambio en el medioambiente pues éste varía en osmolaridad y entonces la membrana espermática adquiere la capacidad de regular el volumen celular (Petrunkina *et al.*, 2007).

El protocolo del test hipoósmotico debe adaptarse a la especie para tener mayor confiabilidad en los resultados de acuerdo a las características del semen y



la forma de manejo, ya sea semen fresco o semen congelado, así como en caprinos se reportó 50 % de endósmosis en una solución de 125 mosmol (Fonseca *et al.*, 2005), en perros de 79.89% en una solución de 100 mosmol (Dobranic *et al.*, 2005), en humanos de 60.1 % en una solución de 150 mosmol (Jeyendran *et al.*, 1984). Esta técnica consiste en incubar los espermatozoides en una solución hipoosmótica para que respondan a dicho estrés con el hinchamiento de la membrana plasmática en la parte distal de la cola. Los espermatozoides vivos son sometidos a incubación en solución hipoosmótica, los espermatozoides con membrana funcional permiten el ingreso de agua por osmosis, lo cual se evidenciará por hinchamiento y enrollamiento de la cola (endosmosis) (Jeyendran *et al.*, 1984).

La evaluación de la integridad funcional de membrana fue realizada utilizando la prueba de estrés hipoosmótico o HOST (Hypo Osmotic Swelling Test) descrito por (Jeyendran *et al.*, 1984) para espermatozoides humanos, y utilizado por (Banda *et al.*, 2010) en espermatozoides de alpaca.

Estudios previos indican que espermatozoides de alpaca colectados del epidídimo sometidos al test hipoosmótico a una osmolaridad de 100 mOsmol, obtienen una respuesta de 89.08 % (Rodríguez, 2009), evidenciando una mayor respuesta en espermatozoides libres de plasma seminal. En semen de alpaca obtenido por electroeyaculación el rango de porcentaje de endosmosis utilizando solución hipoosmótica de 100 mOsmol es de 20 a 62 % (Giuliano *et al.*, 2010), mientras que en semen entero de alpacas utilizando solución hipoosmótica de 150 mOsmol el porcentaje obtenido fue de 23.5 % (Pacheco *et al.*, 2011).



En llamas, existen varias experiencias en las cuales se realizó el test hipoosmótico en semen fresco y entero, determinándose 40 % de endósmosis en una solución de 100 mosmol, se sugiere que el bajo porcentaje de endósmosis se deba a la alta viscosidad que impide que la membrana espermática tenga contacto con la solución hipoosmotica (Giuliano *et al.*, 2007a). Otros reportes en llamas indican 59.70 % en semen colectado por electroeyaculación (Director *et al.*, 2007); 33.48% en semen colectado también por electroeyaculación y 30.15 % en semen colectado por vagina artificial (Giuliano *et al.*, 2007b); y un último reporte indica 36% en espermatozoides de semen colectado por electroeyaculación (Carretero *et al.*, 2009).

E. Integridad de acrosoma del espermatozoide.

El acrosoma es un delgado saco membranoso de doble capa que cubre el extremo anterior del núcleo del espermatozoide. Contiene acrosina, hialuronidasa, y otras enzimas hidrolíticas. La evaluación de este componente espermático resulta esencial al considerar que participa del proceso de fecundación de ovocitos. Esta valoración toma mayor relevancia en espermatozoides criopreservados cuya mayor permeabilidad al calcio, inducida por las bajas temperaturas, posibilitan reacciones capacitantes anticipadas que menguarían el potencial fecundante del espermatozoide (Garner y Hafez, 2000).

Los enzimas que contiene el acrosoma tienen un papel fundamental en el proceso de penetración del ovocito, de manera que la presencia de anomalías morfológicas de esta región está asociada a una reducción de la fertilidad (Hashizume *et al.*, 1990). Las alteraciones de la morfología del acrosoma son



debidas a procesos fisiológicos asociados, por un lado, al envejecimiento de la célula espermática; y por otro, al proceso de fecundación (Yanagimachi, 1994). No obstante, también se producen cambios en el acrosoma como consecuencia de shock por frío, en procesos de congelación/descongelación, en cambios de presión osmótica, por diluciones y centrifugaciones repetidas (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

El acrosoma contiene enzimas que desarrollan un papel crucial en la penetración de la zona pelúcida del ovocito (Garner y Hafez, 2002), por ello, el porcentaje de espermatozoides que poseen un acrosoma intacto y que son aptos para exhibir reacción acrosómica, es una importante característica seminal (La evaluación de este componente espermático toma mayor relevancia en espermatozoides criopreservados, ya que en el proceso de dilución, refrigeración y congelación queda particularmente afectada la membrana del acrosoma (Hammerstedt *et al.*, 1990) y por tanto, capaz de afectar a la habilidad fecundante del espermatozoide (Watson, 2000).

En la llama se ha utilizado la tinción con Coomassie Blue para evaluar la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal. Esta técnica es sencilla, económica, rápida y se puede realizar en cualquier laboratorio de espermatozoología. Por otra parte, la incorporación de técnicas que evalúen características seminales diferentes a las de rutina permitiría una evaluación más completa de los eyaculados y además permitiría evaluar los diferentes efectos que tienen sobre los espermatozoides de llama los procesos realizados *in vitro*, con el objetivo último de mejorar las técnicas de reproducción asistida utilizadas en la especie. Sin embargo, la evaluación de



múltiples características espermáticas está limitada por la cantidad de pruebas que puedan evaluarse simultáneamente (Giuliano *et al.*, 2012).

F. Reservorios espermáticos.

Los machos presentan reservorios espermáticos dentro de los órganos reproductivos, los cuales se encargan de producir y transportar estos espermatozoides hacia la eyaculación, estos lugares son: los testículos, el epidídimo en sus tres porciones y el conducto deferente, en los que existen las siguientes cantidades antes del empadre: testículo: 92×10^6 , cabeza del epidídimo: 41×10^6 , cuerpo del epidídimo: 29×10^6 , cola del epidídimo: 107×10^6 y conducto deferente: 61×10^6 , lo que indica claramente que la mayor reserva de espermatozoides en la alpaca es la cola del epidídimo; las reservas espermáticas de la alpaca macho adulto, bajan después del periodo de empadre y es elevada durante el periodo de quietud sexual. No existen cambios significativos en los pesos del testículo, epidídimo, conducto deferente, antes y después del empadre, así como en época de quietud sexual (Bravo *et al.*, 2003).

2.2.2. CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES EN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.

Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector (CP) efectivo y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de varias especies se congela y utiliza con éxito en la IA. Sin embargo, y con excepción de los bóvidos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido a otras especies domésticas (Holt, 2000). Así mismo, Choez, (2016) menciona que, la



criopreservación de semen es una herramienta muy importante para la reproducción asistida de diversos individuos y para salvaguardar los caracteres genéticos de mejoramiento de las especies, así como también para la preservación de muchas especies y razas que están en peligro de extinción.

2.2.2.1. Principios de criopreservación.

Proceso en el cual las células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80°C y -196°C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo. A esas temperaturas, cualquier actividad biológica, incluidas las reacciones bioquímicas que producirían la muerte de una célula, quedan efectivamente detenidas. Los métodos de criopreservación buscan alcanzar bajas temperaturas sin causar daños adicionales causados por la formación de hielo durante la congelación.

La criopreservación (congelar a muy bajas temperaturas) de tejidos y células es una técnica que se ha utilizado desde 1700. Este proceso pone a las células en animación suspendida donde pueden retener su viabilidad y procesos metabólicos indefinidamente (Canario, 2015).

Con la técnica de la desviación de los conductos deferentes se reportó una motilidad de 73.1% (Deza, 2004) y un 73.11% (Quispe, 2008). Quintano (2002) obtiene un 67.37% de motilidad. La vitalidad utilizando la DCD se encontró 60.57% a 37°C y 49.78% a 5°C (Quispe, 2008).



A. Enfriamiento.

Una lenta velocidad de enfriamiento provoca inicialmente la formación de hielo extracelular. Esto motiva concentraciones crecientes de sales y superiores de osmolaridad, así como un cambio de pH del medio líquido extracelular. La salida compensatoria de agua puede provocar alteraciones irreversibles del volumen celular (encogido), el incremento de la concentración iónica intracelular y alteraciones de membrana (Calderón, 2015).

Los enfriamientos rápidos evitan la salida de agua intracelular y origina cristales de hielo intracelular, con la consecuencia de lesiones mecánicas de la membrana espermática. Otra consecuencia puede ser la formación de indeseables estados eutécticos intracelulares. En condiciones prácticas, la velocidad con que se produce los daños por congelación algunas veces menor que la velocidad de congelación calculada en que deberían producirse los núcleos de congelación. Estas discrepancias son para unos atribuibles a la acción de crioprotectores sobre la permeabilidad del agua y la permeabilidad de medios protectores de congelación, dependiente de la temperatura (Busch y Waberski, 2007).

B. Congelación.

Se teoriza respecto a la congelación y descongelación que por lo menos el 50% de los espermatozoides mueren o se hacen inmóviles durante la congelación y su posterior descongelación (Salisbury, *et al.*, 1982); (Gómez, 1984). En semen congelado de camélidos se reportan valores que van de 0 a 40% de recuperación espermática después de su descongelación (Bravo *et al.*, 2000; Santiani, 2003; Aller *et al.*, 2003).



Los espermatozoides actualmente pueden conservarse en nitrógeno líquido a una temperatura baja de -196°C y sobrevivir con fertilidad relativamente alta después de su descongelamiento, sin embargo, muchos de los espermatozoides existentes mueren o se encuentran inmóviles por el efecto de la congelación y descongelación (Gómez, 1984; AX *et al.*, 2000).

C. Descongelación.

La descongelación se realiza por inmersión en baños de agua; la combinación de tiempos y temperaturas, puede ayudar a disminuir el efecto de recristalización presentado por las células espermáticas y el efecto térmico sobre la membrana plasmática.

Durante la exposición al frío se ha observado reducción en la proporción de ácidos grasos saturados e incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados. Cuando aumenta la temperatura, la relación de fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina y los contenidos de colesterol se correlacionan positivamente; estos cambios originan una reorganización de la membrana, lo que ayuda a la célula a sobrevivir a las nuevas temperaturas.

La descongelación rápida minimiza esencialmente los daños por descongelación, ya que se reduce al mínimo la cristalización del agua exterior, lo que podría lesionar la membrana. Un problema potencial de la descongelación lenta son las alteraciones osmóticas, ocasionadas por el ingreso de agua en las células, que se considera superior frente a la salida de agua en la congelación. En la descongelación los espermatozoides están expuestos realmente a un considerable gradiente osmótico que se origina al disminuir la concentración salina del medio circundante. Durante la descongelación lenta, las células están expuestas más



tiempo a un continuado estrés hipoosmótico, sin que la reducción compensadora del volumen que esto lleva consigo pueda provocar una reducción del volumen celular. En términos generales los espermatozoides descongelados a temperaturas elevadas originan superiores resultados. Sin embargo, en un estudio de campo no pudieron evidenciar diferencias entre descongelaciones practicadas a 35°C y temperatura ambiente (Busch y Waberski, 2007). Con respecto a los protocolos de criopreservación en los CSA, el glicerol al 7% ha sido prácticamente el único crioprotector empleado (Bravo *et al.*, 2000a; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2010). En menor medida se ha probado etilenglicol en alpacas (Santiani *et al.*, 2005; 2013). En semen de llama, se ha observado que el agregado del crioprotector N, N-Dimetilformamida conservó la movilidad, vitalidad, integridad funcional de la membrana plasmática espermática y a su vez conservó la integridad y la condensación de la cromatina de los espermatozoides de llama. No lográndose el mismo resultado utilizando glicerol al 7%, en cuyas muestras se obtuvo muy baja movilidad espermática y entre un 87-100% de espermatozoides con el ADN dañado según Carretero *et al.*, (2014).

2.2.2.2. Dilutores y Criopreservadores

A. Dilutores de semen.

Es una solución acuosa que sirve para incrementar el volumen del eyaculado a fin de conseguir las dosis necesarias que se distribuyen en pajillas, preservando las características funcionales de las células espermáticas e el nivel de fertilidad adecuado. Con la finalidad de evitar los daños causados durante el proceso de congelación (Moradi *et al.*, 2013). Un dilutor debe contener un alto contenido de azúcares que



permitan el aporte de nutrientes para el espermatozoide, y bajo peso molecular, tales como glucosa, fructosa y carbohidratos, además tiene que presentar niveles elevados de vitamina C que favorece una función antioxidante (Sumaya *et al.*, 2010) y un pH cercano a 6 hasta su madures (Sáenz, 2006).

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal, el cual le suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica necesaria para el proceso de transporte espermático a través del tracto reproductivo de la hembra. En el eyaculado, esta actividad metabólica solo puede mantenerse durante un tiempo muy limitado. Para mantener los espermatozoides por periodos más prolongados, ya sea por enfriamiento o criopreservación, se hace necesaria e imprescindible la adición de sustancias que prolonguen la vida de estas células germinales. El dilutor es el elemento que contiene las sustancias necesarias para mantener o incrementar la viabilidad espermática (Illera, 1994).

Un buen dilutor debe: Proveer nutrientes como fuente de energía, Proteger a los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento, Mantener un adecuado equilibrio del pH, Mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico, Inhibir el crecimiento bacteriano, Incrementar el volumen de semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones y Proteger a los espermatozoides durante el congelamiento (Hafez, 2002).

LECHE DE VACA

Los dilutores de semen integrados a base de leche son medios isotónicos que contienen muchos componentes favorables al mantenimiento de la viabilidad de los



espermatozoides y fue usado grandemente por investigadores. Para la dilución del semen se puede utilizar leche completa, líquida, desnatada, la crema y varias leches en polvo reconstituidas, con los mismos resultados de fertilidad que los dilutores Yema Citrato. Sin embargo, la fertilidad del semen en leche, declinaba cuando se le mantenía a 5°C, la supervivencia espermática se mejoró con la adición de glicina, sin embargo, no mejoró la fertilidad (Salamon, *et. al.*, 1990). La leche de vaca puede emplearse tanto entera, descremada, UHT o en polvo para reconstituir, siendo esta última la más universal. Las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salomon y Maxwell, 2000).

La leche específicamente de vaca, es utilizada para diluir semen de diferentes especies (Foote, 2002; Salamon y Maxwell, 2000). La leche de vaca es un diluyente ampliamente utilizado, puede emplearse tanto entera, descremada, UHT o en polvo para reconstituir, siendo esta última la más universal (Watson, 2000).

Existen diluyentes a base leche descremada en polvo como Kenney (Hamilton Research Inc, USA) o (E-Z-Mixin ARS, USA) los que son usados comúnmente para la dilución del eyaculado para la inseminación artificial, tanto con semen fresco y refrigerado, para mantener bien la motilidad espermática y la fertilidad. Además de esto, son de preparación simple y de bajo costo (Dinatolo, 2011).

La caseína, la principal proteína de la leche, también tiene un efecto antioxidante (Foote, 2002), y por tanto confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura. Sin embargo, otra proteína presente en la leche, la lactenina,



es tóxica para los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000), es por lo que se recomienda calentar la leche previamente a temperaturas superiores a los 90°C, lo cual inactiva a esa proteína (Salamon y Maxwell, 2000).

Excepto en el caso de la leche UHT, las demás formas de leche han de ser calentadas hasta una temperatura de +92°/+95 °C durante 8- 10 min, sin llegar a hervir (tindalización), con el objetivo de anular los factores tóxicos de su fracción proteica (Maxwell y Evans, 1990).

La leche puede ser usada en forma entera, reconstituida o descremada (Gil *et al.*, 2003). El uso de leche tratada con altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salamon y Maxwell, 2000). Algunos estudios indican que no existen diferencias entre utilizar leche entera pasteurizada y leche descremada (Gil *et al.*, 2003).

YEMA DE HUEVO

Está en casi todo el diluyente por su papel protector y conservador de los espermatozoides está ligado a los compuestos lípido-proteicos y lipídicos de la yema de huevo, igualmente contiene glucosa que puede ser metabolizada por los espermatozoides, ciertas proteínas, vitaminas hidrosolubles y liposolubles las cuales poseen un cierto grado de viscosidad que pueden beneficiar a las células espermáticas (De Alba, 1985). Finalmente se formuló el Tris-Yema de Huevo; pudiéndose este dilutor combinar con yema de huevo para obtener dilutores adecuados para temperaturas que varían desde 25°C a -196°C.



La yema de huevo es un componente básico que está presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación. Se ha usado bien sola o combinada con citrato de sodio o amortiguadores orgánicos en la leche calentada o descremada, y ha sido probada en especies como toro, carnero, macho cabrío, verraco, garañón, camélidos y especies silvestres (Hafez, 2002). Los huevos han de ser frescos, no transcurriendo más de 4 días desde la puesta hasta el momento de su utilización (Maxwell y Evans, 1990).

Los efectos beneficiosos de la yema de huevo para impedir el choque por el frío se debe a los componentes de la yema de huevo (lipoproteínas, fosfolípidos y lecitina), en los diluyentes sus concentraciones oscilan entre 1 a 5% de lipoproteínas, 0.5 a 1% de fosfolípidos y 0.25 a 2.0% de lecitina (Salisbury y Van Dermark, 1978).

La acción protectora de la yema de huevo ha sido atribuida a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Moussa *et al.*, 2002), que evitan el choque térmico y preservan la integridad de la membrana (Watson, 1981). Las LDL están compuestas por 87% de lípidos y 12% de proteínas, y presentan una forma esférica con un centro formado por triglicéridos los que están rodeados por una envoltura de proteínas y fosfolípidos (Hu *et al.*, 2010).

La fracción proteica responsable de la conservación intervendría inhibiendo la formación de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) como consecuencia de la oxidación desaminativa de una molécula de triptófano, de fenilalanina o de tirosina. La yema de huevo contiene igualmente toda una serie de diastasas, especialmente de deshidrogenasa, que intervendrían como substrato de oxidación y como elementos



protectores de enzimas con grupos sulfidrilos y del factor anticoagulante que normalmente está presente en el plasma seminal (Derivaux, 1982).

Se postula que durante la congelación- descongelación, las LDL son desbaratadas y los fosfolípidos son liberados en el medio, y vendrían a formar una cubierta protectora en la superficie de las células espermáticas (Hu *et al.*, 2010).

AZUCARES

Un dilutor debe contener un alto contenido de azúcares que permitan el aporte de nutrientes para el espermatozoide, y bajo peso molecular en la actualidad se ha investigado la utilización de otros agentes crioprotectores menos dañinos, tales como los agentes no permeables dentro de estos azúcares como la rafinosa, trehalosa y sacarosa, estos favorecen la excreción de agua fuera de la célula, a fin de disminuir la formación de cristales de hielo intracelular. La trehalosa es un disacárido no reductor, es producida por diversos organismos en respuesta a condiciones de estrés como: la deshidratación, temperaturas extremas y choque osmótico (Cerrutti, Segovia de Huergo, Galvagno, Schebor, & Buera, 2000). Además, es un estabilizador de biomoléculas, incluyendo proteínas.

Para proveer de energía al espermatozoide, los dilutores de semen deben incluir azúcares del tipo monosacáridos. Siendo la principal fuente de energía la fructosa; sin embargo, los espermatozoides también pueden metabolizar otros monosacáridos como la glucosa y manosa (Hafez, 2002).

Chen *et al.*, 1993, aseveran que las membranas de los espermatozoides son impermeables a los disacáridos, pudiendo causar remoción parcial del agua del



espermatozoide, y así reducir la posibilidad de formación de hielo intracelular. Los azúcares trehalosa y sucrosa causaron pequeñas mejoras en la supervivencia durante el proceso de congelación y descongelación.

SUSTANCIAS AMORTIGUADORAS

El pH ideal para los dilutores debe ser neutro, es decir de 7.0, aunque se aceptan valores que vayan de 6.5 a 7.5, ya que los espermatozoides no sufren ninguna alteración dentro de este parámetro (Salomon y Maxwell, 2000).

Para lograr los valores ya mencionados de pH, se han utilizado al paso del tiempo sustancias amortiguadoras o búfers como el citrato, fosfato y tris, con ventajas para este último (Illera, 1994).

ANTIBIÓTICOS

La contaminación bacteriana puede afectar negativamente la fertilidad, por la propia presencia de bacterias, producción de toxinas, degradación de los componentes del medio o por la utilización de sustratos metabólicos (Silva y Silva, 2012). Esta situación justifica la necesidad de incorporar a los dilutores sustancias de efecto antimicrobiano. Hay una gran variedad de antibióticos disponibles para estos fines, pero los mayormente utilizados y sus cantidades contenidas en los dilutores para semen de rumiantes son 1000 UI/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomicina (Salomòn y Maxwell, 2000).

B. AGENTES CRIOPROTECTORES

El proceso de criopreservación ideal debe preservar, en la mayor proporción posible, la integridad de las diferentes estructuras del espermatozoide. La utilización



de un agente crioprotector es indispensable en la minimización de los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Gao *et al.*, 1995); pues los crioprotectores tienen efectos notables sobre los fenómenos que acompañan a la congelación y la descongelación de las células vivas, proporcionando protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras celulares y extracelulares y en la composición química (Fahy *et al.*, 1990). El agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el shock de frío y el daño producido por la congelación - descongelación (Graham *et al.*, 1987), por lo que usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes debido a que los fosfolípidos y las lipoproteínas de baja densidad poseen un efecto protector contra el shock del frío (Quinn *et al.*, 1980). Además del glicerol existen otros compuestos que poseen propiedades crioprotectoras como por ejemplo el etilenglicol, propilenglicol, dimetilsulfóxido o metanol (Navarro *et al.*, 2004).

GLICEROL

Su función a este nivel consiste en aumentar el volumen del medio extracelular y la proporción de agua en estado de no congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrolitos y por tanto, minimizando los efectos de solución (Mazur, 1984); además, y mediante la estimulación osmótica de la deshidratación celular, consigue disminuir el volumen del agua intracelular disponible para congelarse (Medeiros *et al.*, 2002). El glicerol (Gl) es el crioprotector más utilizado en los protocolos de congelación de semen de prácticamente todas las especies domésticas. Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los compartimentos extra e intracelulares (Mazur, 1984), pero su principal efecto crioprotector se ejerce a nivel extracelular (Amann y Pickett, 1987). Los efectos sobre la osmolaridad celular



no son los únicos, el GL también parece ejercer un efecto directo en la membrana plasmática (Parks y Graham, 1992).

2.2.3. FACTORES QUE AFECTAN AL ESPERMATOZOIDE DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN.

Para obtener buenos resultados de supervivencia espermática y fertilidad de los espermatozoides es necesario comprender a qué tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación, así como la manera en que las células responden a las agresiones físico-químicas y medio ambientales (Stornelli *et al.*,2005).

A. CAMBIOS DE VOLUMEN

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la célula es colocada dentro de un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol. Más tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extracelulares. (Leivo y Dradey, 1999).

B. SHOCK DE FRÍO

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 temperatura debe ser realizado cuidadosamente (Watson,



1981). Este fenómeno es conocido como shock de frío y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie.

El estrés de la membrana puede continuar por debajo de 0°C sin que el cambio de fase sea completo, sin embargo, es bien conocido que los cambios de fase ocurren, en su mayoría, entre los 5°C y 15°C (Dobrins *et al.*, 1993).

C. EL CRIOPROTECTOR Y EL ESTRÉS CELULAR

El crioprotector permite mantener una mayor proporción de agua líquida intracelular a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos y los diluyentes producen un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides (Stornelli *et al.*, 2005).

La magnitud de este hecho está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores. El crioprotector de elección es comúnmente el glicerol, el cual produce una alteración osmótica. A la vez se ha observado que la hiper-osmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador para la reacción del acrosoma (Aitken *et al.*, 1983).

D. ESTRÉS OSMÓTICO

El estrés, inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada (Watson, 1988). Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se integran y el agua



pura se cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y la presión osmótica de la solución restante depende de la temperatura, velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada (Stornelli *et al.*, 2005).

En tal sentido la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevivencia, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo, la tasa de enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua, y prevenir la formación de cristales de hielo intracelular, lo cual es letal para la célula (Holt y North, 1991).

Así también refieren que el porcentaje de células que sobrevive a un proceso de congelación está determinado por la sensibilidad al estrés osmótico durante la adición y remoción de crioprotectores durante el enfriamiento y el recalentamiento (Stornelli *et al.*, 2005). Las células espermáticas poseen mayor permeabilidad al agua que otros tipos celulares (Noiles *et al.*, 1993).

Si bien puede haber diferencias entre especies en la sensibilidad del espermatozoide a la criopreservación, el eyaculado es heterogéneo habiendo una resistencia variable al estrés osmótico entre las células espermáticas (Katkov *et al.*, 1998).

2.2.4. CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACAS.

En alpacas, se ha reportado el uso de distintos dilutores como Lactosa, Biladyl®, Triladyl®, Androhep®, Citrato, TES TRIS y leche descremada, siendo los dos últimos los más comúnmente utilizados; en estos estudios se han obtenido motilidades post



descongelamiento variables de 0 – 31% (Valdivia *et al.*, 1999; Santiani *et al.*, 2005; Ordoñez y Verastegui, 2007; Morton *et al.*, 2010; Banda *et al.*, 2010; Choez *et al.*, 2013; Terreros *et al.*, 2015) tanto para espermatozoides eyaculados como para los obtenidos de la cola del epidídimo. Al parecer no existirían diferencias en motilidad al trabajar con espermatozoides obtenidos del epidídimo con o sin plasma seminal (Rodríguez, 2009), lo que podría justificar el uso de estos espermatozoides como una alternativa para investigar las bases del proceso de congelación y descongelación (Morton *et al.*, 2008).

Choez y Santiani, (2016), mencionan que las concentraciones de 0.9 M de DMSO y 1.16 M de glicerol conservaron mejor las características espermáticas de motilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y viabilidad e integridad de la membrana acrosomal, obteniéndose promedios de 35.83, 51.75 y 38.25 % para el DMSO y de 30.83, 45.00 y 33.75 % para el glicerol y que El etilenglicol al 1.02 M no conservó adecuadamente las características espermáticas de motilidad, integridad funcional de la membrana plasmática y viabilidad e integridad de la membrana acrosomal post descongelamiento, ya que se obtuvieron promedios de 17.42, 32.17 y 21.00 % respectivamente.

Calderón, (2016) concluye que Los porcentajes de motilidad individual adicionando plasma seminal de toro hubo diferencia en los T1 y T3 al momento de la colección 37°C; La integridad de membrana a los 5°C fue mayor para el T2 en comparación al T1. Los resultados obtenidos mediante la adición de plasma seminal de toro, son similares en cuanto a la evaluación de la motilidad progresiva, vitalidad e integridad de acrosoma a la colección 37°C, refrigeración 5°C y descongelación no encontró diferencia.



Terreros *et al.* (2015) en su estudio realizado, evaluó Efecto de Tres Crioprotectores en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. Dimetil Sulfoxido (DMSO), Etilenglicol (EG) y Glicerol (GL) sobre la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Trabajó con testículos de alpacas mayores de tres años. Se separaron los epidídimos y se diseccionaron las colas. Los espermatozoides fueron recuperados con la fracción A del dilutor (leche descremada, yema de huevo y fructosa) y se emplearon las muestras con motilidad espermática igual o mayor a 50% (n=18, motilidad = 69%, integridad funcional de membrana espermática = 48%). La fracción A con los espermatozoides fue refrigerada (1°C/5 min) hasta alcanzar 5°C. Esta fracción se dividió en tres y se añadió un volumen igual de la fracción B conteniendo un crioprotector (DMSO: 7%, 0.9M; EG: 7%, 0.9M; GL: 7%, 1.2M). Se llenaron pajillas de 0.5 ml con la dilución final y se congelaron en nitrógeno líquido. Después de 7 días de almacenamiento, las motilidades posdescongelación fueron de 31, 8 y 24% y los porcentajes de integridad funcional de la membrana espermática fueron de 28, 17 y 26% para DMSO, EG y GL, respectivamente. Se llevó a cabo un ensayo de fecundación *in vitro* con los espermatozoides descongelados de los grupos DMSO y GL, donde la tasa de división a las 72 h posfecundación fue de 47 y 27%, respectivamente, sin diferencias significativas. Los resultados sugieren que el dimetil sulfoxido y el glicerol son agentes crioprotectores más efectivos en comparación al etilenglicol.

Cayllahua *et al.* (2013) mencione que el protocolo que permite obtener mayor cantidad de espermatozoides epididimarios en alpacas viables post- congelamiento fue el de congelamiento tradicional. La motilidad de espermatozoides epididimarios de alpacas Huacaya varía de 83% a 22%, en congelación tradicional, 22% en vitrificación con Glicerol y 00% en vitrificación con Etilenglicol (post- congelación). La concentración de espermatozoides epididimarios de alpacas Huacaya oscila desde los 36 (1 Q6/ml) en



fresco, 28 (1 Q6/ml) en congelación tradicional, 44 (1 Q6/ml) en vitrificación con Glicerol y 24 (1 Q6Jml) en vitrificación con Etilenglicol. En vivos el porcentaje de espermatozoides epididimarios de alpacas Huacaya oscila desde 66% en fresco, 30% en congelación tradicional, 2% en vitrificación con Glicerol y 00% en vitrificación con Etilenglicol.

Choez y Santiani, (2013) midiendo el efecto del tiempo de refrigeración (1,12 y 24 h) sobre el porcentaje de motilidad y funcionalidad de la membrana plasmática de espermatozoides de alpaca obtenido por electroeyaculación, reporta una movilidad de 50.93 ± 11.10 (1h), 38.52 ± 13.57 (12) y 17.89 ± 15.34 (24); en caso de la funcionalidad obtuvo 46.78 ± 13.49 (12h), la refrigeración se realizó a 5°C.

Banda *et al*, (2010) estudiando el efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca menciona, El estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto de tres dilutores (Tris, Tes y leche descremada) en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Previamente se determinó el efecto del tiempo entre el beneficio/castración y la recuperación de los espermatozoides del epidídimo. Se utilizaron 24 testículos de alpacas para la obtención de los espermatozoides directamente del epidídimo en una solución fisiológica buferada (PBS). La recuperación de espermatozoides se realizó a las 0, 35, 48 y 72 horas (6 testículos por grupo) y se evaluó la motilidad, concentración espermática e integridad funcional de membrana.

Los espermatozoides recuperados a partir de 35 horas post beneficio/castración no fueron aptos para ser congelados. Las muestras recuperadas a las 0 horas fueron diluidas



con Tris, Tes y leche descremada, enfriadas desde 35 a 5°C en 90 minutos, envasadas en pajillas de 0.25 ml y congeladas en nitrógeno líquido. Se evaluó la motilidad, integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal en las muestras descongeladas. La motilidad fue de 14.0, 8.6 y 17.0% en los grupos Tris, Tes y leche descremada, respectivamente, donde el grupo leche descremada fue significativamente mejor que el grupo Tes ($p < 0.05$). Los porcentajes de integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal fueron similares entre los tres grupos. Se concluye que los tres dilutores brindan efectos similares para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

Bravo y Alarcón *et al.*, (2013), en el trabajo de investigación preservación de semen y avances recientes en la inseminación artificial de llamas y alpacas, menciona que La preservación de espermatozoides de llamas y alpacas tiene progreso tangible. El dilutor más apropiado parece ser Tris-yema de codorniz. El semen se puede refrigerar una hora antes del proceso de equilibrado con glicerol. El congelamiento se hizo en forma lenta y al descongelamiento 50% de los espermatozoides se observan mótils. Pérez y col, et al (2006), realizaron el trabajo de congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol con el objetivo de determinar la sobrevivencia de los espermatozoides de alpacas y llamas exentos de secreción de las glándulas anexas la congelación. Los espermatozoides fueron colectados por desviación de los conductos deferentes, evaluados, envasados en pajillas de 0.25 ml, se procedió a congelar en vapores de nitrógeno líquido, la descongelación se realizó en baño María a 37 °C por 30 segundos.



La motilidad progresiva a la post descongelación se evaluó adecuando la salida del microscopio a la pantalla de un televisor, los resultados obtenidos fueron: el volumen de 0.263 y 0.418 ml para alpacas y llamas. La concentración fue 25.53 y 40.49 millones de espermatozoides/ml para alpacas y llamas. La morfología de los espermatozoides normales fue: 61.72 % para alpacas y 59.16 para llamas sin diferencia, anormalidades primarias 7.03 % y 15.99% con diferencia y anormalidades secundarias 31.25% y 24.85% similares, en alpacas y llamas respectivamente. La motilidad progresiva inicial (dilución) fue 74.3%, 77.7% y 68.6% en alpacas y 63.0%, 66.9% y 59.1% en llamas con diferencia, a la descongelación varió el índice de recuperación del 18.0% al 43.0% dependiendo del nivel de yema de huevo.

Delgado y Quispe (2015), en su investigación realizada Efecto de Tres Niveles de Glicerol y Tiempos de Equilibramiento Sobre la Viabilidad de Espermatozoides de Llama (*Lama glama*) Post-Descongelado menciona. el presente trabajo pretendió determinar el efecto de tres concentraciones de glicerol (6%, 7% y 8%) y tres tiempos de refrigeración (2, 3 y 4 horas) en el porcentaje de motilidad y de espermatozoides vivos de llama pre y post-congelados utilizando el dilutor citrato - yema de huevo-glucosa y el porcentaje de espermatozoides vivos antes de la congelación no fue afectada por las concentraciones de glicerol ni por los tres tiempos de refrigeración, presentando un promedio general de 64,4% y 71,44% respectivamente. De la misma manera la motilidad espermática y el porcentaje de espermatozoides vivos después de la congelación no fue afectada por las concentraciones de glicerol ni por los tres tiempos de refrigeración, presentando un promedio general de 22.51% y 38,46% respectivamente. Por lo que es indiferente la utilización de 6%, 7% y 8% de glicerol, tampoco influye mantener en equilibrio al semen diluido de llama durante 2, 3 o 4 hrs pues se obtendrá similares resultados.



CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ZONA DE ESTUDIO

El 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 – Puno, que se encuentra ubicado en el distrito de Puno, provincia de Puno, región de Puno, a 3820 m.s.n.m. y geográficamente: latitud sur 15° 49' 34.5” y una longitud oeste de 70° 00' 43.5” en la Meseta de El Collao (SENAMHI, 2012).

3.2. ANIMALES

Se utilizó 3 alpacas machos de la raza Huacaya, mayores a 5 años de edad, de fertilidad comprobada; a los que se les realizó la desviación de los conductos deferentes mediante intervención quirúrgica.

3.3. MATERIAL DE ESTUDIO

Los espermatozoides colectados para el estudio, procedieron del conducto deferente de los 3 machos seleccionados. La distribución a fin de eliminar el efecto macho se distribuyó de la siguiente forma.

Cuadro 1. Registro de las características macroscópicas y microscópicas de los espermatozoides colectados del conducto deferente (0 h) a T° medio ambiente.

MACHOS	LECHE DESCREMADA	LECHE DESCREMADA+20% DE YEMA DE HUEVO	TRIS (control)
M (1)	n=5	n= 5	n= 5
M (2)	n=5	n= 5	n= 5
M (3)	n=5	n= 5	n= 5
TOTAL MUESTRAS	15	15	15



Factores de inclusión: Solo se seleccionaron muestras con > 50% de motilidad, morfología normal $\geq 60\%$.

Factores de exclusión: Se evitarán muestras contaminadas.

Cuadro 2. Registro a 5° C (enfriamiento) la motilidad, integridad de acrosoma integridad de membrana.

MACHOS	LECHE DESCREMADA	LECHE DESCREMADA+20% DE YEMA DE HUEVO	TRIS (control)
M (1)	n=5	n= 5	n= 5
M (2)	n=5	n= 5	n= 5
M (3)	n=5	n= 5	n= 5
TOTAL MUESTRAS	15	15	15

Cuadro 3. Registro a la descongelación la motilidad, integridad de acrosoma, integridad de membrana.

MACHOS	LECHE DESCREMADA	LECHE DESCREMADA+20% DE YEMA DE HUEVO	TRIS (control)
M (1)	n=5	n= 5	n= 5
M (2)	n=5	n= 5	n= 5
M (3)	n=5	n= 5	n= 5
TOTAL MUESTRAS	15	15	15

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Desviación de los conductos deferentes

Para este estudio se realizó la desviación de los conductos deferentes de los 3 machos, para ello se realizó la plastia de los conductos deferentes los cuales fueron fijados por medio de la técnica quirúrgica en la cara interna de la pierna de los animales (Pérez *et al.* 2006) con el siguiente procedimiento:

Se pesaron los machos donadores para calcular la dosificación del tranquilizante (Acepromacina: 0.2 mg/kpv).



- a. Se rasuró el campo operatorio, que comprendió las regiones del hipogástrico, las fosas inguinales y las caras mediales de los muslos. Se sujetó al animal sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal y se realizó la antisepsia del área de intervención quirúrgica con alcohol yodado.
- b. Se insensibilizo el área operatoria con anestésico local (lidocaína al 2%) por infiltración subcutánea a razón de 10 a 15 mL, luego se colocó los campos operatorios.
- c. La técnica quirúrgica fue de la siguiente manera:

Paso 1. Se realizó la incisión la piel 10 a 12 cm delante de los testículos, en una extensión de 3 a 4 cm en la base del pene; se seccionó piel, tejido celular y músculo subcutáneo. Se descubrió y separo la aponeurosis superficial para que los cordones espermáticos quedaran expuestos.

Paso 2. Con ayuda del dedo pulgar y medio se localizó el cordón espermático, luego con dos pinzas hemostáticas mosquito se sujetó la túnica vaginalis que envolvía éste, la cual se seccionó longitudinalmente con una tijera de Metzembraum roma.

Paso 3. Con un estilete se ubicó y separo el conducto deferente de las estructuras que conforman el cordón espermático, una vez que se logró separar la mayor longitud posible, se ligó y secciono. Se dirigió el extremo libre del conducto deferente sobre la cara medial del muslo en un ángulo de 90 grados y se precisó el lugar donde se realizó la implantación.

Paso 4. Acto seguido se introdujo una sonda acanalada por cada uno de los lados de la herida inicial; rotando y empujando hacia adelante con la sonda acanalada se va haciendo un conducto subcutáneo hasta llegar al punto por donde será fijado el conducto deferente en la cara medial del muslo.



Paso 5. Se tomó el extremo libre del conducto deferente con una pinza hemostática mosquito, se condujo a través del conducto subcutáneo hasta sacarlo en la cara medial del muslo. Se suturó la piel de la herida inicial con puntos simples interrumpidos, se fijó el extremo libre del conducto deferente a la cara medial del muslo con tres puntos simples interrumpidos con una sutura absorbible (ácido poliglicólico número 1 cero).

3.4.2. COLECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

Una vez recuperados de la intervención quirúrgica, los machos fueron colectados por masaje de los conductos deferentes a intervalos de 2 veces por semana, los espermatozoides colectados fueron re-suspendidos en los diferentes tratamientos (TRIS, Leche descremada 100% y Leche descremada 75% + Yema de huevo 25%) según corresponda.

- a. La colección de semen se realizó en sombra evitando que los rayos solares incidan sobre los espermatozoides y en el menor tiempo posible, previa a la colección se realizó la estimulación de los machos con presencia de alpacas hembras por un tiempo de 10 min.
- b. El animal fue derribado y colocado en posición decúbito lateral (derecha e izquierda), se limpió la zona de colección utilizando agua bidestilada con la ayuda de una torunda de algodón, luego se secó la zona de colección.
- c. Se colocó vaselina inodora para realizar seguidamente los masajes, aproximadamente desde la cola del epidídimo siguiendo la dirección de los conductos deferentes, facilitando la salida de los espermatozoides.
- d. Con una jeringa de tuberculina adaptada a un tip se aspiró las gotas de espermatozoides que fueron saliendo a medida que se realizaban los masajes.



- e. Luego el semen colectado en la jeringa de tuberculina fue vertido al tubo colector el mismo que contenía 0.5 mL de dilutor atemperada a 37°C. Que al finalizar la colección se colocó vaselina en la fistula de los conductos deferentes para evitar su cicatrización y oclusión.

3.4.3. PREPARACION DE DILUTORES

El tratamiento para la reconstitución de los espermatozoides de alpaca fue preparado en tres proporcione distintas.

T1: 100% de TRIS (v/v).

T2: 100% de Leche descremada (v/v).

T3: 75% de Leche descremada más de 25 Yema de huevo (v/v).

Las muestras de espermatozoides fueron re suspendidas en cada uno de los tratamientos hasta obtener una concentración de 50×10^6 espermatozoides/mL (Kershaw – Young y Maxwell, 2011).

Dilutor “tris-yema”

Cuadro 4. El tris fue preparado para 100 mL de la manera la siguiente:

TRIS (hidroximetil amino mentano)	3.634 g
Ácido cítrico monohidratado	1.99 g
Glucosa	0.5 g
Penicilina	1000000 UI
Estreptomicina	100 mg
Agua destilada	100 ml

Fuente: (Maxwell y Evans 1999)

A cada tubo se le agrego 0.5mL de dilutor según la preparación que a continuación se describe:

- a).- T1 - Dilutor Tris – yema “testigo”.- Se utilizó un tubo de ensayo para colocar 5 mL de dilutor “Tris”.



Para el dilutor Tris se le agregó yema de huevo en una proporción del 20% del total utilizado, se centrifugo a 3,000 rpm por un lapso de 15 minutos.

Después de la centrifugación se separó la parte sobrenadante con una jeringa, la que se colocó en un tubo de ensayo que se llevó a baño María a 37°C.

Se utilizó 0.5 mL como pre-dilución para el tubo en la colección (Fracción "A"). Antes de la congelación se adiciono la fracción "B", el cual contenía la fracción A más el 7% de glicerol.

b).- T2 – Dilutor 100% de Leche descremada.- Se colocó 0.5mL de Leche descremada en el tubo de ensayo, se llevó a baño María a una temperatura de 37°C para realizar la colección (Fracción "A"). Antes de la congelación se adiciono la fracción "B", el cual contenía la fracción "A" más el 7% de glicerol. Se utilizó 0.5 mL como pre-dilución de la mezcla obtenida para el tubo en la colección.

c).- T3 – 75% de Leche descremada + 25% de Yema de huevo.- Para el uso de este tercer tratamiento se colocó 0.35mL de Leche descremada + 0.15mL de Yema de huevo en el tubo de ensayo, se llevó a baño María a una temperatura de 37°C Se utilizó 0.5 ml como pre-dilución para la colección.

3.4.4. Motilidad total y motilidad progresiva

a) La motilidad espermática fue valorada subjetivamente a un objetivo de 400X en un microscopio óptico provisto de una platina térmica graduable, se colocó una alícuota de 10uL de semen sobre una lámina portaobjetos previamente temperada a 37°C y cubierta con una lámina cubreobjetos.

b) La lectura se realizó en tres campos ópticos como mínimo, en los que se contaron a los espermatozoides que tenían movimiento y los que no tenían movimiento para motilidad total y para motilidad progresiva se contó



espermatozoides con un movimiento rectilíneo. En todas las muestras se evaluó la motilidad individual y la motilidad progresiva al momento de la colección, 5°C y descongelación, se contó de 200 espermatozoides en cada muestra (Kershaw – Young and Maxwell, 2011).

c) Una vez concluido el conteo se determinó el porcentaje de motilidad individual y progresiva a través de la fórmula siguiente:

$$MT = \frac{n}{N} \times 100$$

MT = Porcentaje de motilidad total.

n = Número de espermatozoides motiles.

N = Número total de espermatozoides.

3.4.5. Vitalidad espermática

El porcentaje de vitalidad fue determinado por la técnica de coloración eosina – nigrosina:

a) Se trabajó sobre una platina térmica a una temperatura de 37°C, las láminas portaobjetos se calentaron, se colocó 10 uL de colorante tanto eosina y nigrosina.

b) Con la ayuda de una micropipeta se colocó 20 uL de la muestra del predilutor con espermatozoides en el extremo de la lámina porta objetos junto a las gotas de los colorantes, con la punta de una aguja se realizó la mezcla de la muestra primeramente con la eosina y luego con la nigrosina se espera 20 s.

c) Se realizó el frotis de la mezcla del semen coloreado en una lámina portaobjetos, se dejó secar posteriormente fue llevada a lectura en el microscopio para su observación a 1000X con aceite de inmersión y conto 200 espermatozoides.



$$V = \frac{n}{N} \times 100$$

V = Vitalidad espermática.

n = Numero de espermatozoides no coloreados.

N = Número total de espermatozoides

3.4.6. Test Hipoosmótico

a) La evaluación de la integridad de membrana HOST (Swelling Test Hiposmotic) se realizó haciendo uso de un medio hipoósmotico, para ello se utilizará 0.735 g de citrato de sodio, 1.351 g de fructuosa y se completó con agua destilada hasta obtener un volumen de 100 mL (Santiani, 2003).

b) Una vez preparado el medio hipoósmotico se depositó una cantidad de 10 mL en un tubo graduado el mismo que fue temperado en baño María a 37°C, al que se le agrego el semen en un volumen de 0.05 mL e incubado por un tiempo de 30 min.

c) Se tomó una alícuota de 10 uL que fue colocada sobre una lámina porta objetos y observado a un aumento de 400X en un microscopio óptico, contando 200 espermatozoides.

d) Se determinó como espermatozoides con reacción positiva a todos aquellos que tengan la cola hinchada y/o enrollada y por ende fueron considerados de membrana intacta (Jeyendran et al. 1984).

$$TH = \frac{n}{N} \times 100$$

TH = Porcentaje de espermatozoides positivos (colas enrolladas)

n = Numero de espermatozoides con colas enrolladas.

N = Número total de espermatozoides



3.4.7. Integridad de Acrosoma

- a) El porcentaje de integridad de acrosoma fue determinado por la técnica de coloración eosina-nigrosina se colocó 10 uL de muestra, 20 uL de eosina-nigrosina, juntamente se mezcló por un tiempo de 20s.
- b) Se realizó un frotis y con ayuda de un microscopio de contraste de fase a 1000x con aceite de inmersión vinculada a una cámara del propio microscopio, esta imagen fue proyectada a una laptop para realizar la interpretación correspondiente. Se observó a los espermatozoides con integridad de acrosoma intacto, dañados y espermatozoides sin acrosoma contando 200 espermatozoides.

$$IA = \frac{n}{N} \times 100$$

IA = Porcentaje de espermatozoides con integridad de acrosoma.

n = Numero de espermatozoides con integridad de acrosoma.

N = Número total de espermatozoides.

3.4.8. PROCEDIMIENTO PARA LA CONGELACION DE PAGILLAS

A). ENFRIAMIENTO

- a) Las muestras obtenidas fueron llevadas a refrigeración “baño María” en un vaso de precipitado de 300 ml con agua hasta su enfriamiento a 5°C por el lapso de 4 h como promedio para su equilibrado, metodología usada para los tratamientos 1 y 2.
- b) Una vez que la muestra llegó a los 5°C se le adicionó el segundo dilutor, en la misma proporción del dilutor inicial, incluyendo glicerina en un 7% para su equilibrado por un tiempo de 2h.



B). EMPAJILLADO

- a) Las pajillas de 0.25 mL se rotularon con la ayuda de lapiceros de tinta permanente, tomando en consideración al tratamiento y la fecha de congelación.
- b) Se colocaron en tubos de ensayo estériles para su enfriamiento a 5°C. Se procedió al empajillado a una temperatura ambiente de 5°, cogiendo del extremo superior del doble tapón de la pajilla, el extremo libre se colocó dentro de la muestra que contenía los espermatozoides, succionando suavemente hacia el interior de la pajilla, por el lado del doble tapón, teniendo el cuidado de dejar un espacio en el tope de la pajilla.
- c) Se sacó la pajilla del tubo colector, para luego colocar en contacto el extremo inferior de la pajilla o del lado del espacio de aire dejado, con el alcohol polivinílico con el cual se realizó el sellado de la pajilla. Una vez sellado con el alcohol polivinílico, se colocaron las pajillas en una gradilla a una temperatura de 5°C para su estabilización.

C). CONGELACIÓN DE SEMEN

- a) Para la congelación, los espermatozoides re suspendidos en cada uno de los tratamientos fueron diluidos hasta obtener una concentración final de 30×10^6 espermatozoides/mL, para ello fueron diluidos con el dilutor TRIS – yema de huevo.
- b) Se llevó a vapores de nitrógeno líquido a una altura de 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido por un tiempo de 10 min, los espermatozoides fueron sumergidos en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados en un tanque criogénico hasta su evaluación.



D). DESCONGELACIÓN

a) Para la descongelación se realizó un baño María a 37°C donde las pajillas fueron sumergida por un tiempo de 30 s, luego se evaluó la motilidad individual total, motilidad progresiva, la integridad de membrana e integridad de acrosoma.

3.4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para los datos cuantitativos estos se sometieron a medidas de tendencia central como el promedio, y medidas de dispersión como la desviación estándar y el coeficiente de variabilidad. Se utilizó un diseño completamente al azar DCA, para la comparación de medias se utilizó la prueba de Dunnet. Los datos serán procesados a través del software Excel 2016 y analizados a través de IBM SPSS Statistics 22 y Minitab 17; siendo el Modelo aditivo lineal:

$$y_{ij} = u + t_i + e_{ij}$$

Dónde:

i = 1,2 y 3 tratamientos

j = 1, 2, 3, 4, 5 repeticiones.

Y_{ijk} = Es la variable respuesta.

u = Es la media general.

t_i = Es el efecto del i-esimo tratamiento.

E_{ijk} = Es el error experimental.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EFECTO DE LOS DILUTORES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES COLECTADAS A 37 °C.

En la tabla 1, se muestra las medias obtenidas de las características seminales a la pos dilución en los medios dilutores (Tris, Leche descremada 100% y Leche descremada 75% + Yema de Huevo 25%) a una temperatura de 37°C. Observándose una diferencia significativa entre el efecto de los tratamientos ($P \leq 0.05$).

Tabla 1. Efecto de los dilutores sobre las características seminales colectadas a 37°C.

TRATAMIENTO	Tris	LD (100%)	LD (75%) + YH (25%)
Motilidad Total (%)	43.98 ± 3.29 ^a	40.53 ± 3.81 ^a	46.39 ± 2.53 ^a
Motilidad Progresiva (%)	32.35 ± 4.55 ^a	29.94 ± 6.48	41.37 ± 2.03 ^a
Vitalidad (%)	34.73 ± 2.60 ^a	34.39 ± 3.77 ^a	19.92 ± 2.35
Concentración Espermática (x10 ⁶)	77.00 ± 11.4 ^a	61.00 ± 11.1	59.60 ± 4.30
Test Hiposmotico (%)	46.64 ± 5.26 ^a	58.78 ± 3.54	49.57 ± 9.71 ^a
Integridad de Acrosoma (%)	44.79 ± 2.88 ^a	65.67 ± 6.65	54.15 ± 4.06

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

D= Leche Descremada; YH=Yema de Huevo

Los resultados mostrados en la tabla 1, indican que hay un mayor porcentaje de motilidad total y motilidad progresiva en el tratamiento de LD (75%) + YH (25%), seguida del Tris y de LD (100%). El semen de los camélidos sudamericanos (CSA) presenta características limitantes particulares propia de la especie, una de ellas es la extrema filancia y un plasma seminal con alta viscosidad que dificulta el veloz



desplazamiento de los espermatozoides (Banda et al., 2010; Casaretto, Martínez *et al.*, 2012). Al respecto (Bravo, 1995) hace mención que la motilidad total en camélidos no está presente como en el caso de los carneros, sin embargo, esta limitante en observar la motilidad total se minimiza gracias a la técnica de desviación del conducto deferente, (Pérez *et al.*, 2006) demostró que esta técnica facilitaba la evaluación de esta misma, además (Tibary y Memon, 1999) mencionan que la motilidad del espermatozoide aumenta a medida que el eyaculado se vuelve más líquido.

Según a lo mencionado anteriormente se consigue un buen porcentaje de motilidad al diluirse los espermatozoides, esta se hace más pronunciada al diluir semen conseguido directamente de los conductos deferentes, (Quintano, 2002). Quien logro 64.81% a 67.37% de motilidad, mientras que Deza (2006) reporto una motilidad individual 71.89% a través del uso de la técnica de desviación de los conductos deferentes; en el presente estudio la motilidad no se vio afectada en demasía al ser colectada a través de la técnica y directamente trasladada al medio dilutor, obteniéndose una motilidad total de 46.39% y una motilidad progresiva 41.37% con el tratamiento de LD (75%) + YH (25%).

El dilutor que se emplea, juega un papel importante debido al importante suministro de nutrientes que va mantener una elevada actividad metabólica, Según (Illera, 1994), estas sustancias son necesarias para mantener la viabilidad espermática. La proteína de la leche actúa como un buen amortiguador contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salomón y Maxwell, 2000). Así mismo el efecto de la yema de huevo ha sido atribuido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Moussa *et al.*, 2002), que evitan el choque térmico y preservan la integridad de la membrana (Watson, 1981). Las características de ambas sustancias permitirían que no haya un



cambio demasiado pronunciado en la motilidad total e individual, permitiendo una mejora en la calidad de semen diluido.

La vitalidad y concentración espermática mostraron mayores porcentajes para el tratamiento con Tris (100%) seguida de la LD (100%) y LD (75%) + YH (25%). Los valores de vitalidad según a lo reportado por autores como Paricahua (2001), Quintano (2002), Deza (2004) y Quise (2008) fueron 94.25%, 62.47%, 58.25%, y 61.84% respectivamente, los valores son de espermatozoides sin diluir y colectados a través de la técnica de Desviación de los conductos deferentes. Nuestro estudio muestra una inferioridad en un 50% en promedio. Según Bravo *et al.*, (1997), La vitalidad de los espermatozoides es constante y varía desde un 58% a 83%. En el presente estudio los espermatozoides colectados e inmediatamente colocado en los medios de dilución, muestran una similitud entre los tratamientos Tris y LD (100%), mientras que el tratamiento con LD (75%) + YH (25%) obtuvo una vitalidad baja, esto posiblemente se deba a la composición de los diferentes medios, en caso del tratamiento de LD (100%), las proteínas actuarían como amortiguadoras contra los cambios de pH y como agente quelante contra cualquier metal pesado presente (Salomon y Maxwell, 2000), ello explicaría del porque el tratamiento de LD (100%) obtuviera una vitalidad alta inicial después de la colección frente al tratamiento que solo tuvo un 75% de LD; sin embargo al mismo tiempo el tratamiento con LD (100%) tuvo un porcentaje de vitalidad similar al Tratamiento con Tris, lo que sugiere que las proteínas de la Leche descremada ayudaría a la sobrevivencia de los espermatozoides.

Los resultados mostrados para la concentración espermática fueron similares, obteniendo un mayor porcentaje en los tratamientos Tris y LD (100%) y menor en el



tratamiento con LD (75%) + YH (25%), según Tibary y Vaughan (2006), la concentración espermática es variable y se ve afectada por la edad, el método de colección empleado, el número de eyaculaciones al día y el volumen de eyaculado, si bien en el trabajo de investigación se utilizó la técnica de desviación del conducto deferente, se observa una diferencia significativa entre los tratamientos, esta diferencia puede deberse al efecto de los dilutores que fueron distintos tratamientos (Tris ; LD 100%; LD 75% + YH 25%). Aun con los resultados mencionados en el presente estudio, fueron superiores a lo reportado por Quintano (2002) quien utilizando la misma técnica de colección tan solo obtuvo 23.87×10^4 de esp/mm³, Así mismo Paricahua, (2001) y Deza, (2004) reportaron concentraciones de 23.87×10^6 a 25.53×10^6 esp/mm³ con la misma técnica.

Los resultados obtenidos para el Test hiposmótico (Integridad de membrana) y la integridad de Acrosoma muestran un mayor porcentaje para el tratamiento de LD (100%) seguida del LD (75%) + YH (25%) y del Tris.

Los resultados en el presente estudio fueron menores a los reportados por (Rodríguez, 2009), quien obtuvo un porcentaje de 89.08%, y similar a lo reportado por (Giuliano *et al*, 2010), quien menciona un porcentaje de 20 a 62% de integridad de membrana, además, (Giuliano *et al*, 2007a), en llamas indica un 59.70%, así mismo, fueron mayor a lo reportado por (Giuliano *et al*, 2007b), que menciona 33.48% y 30.15%, y también lo obtenido por (Carretero *et al*, 2009). Estos autores trabajaron con la técnica de electro eyaculación y vagina artificial, mientras que en el presente estudio se realizó a través de la técnica de Desviación del Conducto Deferente.



Nuestros resultados muestran una estabilidad en la integridad de membrana, en especial los espermatozoides del tratamiento con LD (100%) seguida de la LD (75%) + YH (25%) y en menor porcentaje el Tris, esta integridad de membrana posiblemente se deba al accionar de las proteínas de la leche, debido a que los tratamientos que presentaban proteína mostraron mejor integridad de membrana frente al tratamiento con Tris; al parecer la presencia de proteína en el medio jugaría un papel importante en la integridad de la membrana, además la concentración de proteína presente en los medios también jugaría un papel importante en la membrana celular, debido a que los tratamientos de LD (100%) y LD (75%) + YH (25%) mostraron una mejor integridad de membrana frente al dilutor Tris. Según Jeyendran et al., (1984), la integridad de la membrana espermática es fundamental importancia en los procesos de fertilización; Petrunkina *et al.*, (2007) menciona que la membrana espermática es de suma importancia, ya que tiene la capacidad de regular el volumen celular, en especial cuando el espermatozoide tiene cambios en el medioambiente debido a que esta varía en osmolaridad.

La integridad acrosómica tuvo unos resultados notablemente diferentes entre los tratamientos, mostrando como mayor porcentaje el tratamiento con LD (100%) (65.67 ± 6.65), seguida de LD (75%) + (25%) (54.15 ± 4.06), y con un menor porcentaje el tratamiento con Tris (44.79 ± 2.88^a), la integridad acrosómica juega un papel importante debido a su participación en el proceso de la fecundación de ovocitos (Garner y Hafez, 2000) por las enzimas que contiene dentro del acrosoma (Hashizume *et al.*, 1990). Según a lo mencionado por Hammerstedt *et al* (1990) el porcentaje de espermatozoides que poseen un acrosoma intacto y que son aptos para exhibir reacción acrosómica hacen de este factor una importante característica seminal. El mantenimiento de la estructura del

acrosoma probablemente se deba a los mismos factores que se mencionaron con anterioridad para la integridad de membrana, no obstante en este trabajo, la concentración de proteína en los dilutores que se emplearon en las pruebas tomaría más importancia, debido a un mayor porcentaje de espermatozoides con una buena integridad acrosomica en los dos tratamientos que contenían proteína dentro de su composición.

4.2. EFECTO DE LOS DILUTORES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES ENFRIADAS HASTA LOS 5°C.

La tabla 2, muestra las medias de las características seminales de las muestras diluidas en Tris, Leche descremada 100% y Leche descremada 75% + Yema de Huevo 25% y enfriadas hasta los 5°C, Observándose una diferencia significativa entre el efecto de los tratamientos ($P>0.05$).

Tabla 2. Características seminales de semen diluido en Tris, Leche descremada 100% y Leche descremada 75% + Yema de Huevo 25% y enfriadas hasta los 5°C.

TRATAMIENTO	Tris	LD (100%)	LD (75%) + YH (25%)
Motilidad Total (%)	33.24 ± 3.62 ^a	42.83 ± 3.42	41.98 ± 1.81
Motilidad Progresiva (%)	26.14 ± 7.03 ^a	41.32 ± 1.30	38.82 ± 2.46
Vitalidad (%)	26.45 ± 6.55 ^a	36.65 ± 8.76 ^a	29.47 ± 3.31 ^a
Test Hiposmotico (%)	33.52 ± 3.57 ^a	66.18 ± 8.23	53.59 ± 1.80
Integridad Acrosomica (%)	41.26 ± 4.54 ^a	72.74 ± 5.29	56.93 ± 11.7

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

LD =Leche descremada; YH= Yema de huevo

La motilidad total y progresiva son mayores en los tratamientos con leche descremada (100%) y seguida con leche descremada (75%) + yema de huevo (25%), menor porcentaje se obtuvo con el tratamiento control (Tris) (Figura 1).



Según a lo mencionado la motilidad total y progresiva no se vería afectados en los tratamientos que presentaban mayores porcentajes de leche descremada, esto posiblemente se deba a la presencia de las proteínas lácteas que mantendrían la estructura y energía de los espermatozoides al momento del enfriamiento hasta los 5°C, así mismo durante la experimentación se observó una mayor actividad en los espermatozoides que estaban en el dilutor con 100% de LD (Tabla 2), no así en el tratamiento con 75% de LD + 25% de YH y el tratamiento control (Tris), lo cual indica que, al no tener una fuente energética, los espermatozoides utilizarían las proteínas como dicha fuente, por lo cual mostraría una mayor actividad el tratamiento con 100% de LD.

El enfriamiento de las células espermáticas puede provocar grandes cambios sobre las características seminales, así como su sobrevivencia, dentro de la célula espermática pueden presentarse cambios de osmolaridad, cambio de pH, entre otros.

Ordóñez et al. (2013) Reporto una motilidad progresiva de 5.90% en Espermatozoides de alpaca refrigerados a 4°C, la muestra de semen obtenida por electroeyaculación, diluido en tris con 25 mL de yema de huevo, estos datos son mucho menores reportados por el autor respecto al presente trabajo.

La vitalidad encontrada en el semen enfriado hasta los 5°C fue mayor en los tratamientos con Leche descremada al 100% y leche descremada (75%) + Yema de huevo (25%), mostrando el tratamiento con Tris un bajo porcentaje de vitalidad (Tabla 2).

Nuestros resultados indican que una mejor resistencia del dilutor al enfriamiento se obtiene con aquellos tratamientos que tienen leche descremada en su composición; durante el enfriamiento se aprecia un factor que puede ser letal para las células espermáticas, denominada como Shock de frío, lo cual se da por el enfriamiento rápido



del semen (entre 30° y 5°C), el cual produce el estrés letal (Watson, 1981), este estrés letal en la célula espermática se vería reducido por la presencia de proteínas de origen lácteo, así mismo, el agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el shock de frío y el daño producido por la congelación - descongelación (Graham *et al.*, 1987), por lo que usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes debido a que los fosfolípidos y las lipoproteínas de baja densidad poseen un efecto protector contra el shock del frío (Quinn *et al.*, 1980). El estrés causado por el enfriamiento, puede provocar la muerte celular o causar que disminuya las características seminales.

La Integridad de membrana (Test Hiposmotico) y la Integridad de Acrosoma mostraron resultados mejores para los tratamientos con leche descremada (100%), y Leche descremada (75%) + Yema de Huevo (25%), mostrando un porcentaje mayor al 50%, no obstante, el tratamiento con Tris mostro un mínimo porcentaje.

Nuestros resultados podrían deberse a una mejor protección a la membrana celular, gracias a la capacidad por la cual proporcionaría e tendría la composición de la leche descremada, la cual, le estaría brindando una estabilidad a la membrana espermática en el proceso del enfriamiento, en el shock de frío la membrana plasmática se ve con cambios que generan importantes modificaciones en su permeabilidad que resultan en alteraciones de las funciones metabólicas. Si bien las células espermáticas resisten más con la adicción de Yema de Huevo al parecer la composición de la leche descremada tendría una mejor capacidad de mantenimiento de la membrana celular, incluyendo la integridad acrosomica, según Foote (2002), la caseína, unas de las proteínas más importantes de la leche también tienen un efecto antioxidante la cual confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura.

4.3. EFECTO DE LOS DILUTORES SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES POST DESCONGELACIÓN.

En la tabla 3 se presentan los datos promedios obtenidos en el presente estudio, donde se evaluó las características seminales por efecto de los dilutores Tris, Leche descremada 100% y Leche descremada 75% + Yema de Huevo 25% post descongeladas, observándose una diferencia significativa entre el efecto de los tratamientos ($P > 0.05$).

Tabla 3. Características seminales de semen diluido en Tris, leche descremada 100% y leche descremada 75% + yema de huevo 25% post descongelación.

TRATAMIENTO	Tris	LD (75%) + YH (25%)
Motilidad Total (%)	17.97 ± 3.64 ^a	27.38 ± 2.12
Motilidad Progresiva (%)	10.82 ± 1.29 ^a	24.27 ± 3.93
Vitalidad (%)	12.30 ± 2.43 ^a	24.01 ± 1.30
Test Hiposmotico (%)	24.26 ± 1.43 ^a	29.41 ± 2.97
Integridad Acrosomica (%)	27.67 ± 2.18 ^a	63.65 ± 4.12

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

LD= Leche descremada; YH=Yema de huevo

En el presente estudio, los resultados superiores fueron en los tratamientos con 75% de Leche + 25% de Yema de huevo, mientras que el tratamiento con 100% de Leche descremada no mostraron resultados.

La motilidad total y progresiva fueron mayores en el tratamiento con 75% de Leche descremada + 25 % de Yema de Huevo, seguida del tratamiento control (Tris) y no mostraron resultados la Leche descremada al 100%.



Los resultados en el presente estudio sobre la motilidad post descongelación resultan ser mayor a lo mencionado por Vaughan *et al.* (2003) y Santiani *et al.* (2005), quienes hacen referencia que los trabajos de criopreservación de semen de alpaca con vagina artificial presentaron resultados de solo 6-20% de motilidad y que raramente superan el 40%, no obstante autores como que llegaron a mencionar hasta 45% (Bravo *et al.*, 1996); además, el uso de diferentes dilutores como la Lactosa, Biladyl®, Triladyl®, Androhep®, Citrato, TES TRIS y leche descremada, muestran resultados sobre la motilidad que van desde 0 a 31%, (Valdivia *et al.*, 1999; Santiani *et al.*, 2005; Ordoñez y Verastegui, 2007; Morton *et al.*, 2010; Banda *et al.*, 2010; Choez *et al.*, 2013; Terreros *et al.*, 2015), observándose que los resultados en el presente estudio estarían dentro de este rango, no obstante, siendo menor a lo reportado por Choez y Santiani (2016), quienes señalan una motilidad de 35.83% en caso del crioprotector DMSO y 30.83% para el glicerol, sin embargo, Banda *et al* (2010) al trabajar con leche descremada solo alcanzo el 17.00%.

La motilidad obtenida después del proceso de descongelación se debe probablemente a que este proceso produce cambios en la morfología espermática. El daño sobre la estructura celular provoca que las células espermáticas no puedan cumplir con sus actividades metabólicas post descongelación, observando una pobre motilidad al final, Dinotelo, (2011) menciona que la Leche descremada comúnmente es utilizada como dilutor para mantener bien la motilidad espermática, además de ser de preparación simple y de bajo costo, si bien las proteínas de la leche actuaron bien en los procesos anteriores a la congelación, la proteína de la leche sola no puede ser un buen crioprotector, es por ello que en el tratamiento con 100% de Leche descremada no se obtuvo resultados por la



mortalidad total de espermatozoides en este grupo a pesar de tener dentro de su base el criopreservante glicerol.

Los grupos que contenían yema de huevo mostraron mejores condiciones, siendo mejor el tratamiento con 75% de Leche descremada + 25% de yema de huevo y el tratamiento control (tris), mostrando una vitalidad mayor para el tratamiento con que contenía mayor porcentaje de yema de huevo. De Alba, (1985) menciona que la yema de huevo es un componente básico que está en casi todo los componentes diluyentes por su papel protector y conservador de los espermatozoides, por los compuestos lipídico – proteicos y lipídicos de la yema de huevo, además de ello menciona, que la presencia de glucosa es metabolizada por los espermatozoides, además posee ciertas proteínas, vitaminas hidrosolubles y liposolubles las cuales poseen un cierto grado de viscosidad que pueden beneficiar a las células espermáticas.

La Integridad de membrana y acrosomal es fundamental para la sobrevivencia, además de ser fundamental e importante en el proceso de fertilización (Jeyendran *et al.*, 1984). Mientras que el acrosoma es un delgado saco membranoso de doble capa que cubre el extremo anterior del núcleo del espermatozoide (Garner y Hafez, 2000). Los resultados en el presente estudio muestran unas células espermáticas con un mayor porcentaje de integridad acrosomica mas no así para la integridad de la membrana, esto probablemente se deba a la acción de los diferentes componentes de la leche descremada y yema de huevo.

Las proteínas y lípidos tendrían un aspecto importante en la protección y conservación de la integridad de la membrana Según Derivaux, (1982), La fracción



proteica responsable de la conservación intervendría inhibiendo la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como consecuencia de la oxidación desaminativa de una molécula de triptófano, de fenilalanina o de tirosina. La yema de huevo contiene igualmente toda una serie de diastasas, especialmente de deshidrogenasa, que intervendrían como sustrato de oxidación y como elementos protectores de enzimas con grupos sulfidrilos y del factor anticoagulante que normalmente está presente en el plasma seminal. Así mismo, La acción protectora de la yema de huevo ha sido atribuida a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Moussa et al., 2002), que evitan el choque térmico y preservan la integridad de la membrana (Watson, 1981). Las LDL están compuestas por 87% de lípidos y 12% de proteínas, y presentan una forma esférica con un centro formado por triglicéridos los que están rodeados por una envoltura de proteínas y fosfolípidos (Hu *et al.*, 2010).

Según a lo mencionado por Hu J-H *et al.*, (2010) y a los resultados obtenidos en nuestro estudio, la composición de la yema de huevo durante la congelación-descongelación, jugaría un papel importante, en especial las LDL que aparentemente serían desbaratadas y los fosfolípidos son liberados en el medio, y vendrían a formar una cubierta protectora en la superficie de las células espermáticas.



V. CONCLUSIONES

- La motilidad total y progresiva son superiores con el tratamiento de leche descremada a 75% y yema de huevo a 25%; la vitalidad y concentración son mayores con el tratamiento control; la integridad de membrana e integridad acrosómica fueron superiores con el tratamiento al 100% de LD, sobre los espermatozoides colectados.
- Las mejores características microscópicas del semen enfriado hasta los 5°C fueron con 100% de leche descremada.
- Las mejores características microscópicas del semen post descongelación fueron con 75% de LD y 25% de yema de huevo.



VI. RECOMENDACIONES

- Se debe tomar en consideración las concentraciones de Leche descremada pura o en combinación (100% y 75%) en el manejo de la criopreservación seminal, donde se deben experimentar nueva combinación de concentraciones.
- Se debe tomar en consideración las concentraciones de Yema de Huevo como el 25% en combinación con otros dilutores en el manejo de la criopreservación seminal, donde se deben experimentar nueva combinación de concentraciones con otros dilutores.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken R.J, Y. F. Wang Liu J. Best F. Richardson D.W. (1983). The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Journal Andrology* 6, Pp. 180-193.
- Amann RP, Pickett BW. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7:145-176.
- Aller J, Rebuffi G, Cancino K, Alberio R. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch Zootec* 52: 15-23.
- AX, R.L., M. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Varner, B. Hafez y M.E. Bellin. (2000) Inseminación artificial, capítulo 25. Reproducción e inseminación artificial en los animales. Editorial Interamericana MC Graw Hill. México.
- Banda J. S, Evangelista, L. Ruiz, R. Sandoval, C. Rodríguez, M. Valdivia, A. Santiani (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 21: 145-153.
- Bravo, PW. (1995). Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. *Camelids. Proceedings 257*. Published by: post graduate foundation in veterinary science. University of Sydney. Australia.
- Bravo P.W, C. Ordonez & V. Alarcón. (1996). Semen processing and freezing of alpacas and llamas. In: 13th ICAR, Sydney, Australia.
- Bravo, PW, D. Flores y C. Ordoñez (1997). Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. *Biol of Reprod.* 57, 520 - 524.
- Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordonez C. (1997b). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Therio* 47:619-626.
- Bravo, PW, C. Rado, V. Alarcón y C. Ordoñez, (2003). Reservas espermáticas en la alpaca. Resúmenes del 111 Congreso mundial sobre camélidos. Potosí. Bolivia.
- Bravo PW, Moscoso R, Alarcon V, Ordoñez C. (2002). Ejaculatory process and related semen characteristics. *Arch Androl* 48:65-72.
- Bravo PW, M. Ccallo, and J. Garnica, (2000). The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Rumin Res*; 38:91-5.



- Bravo W, V. Alarcon (2013) Preservación de semen y avances recientes en la inseminación artificial de llamas y alpacas. Asociación Peruana de Reproducción Animal. *Spermova*. 2013; 3(2): 158 – 160.
- Brown B. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*. Vol. 58,169-195.
- Buendía P, C. Soler, F. Paolicchi, G. Gago, B. Urquieta, F. Perezsanchez, E. Bustos-Obregon, (2002). Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm class analyzer computer-asisted system. *Theriogenology* 57, 1207-1218.
- Busch W, D. Waberski, (2007). Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica. Editorial: Acribia, S.A. Zagoza. España.
- Calderón D. (2015) Efecto de la adición del plasma seminal de toro (*bostaurus*) sobre la viabilidad de los espermatozoides criopreservados colectados de los conductos deferentes en alpacas (*vicugna pacos*). Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. escuela profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Título de Pregrado. Puno. Perú.
- Canario N. (2015) Efecto del proceso de criopreservación sobre las proteínas antioxidantes GPX1 Y GPX4 de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Unidad De Posgrado. Tesis de Postgrado. Lima. Perú.
- Carretero I, S. Giuliano, C. Casaretto, M. Gambarotta and D. Neild. (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *Invet*, 11 (1), p 55-63.
- Carretero M, R. Santa Cruz R, Neild D, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. (2013). Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen en llama (*Lama glama*). *Spermova* 3:174-176.
- Carpio M, C. Ordóñez, V. Alarcón y PW. Bravo, (1999). Presencia de espermatozoides, niveles de testosterona, y tamaño testicular en alpacas. 11 Congrés'o Mundial sobre Camélidos. Comisión Científica Nacional: UNSAAC. Cusca-Perú.
- Casaretto C, D. Lombardo, S. Giuliano, I. Carretero, M. Pinto, V. Trasorras, J. Egey Von Thungen, A. Agüero y M. Miragaya, (2009). Morfometria de la cabeza espermatica de llamas y guanacos. Resúmenes del V Congreso Mundial sobre Camelidos. Riobamba. Ecuador.



- Cayllahua N., Y. Quispe, J. Ruiz (2013) Evaluación de tres protocolos de criopreservación en la viabilidad de espermatozoides epididimarios de alpaca (*vicugna pacos*). Facultad de Ciencias de Ingeniería. Escuela Académico Profesional de Zootecnia. Tesis de pregrado. Huancavelica-Perú.
- Chen Y, Foote RH, Brockett CC. (1993). Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 30:423-431.
- Choez K, S. Evangelista, R. Castillo, A. Santiani (2013). Efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Spermova* 3: 83-84.
- Choez K, A. Santiani (2016) Determinación de la concentración óptima de distintos agentes crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria. Unidad de Posgrado. Tesis de Post grado. Lima. Perú.
- De Alba, J. (1985). Reproducción Animal. Editorial La Prensa Medica Mexicana, México, D. F. 538 pp.
- Deza, H. (2004). Conservación de espermatozoides obtenidos a través del conducto deferente de alpacas (*Lama pacos*) y llamas (*Lama glama*) y posterior viabilidad, Tesis, FMVZ – UNA. Puno - Perú.
- Delgado P. y Quispe Y. (2015). Efecto de Tres Niveles de Glicerol y Tiempos de Equilibramiento Sobre la Viabilidad de Espermatozoides de Llama (*Lama glama*) Post-Descongelado. *Rev. Investig. Altoanfin-* 2015; Vol 17 N° 3: 445-448.
- Derivaux, J. (1982). Reproducción de los animales domésticos: I fisiología II el macho e inseminación artificial, III patología. Editorial Acriba S.A. Zaragoza- España.
- Director A, S. Giuliano, V. Trasorras, I. Carretero, M. Pinto and M. Miragaya, (2007). Electroejaculation in llama (*Lama g/ama*). *Journal of camel practice and research*. Vol 14, n° 2, p 203-206.
- Dobranic T, M. Samardzija, M. Cergolj and N. Prvanovic, (2005). Determination of membrane integrity of canine spermatozoa. *Veterinarski archiv*. 75 (1) 23-30.
- Dobrins EZ, Crowe L.M., Berger T., Anchoroguy T., Oversteet J. W. and Crowe J. H., (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal Exp. Zool*. Pp. 432-437.



- Watson P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 481-92.
- Elwishy A. (1988). Reproduction in the male Dromedary (*Camelus dromedarius*): a review, *Animal Reproduction Science*. vol. 17, pp. 217-241.
- Evangelista O. (2015) Caracterización morfológica de los espermatozoides en alpacas macho (*Vicugna pacos*) de fertilidad comprobada. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ciencias Biológicas Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas. Tesis de Pregrado. Lima. Perú.
- Fahy GM, Lilley TH, Lindsell H, John Douglas MST, Meryman HT. (1990). Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 27:247-268.
- Flores P, J. Garcia-Huidobro, C. Muñoz, E. Bustos -Obregon y B. Urquieta. (2002). Alpaca semen characteristics previous to a mating period. *Anim Reprod Sci*. N° 72; 259-266.
- Fonseca JF, CA. Torres, W. Maffili, AM. Borges, ADF. Santos, MT. Rodrigues. and RFM. Oliveira. (2005). The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim Reprod*. V2, n2, p 139-144.
- Foot, R. H. (2002). Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim. Reprod. Sci*. 75:119 - 139.
- Garner D, E. Hafez. (2000). Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E, Hafez B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7a Ed. México: McGraw Hill. p 33-53
- Gao DY, Liu J, Liu C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser JK. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reprod* 10:1109-1122.
- Garner DL, Hafez ESE. (2002). Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E.S.E., Hafez B., eds. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7a ed. México: McGraw Hill Interamericana. p 98-112.
- Gil J, N. Lundeheim, L. Söderquist, and M. H. Rodríguez. (2003). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 59:1241-1255.



- Giuliano, S, MR. Ferrari, SE. Spirito, SH. Campi, A. Director y H. Fernández. (2007a). avances en la implementación del test hipoosmotico (Has test) en espermatozoides de llama. Avances de investigación. Fac.Cs.Vet. UBA. Buenos Aires. Argentina.
- Giuliano S, A. Director, M. Gambarotta, V. Trasorras and M. Miragaya. (2007b). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci.* 104, 359-369.
- Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. (2008) Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Scien* 2008; 104:359-369.
- Giuliano S, M. Carretero, M. Gambarotta, D. Neild, V. Trasorras, M. Pinto, AND M. Miragaya. (2010): Improvement of llama (*lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Anim Reprod Sci*;118:98 –102.
- Giuliano SM, C. Bisiau, and MI. Carretero. (2012). Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet*; 14(1): 279.
- Gomez, W. R. (1984). Inseminación artificial, Capitulo 10. Reproducción de los animales domésticos. España. Editorial Acribia S.A.
- Graham EF, Schmell MK, Eversen BK, Nelson DS. (1978). Semen preservation in nondomestic mammals. *Symp Zool Soc London* 43:153–82.
- Graham J. K. y Foote R. H. (1987). Effec of severallipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull. *Cryobiol.* Pp. 42-52.
- Hafez ESE. (2002). Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez E.S.E.,Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7 Ed. México. Mc Graw Hill. p 441-452.
- Hashizume T, Tanimura J, Kanematsu S. (1990) Morphological changes of the acrosome in boar spermatozoa during and after cell death. *Jpn J Anim Reprod.* 36: 35-39. 1990.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88.
- Holt W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62: 3–22.
- Holt W.V. y North R.O., (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transition in ram spermatozoa. *Journal Reprod Fert.* Pp. 451- 461.



- Hu J-H, Li Q-W, Zan L-S, Jiang Z-L, An J-H, Wang L-Q, Jia Y-H. (2010). The cryoprotective effect of low- density lipoproteins in extender son bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci* 117:11-17.
- Huanca T, González M, Cárdenas O, Mamani- Cato R, Naveros M, Huanca W. (2013). Uso de la biotecnología reproductiva en la conservación de los recursos genéticos: banco de germoplasma de alpacas de color y llamas. *Spermova* 3:37-40.
- Illera M. (1994). Reproducción de los animales domésticos. 1a Ed. España. AEDOS, p 118- 175
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2012. IV Censo Nacional Agropecuario (IV CENAGRO), Lima Perú.
- Katkov I, Katkova N., Cristales J. K. and Mazur P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicitys, osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Journal Cryobiology*. Pp. 325-338
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez- Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 70: 219-228.
- Leivo S. P, Dradey L. (1999). Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa in Gagnon The male gamete. *Me gill University*. Pp. 502-517.
- LICHTENWALNER, AB., GL. WOODS y JA. WEBER. (1996). Ejaculatory pattern of llamas during copulation. *Theriogenology*. 46: 286-291.
- LUBOS H. (1983). Bases de la reproducción bovina, Primera Edición, Editorial Diana, México.
- Mann T, Lutwak-Mann C. (1981)Male reproductive function and semen. Springer-Verlag. Berlin (Germany). 1981.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247:125-142.
- Mazur F. (1984) Cryobiology; the freezing of biological system. *Science*. Pp. 949-963.
- Marín, J.C, B. Zapata, B.A. González, C. Bonacic, J.C. Wheeler, C. Casey, M.W. Bruford, R.E. Palma, E. Poulin, M.A. Alliende y A.E. Spotorno. (2007). «Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular». *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 121-140.



- Maxwell WMC, Evans O. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia S.A. Madrid. Can 34:19-32.
- Mc Evoy T, Kyle C, Slater D, Adam C, Bourke D. (1992). Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. J Reprod Fert 9:48
- Medeiros CMO, F. Forell, ATD Oliveira, JL. Rodriguez (2002). Current status of cryopreservation: why isn't it better?. Therio 57:327-344.
- Morton K.M, J.L. Vaughan, W.M. Maxwell (2008). Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 08/057. Project No. US-138A.
- Morton K, Evans G, Maxwell W. (2010). Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen- thawed epididymal alpaca sperm. Therio 74:311-316.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen- thawed bull semen. Therio 57:1695-1706.
- Navarro Osear J., Velasco Santamaría M. Yohana y Cruz Casallas Pablo E. (2004). Evaluación de cinco protectores para la criopreservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachy pomus*). Facultad de Ciencias Agropecuaria, Universidad de los Llanos. Colombia. Pp. 1 ,2.
- Noiles E. E, Mazur P., Watson P. F. Kleinhans F. W. and Crister J. K. (1993).Determination of water permeability coefficient for human spertoza and itsactivation energy. Biol Reprod. Pp. 99-109.
- Ordoñez M J, Verastegui H J. (2007). Efecto de los crioprotectores (Glicerol y Etilenglicol) en la criopreservación de semen de alpaca (*Lama pacos*). Tesis de Ingeniero Zootecnista. Huancavelica: Univ. Nac. de Huancavelica. 55p.
- Ordoñez, M J. (2013). Efecto de los crioprotectores en la criopreservación de semen de alpaca.
- Pacheco, JI. (2008). Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. REDVET, Vol IX, n° 4. pp 1-17.
- Pacheco JI, H. Deza, R. Mamani, y Y. Quispe (2011). Evaluación de la respuesta del test hipoosmótico en espermatozoides frescos de alpaca. Resúmenes del XXXIV Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de producción Animal. APPA Trujillo-Perú.



- Parks JE, Graham JK. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Therio* 38:249-222.
- Paricahua, E. (2001). Evaluación del semen sin la secreción de las glándulas anexas en alpacas (*Lama pacos*), Tesis de la FMVZ- UNA, Puno - Perú.
- Pasco, ME. (2001). Desarrollo histológico testicular y características biométricas en alpacas desde el nacimiento al año de edad. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. FMV-UNMSM. Perú.
- Pérez G, T. Quispe, L. Olivera, J. Zevallos, U.Pérez (2006) Resumen del I Simposium Internacional en camélidos Sudamericanos, realizado del 1 al 3 de Octubre del 2006. Cusco-Perú. CD.
- Perez, M. Apaza, E.; Deza, H. (2006). Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en el buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol. 11 simposio internacional de investigación sobre camélidos sudamericanos. Arequipa- Perú. Pp. 221.
- Pérez MG, Apaza E, Deza H. (2006) Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos. *Allpaqa*, revista de investigación del IIPC, 2006; Vol. 11 Nro 01. p. 17-23. Puno Perú.
- Petrunkina, AM., D. Waberski, AR. Günzel-Apel and K. Topferpetersen. (2007). Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction* 134, 3-17.
- Quinn P. J., Chow P. Y. and White I. G. (1980). Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. *Journal Reprod. Fertil.* Pp. 403-407.
- 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, Y. (2008). Capacidad fecundante de los espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) empleando dos dilutores comerciales. Tesis de la FMVZ- UNA, Puno - Perú.
- Quispe, F. (1987). Evaluación de las características físicas del semen de alpaca durante la época de empadre, Tesis de la FMVZ- UNA, Puno - Perú.
- Rodríguez, C. (2009). Efecto del plasma seminal sobre la sobrevivencia de espermatozoides criopreservados de Alpaca “*Vicugna pacos*”. Tesis de Maestría.



- Unidad de Post Grado. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú.
- Rubio, J., González, D., & Quintero, A. (2009). Rev. Científ. FCV-LUZ XIX(4): 382-389
- Rojas, E. (1998). Determinación de la temperatura testicular y su influencia sobre la espermatogénesis en alpacas de la raza huacaya. Tesis Med.Vet. Zootec. UNA-Puno. Perú.
- Terreros M, W. Huanca, I. Arriaga, A. Ampuero (2015). Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Rev Inv Vet Perú 26: 420-426
- Tibary A, Memon MA. (1999). Reproduction in the male South American Camelidae. J. Camel Prac. Res.6:235-248.
- Tibary A, Vaughan J. (2006). Reproductive physiology and infertility in male south American camelids: A review and clinical observations. Small Rumin Res 61:283-298.
- Salisbury, G.L. Van Dermack Y J. Lodge. (1982). Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bóvidos, traducido por José María Torzona Vilas, Segunda Edición, Editorial Acribia, Zaragoza – España.
- Santiani, A. (2003). Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias mención en Biología de la reproducción. Facultad de Medicina-Universidad de la Frontera. Temuco-Chile. 95p.
- Santiani A, Huanca W, Sapan 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 J Androl 7:303-309.
- Salamon S, Maxwell WMC. (2000). Storage of ram semen. Anim Reprod Sci 62:77-111.
- Salisbury, G. and N. Van Dermack. (1978). Fisiología de la reproducción e inseminación artificial. De los bóvidos. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- Senger, PL. (2003). Pathways to pregnancy and parturition. Second edition revised. Current Conceptions, inc. Pullman, Washington, USA.



- Silva AR, Silva HV. (2012). Avances en criopreservación de semen en caninos. *Spermova* 2:13-18.
- Smith, B. (1999). Overview of reproduction in the male llama and alpaca. *Proceedings of the Society for Theriogenology*. pp. 191-196.
- Stornelli M. C., Tittarell C. M., Savignose C. A. y Stornelli M.A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. Facultad de Ciencias de veterinaria, Universidad Nacional de La Plata. Argentina. Pp. 28-35
- Sumar J. (1996). Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*.vol.42, p.405-415
- Urquieta, B., P, Flores, C. Muñoz, E. Bustos-Obregon Y J. Garcia-Huidobro. (2005). Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a mating period. *Anim Reprod Sci*. 90: 329-339.
- Valdivia M, Ruiz M, Bermudez L, Quinteros S, Gonzáles A. (1999). Criopreservación de semen de alpacas. *Proc II Congreso sobre camélidos, Cusco-Perú*.
- Vaughan J.L, D. Galloway & D. Hopkins. (2003). Artificial insemination in alpacas (Lama pacos). Rural Industries Research and Development Corporation. Kingston, ACT, Australia.
- Watson PF. (1981). The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg- yolk lipoprotein. *J Reprod Fert* 62:483-492.
- Watson P.F. (1988). Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Journal Cryobiology*. Pp. 131-142.
- Watson PF. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60:481- 492.
- Yanagimachi R. (1994) Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2: 371-372. 1994.
- Zhu, W., &Liu, X. (2000). *Asian J Androl*. 2: 135-138.

ANEXOS



Imagen 01. Alpacas Machos seleccionados para la desviación del conducto deferente



Imagen 02. Preparación de la alpaca macho, previa a la cirugía



Imagen 03. Desviación del conducto deferente a través de cirugía



Imagen 04. Masaje del conducto deferente para la obtención de muestras seminales



Imagen 05. Muestra espermática



Imagen 06. Obtención de muestra espermática

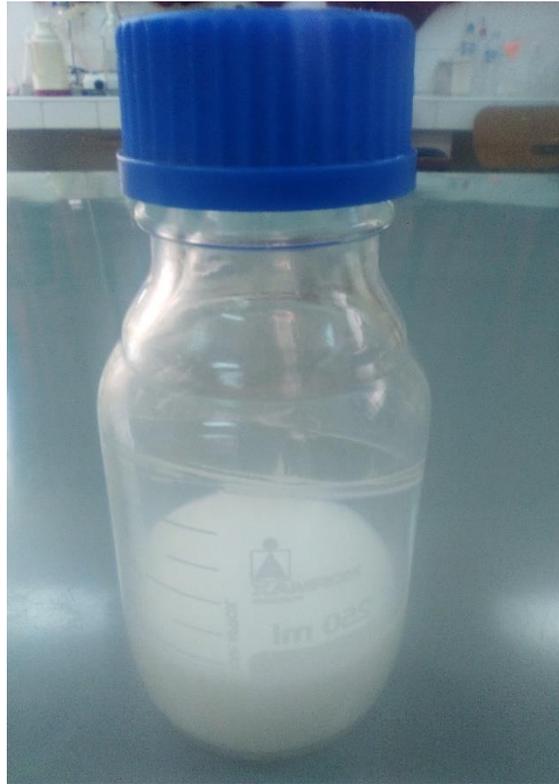


Imagen 07. Dilutor a base de leche descremada



Imagen 08. Preparación de dilutores



Imagen 09. Colocación de dilutores en la centrifuga



Imagen 10. Espermatozoides observados al microscopio

ESPERMIOGRAMA DE ALPACA

DILUTOR TRIS (100%)

REPET.	Colecta a 37°C					Enfriamiento a T° de 5°C					Post descongelación					
	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	Concentra.	T. H	I. Ac	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H	I. Ac	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H	I. Ac
1	39.1	26.2	34.12	83000000	54.2	48.8	23.14	20.21	15.23	30.21	35.24	15.32	10.45	13.85	15.12	29.45
2	45.2	31.45	33.2	74000000	41.94	45.62	37.03	30.24	30.56	35.26	45.8	13.54	9.45	10.06	25.31	23.83
3	46.6	37.5	33.12	73000000	45.2	45.26	30.66	18.25	26.31	30.11	38.91	11.29	9.54	10.7	18.45	25.13
4	46.8	36.12	39.31	80000000	49.7	41.11	40.21	35.26	31.2	33.45	40.65	22.51	11.26	18.5	25.07	24.31
5	42.2	30.5	33.9	75000000	42.15	43.15	35.16	26.75	28.95	38.56	45.7	9.15	8.54	9.45	26.12	20.45

LECHE DESCREMADA (100%)

REPET.	Colecta a 37°C					Enfriamiento a T° de 5°C					Post descongelación					
	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	Concentra.	T. H	I. Ac	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H	I. Ac	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H	I. Ac
1	38.06	29.92	34.86	55000000	59.26	60.55	48.50	40.96	25.0	52.74	77.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	37.30	20.65	33.76	60000000	59.47	0.00	41.54	37.71	54.22	62.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	38.12	27.68	40.54	50000000	63.01	61.90	43.40	35.28	53.54	62.34	58.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	45.74	33.49	32.0	80000000	53.20	65.00	39.88	37.34	48.82	56.39	61.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	43.44	37.94	30.81	60000000	58.68	75.25	40.83	31.97	38.12	60.26	67.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

LECHE DESCREMADA 75% + YEMA DE HUEVO 25%

REPET.	Colecta a 37°C						Enfriamiento a T° de 5°C						Post descongelación					
	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	Concentra.	T. H	I. Ac	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H	I. Ac	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H	I. Ac		
1	43.13	43.6	22.42	65000000	49.04	57.65	44.36	36.93	28.18	53.97	59.75	24.87	30.85	21.81	25.64	59.13		
2	48.97	43.2	19.42	50000000	50.36	51.93	41.65	39.22	38.63	51.21	49.07	29.98	20.57	24.77	30.19	63.01		
3	47.23	40.14	16.21	48000000	50.73	48.68	40.23	35.69	38.41	55.22	66.07	26.18	22.99	25.00	32.94	66.60		
4	44.35	38.53	21.17	75000000	49.38	58.5	43.3	40.92	20.9	48.16	68.91	29.14	24.44	24.65	27.16	68.88		
5	48.26	41.35	20.37	60000000	48.35	53.98	40	41	21.22	59.4	40.84		22.50	23.86	31.14	60.62		
												26.76						

CORRIDA CON SOFTWARE MINITAB 17

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N°	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.4398	A
Leche descremada + huevo	5	0.4639	A
Leche descremada	5	0.4053	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

Espermatozoides colectados a una t° de 37°C**1. Motilidad total**

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.008663	0.004332	4.10	0.044
Error	12	0.012689	0.001057		
Total	14	0.021352			

Medias				
Tratamiento	N	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.4053	0.0381	(0.3736; 0.4370)
Leche descremada + huevo	5	0.4639	0.0253	(0.4322; 0.4956)
Tris	5	0.4398	0.0329	(0.4081; 0.4715)

2. Motilidad progresiva

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.03635	0.018176	8.16	0.006
Error	12	0.02673	0.002227		
Total	14	0.06308			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.2994	0.0648	(0.2534;0.3453)
Leche descremada + huevo	5	0.41376	0.02031	(0.36777;0.45975)
Tris	5	0.3235	0.0455	(0.2776;0.3695)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.3235	A
Leche descremada + huevo	5	0.4137	
Leche descremada	5	0.2994	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

3. Vitalidad espermática



Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.07151	0.035755	40.49	0.000
Error	12	0.01060	0.000883		
Total	14	0.08211			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.3439	0.0377	(0.3150; 0.3729)
Leche descremada + huevo	5	0.1992	0.0235	(0.1702; 0.2281)
Tris	5	0.3473	0.0260	(0.3183; 0.3763)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.3473	A
LECHE DESCREMADA	5	0.3439	A
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.1992	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

4. Concentración

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	9.34533E+14	4.67267E+14	5.16	0.024
Error	12	1.08720E+15	9.06000E+13		
Total	14	2.02173E+15			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	61000000	11401754	(51725318; 70274682)
Leche descremada + huevo	5	59600000	11104053	(50325318; 68874682)
Tris	5	77000000	4301163	(67725318; 86274682)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	77000000	A
LECHE DESCREMADA	5	61000000	
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	59600000	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

5. Test. De hipoósmotico

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.04012	0.020062	14.61	0.001
Error	12	0.01648	0.001373		
Total	14	0.05660			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.5878	0.0354	(0.5517; 0.6239)
Leche descremada + huevo	5	0.49572	0.00971	(0.45961; 0.53183)
Tris	5	0.4664	0.0526	(0.4303; 0.5025)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.4664	A
LECHE DESCREMADA	5	0.5878	
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.49572	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

6. Integridad acrosómica

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.09695	0.048475	22.99	0.000
Error	12	0.02319	0.002108		
Total	14	0.12014			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.6567	0.0665	(0.6062; 0.7073)
Leche descremada + huevo	5	0.5415	0.0406	(0.4963; 0.5867)
Tris	5	0.4479	0.0288	(0.4027; 0.4931)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.4479	A
LECHE DESCREMADA	4	0.6567	
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.5415	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control



CORRIDA CON SOFTWARE MINITAB 17 Espermatozoides enfiada a T° 5°C

1. Motilidad total

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.02818	0.014092	7.19	0.009
Error	12	0.02353	0.001961		
Total	14	0.05172			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.4283	0.0342	(0.3852; 0.4714)
Leche descremada + huevo	5	0.41982	0.01815	(0.37667; 0.46297)
Tris	5	0.3324	0.0662	(0.2893; 0.3755)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.3324	A
LECHE DESCREMADA	5	0.4283	
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.41982	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

2. Motilidad progresiva

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.06624	0.033119	17.36	0.000
Error	12	0.02289	0.001907		
Total	14	0.08913			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.41322	0.01306	(0.37067; 0.45577)
Leche descremada + huevo	5	0.3882	0.0246	(0.3456; 0.4308)
Tris	5	0.2614	0.0703	(0.2189; 0.3040)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.2614	A
LECHE DESCREMADA	5	0.41322	
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.3882	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control



3. Vitalidad espermática

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.02747	0.013733	3.15	0.079
Error	12	0.05226	0.004355		
Total	14	0.07972			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.3665	0.0331	(0.3022; 0.4308)
Leche descremada + huevo	5	0.2947	0.0876	(0.2304; 0.3590)
Tris	5	0.2645	0.0655	(0.2002; 0.3288)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.2645	A
LECHE DESCREMADA	5	0.3665	A
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.2947	A

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

4. Test hipoosmótica

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.24705	0.123525	50.82	0.000
Error	11	0.02673	0.002430		
Total	13	0.27378			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	4	0.6618	0.0823	(0.6076; 0.7161)
Leche descremada + huevo	5	0.5359	0.01808	(0.48745; 0.58451)
Tris	5	0.3352	0.0357	(0.2867; 0.3837)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.3352	A
LECHE DESCREMADA	4	0.6618	
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.5359	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

5. Integración acrosómica

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.22116	0.110579	16.85	0.000
Error	11	0.07220	0.006563		
Total	13	0.29336			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	4	0.7274	0.0529	(0.6383; 0.8166)
Leche descremada + huevo	5	0.5693	0.1179	(0.4895; 0.6490)
Tris	5	0.4126	0.0454	(0.3329; 0.4923)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.4126	A
LECHE DESCREMADA	4	0.7274	
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.5693	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

CORRIDA CON SOFTWARE MINITAB 17

Espermatozoides post descongelación

1. Motilidad total

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.193607	0.096804	163.76	0.000
Error	12	0.007094	0.000591		
Total	14	0.200701			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.000000	0.000000	(-0.023691; 0.023691)
Leche descremada + huevo	5	0.27386	0.02120	(0.25017; 0.29755)
Tris	5	0.1797	0.0364	(0.1560; 0.2034)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.1797	A
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.27386	
LECHE DESCREMADA	5	0.000000	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control



2. Motilidad progresiva

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.147833	0.073916	129.43	0.000
Error	12	0.006853	0.000571		
Total	14	0.154686			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.000000	0.000000	(-0.023286; 0.023286)
Leche descremada + huevo	5	0.2427	0.0393	(0.2194; 0.2660)
Tris	5	0.10822	0.01299	(0.08493; 0.13151)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.10822	A
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.2427	
LECHE DESCREMADA	5	0.000000	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

3. Motilidad progresiva

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.144244	0.072122	285.07	0.000
Error	12	0.003036	0.000253		
Total	14	0.147279			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.000000	0.000000	(-0.015499; 0.015499)
Leche descremada + huevo	5	0.24018	0.01307	(0.22468; 0.25568)
Tris	5	0.1230	0.0243	(0.1075; 0.1385)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.1230	A
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.24018	
LECHE DESCREMADA	5	0.000000	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

4. Test. De hipoosmótica

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	0.246767	0.123383	339.72	0.000
Error	12	0.004358	0.000363		
Total	14	0.251125			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.000000	0.000000	(-0.018570; 0.018570)
Leche descremada + huevo	5	0.2941	0.0297	(0.2756; 0.3127)
Tris	5	0.24268	0.01436	(0.22411; 0.26125)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.24268	A
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.2941	
LECHE DESCREMADA	5	0.000000	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control

5. Integridad acrosómica

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
TRATAMIENTO	2	1.01851	0.509254	702.48	0.000
Error	12	0.00870	0.000725		
Total	14	1.02721			

Medias				
Tratamiento	n	Media	Desv. Est.	IC de 95%
Leche descremada	5	0.000000	0.000000	(-0.026235; 0.026235)
Leche descremada + huevo	5	0.6365	0.0412	(0.6102; 0.6627)
Tris	5	0.27674	0.02185	(0.25050; 0.30298)

Comparaciones múltiples de Dunnet con un control			
Tratamiento	N	Media	Agrupación
Tris (control)	5	0.27674	A
LECHE DESCREMADA + HUEVO	5	0.6365	
LECHE DESCREMADA	5	0.000000	

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel control