

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“EFECTO DE LA ADICIÓN DEL PLASMA SEMINAL DE TORO (*Bos taurus*) SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS COLECTADOS DE LOS CONDUCTOS DEFERENTES EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)”

TESIS

PRESENTADO POR:

Bach. DARWIN WASHINGTON CALDERÓN ANTEZANA

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2015

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

TESIS

**“EFECTO DE LA ADICIÓN DEL PLASMA SEMINAL DE TORO (Bos taurus)
SOBRE LA VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS
COLECTADOS DE LOS CONDUCTOS DEFERENTES EN ALPACAS (Vicugna
pacos)”**

PRESENTADO POR:

Bach. DARWIN WASHINGTON CALDERÓN ANTEZANA.

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

SUSTENTADO Y APROVADO ANTE EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE

:



Dr. Natalio Luque Mamani.

PRIMER MIEMBRO

:



Mg. Jesus Martin Urviola Sánchez.

SEGUNDO MIEMBRO

:



Mg. Sc. Uri Harold Pérez Guerra.

DIRECTOR DE TESIS

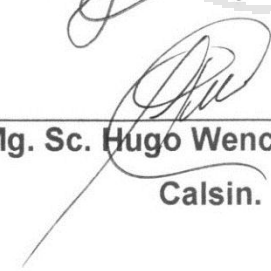
:



Dr. Manuel Guido Pérez Durand.

ASESOR

:



**Mg. Sc. Hugo Wenceslao Deza
Calsin.**

ÁREA : Reproducción animal

TEMA : Conservación de gametos

DEDICATORIA

A mis queridos padres José Washington y Rosa Lourdes, con aprecio, cariño, respeto y eterna gratitud; por haber forjado mi anhelo profesional.



Con cariño y aprecio a mis hermanos Darcy, Erika y Denisse Meilu por el apoyo incondicional y mi deseo de superación. También dedicar con mucho cariño a una persona muy especial que siempre recibí apoyo incondicional en los momentos difíciles de mi vida y en esta nueva etapa, a mi señorita enamorada Lizeth Noelia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Altiplano, por ser el alma formadora de personas, intelectual y espiritualmente, en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al Dr. Manuel Guido Pérez Durand, por su acertada dirección y apoyo incondicional en la realización del presente trabajo.

Al Mg. Sc. Hugo Wenceslao Deza Calsin por su apoyo y asesoramiento en el presente trabajo.

Al Mg. Sc. Uri Harol Pérez Guerra por su apoyo y asesoramiento en el presente trabajo.

Al cuerpo de docentes de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por sus valiosas enseñanzas y guía en el logro de mi profesión.

Finalmente, a todas las personas y amigos; que directa e indirectamente contribuyeron a la culminación del presente trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por la compañía, los buenos ratos, y la grandiosa amistad que cultivamos, a Rassiel, Jhunion, Armando y Jorge Dick, y a todos los amigos de quienes he recibido siempre un inmenso cariño y apoyo incondicional.

Darwin.....

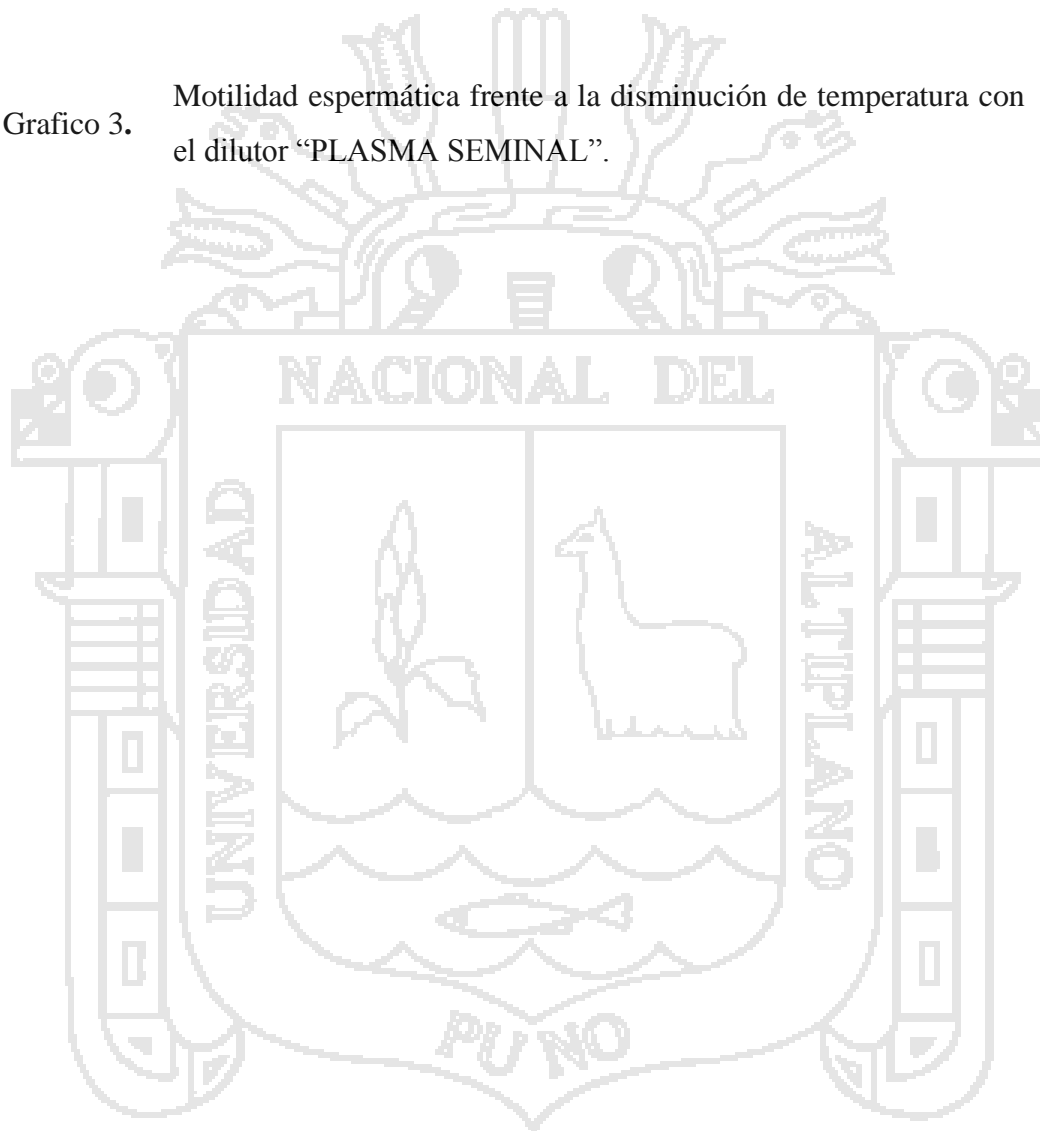
ÍNDICE

ÍNDICE	iIII
LISTA DE GRAFICOS	V
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO	5
2.1.1 Testículos	5
2.1.2 Pene	5
2.1.3 Epididimo	5
2.1.4 Conducto deferente	6
2.1.5 Glándulas accesorias	7
2.2. FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO	8
2.2.1 Pubertad	8
2.2.2 Espermatogénesis	8
2.2.3 Plasma seminal	10
2.3. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL SEMEN	12
2.3.1 Volumen	12
2.3.2 Color	12
2.3.3 Aspecto	13
2.4. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN	13
2.4.1 Motilidad individual	13
2.4.2 Vitalidad	14
2.4.3 Test Hiposmotico	14
2.4.4 Integridad de acrosoma	15
2.4.5 Concentración espermática	16
2.5. CONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES	17
2.5.1 Enfriamiento	17
2.5.2 Congelación	18
2.5.3 Descongelación	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Lugar de estudio	20
3.2 Animales	20
3.3 METODOLOGÍA	20
3.3.1 Desviación de los conductos deferentes	20
3.3.2 Colección de espermatozoides	22
3.3.3 Plasma seminal	23

3.3.4 Preparación de las diferentes proporciones de plasma seminal	23
3.3.5 Motilidad total y motilidad progresiva	25
3.3.6 Vitalidad espermática	26
3.3.8 Integridad de acrosoma	27
3.3.9 Conservación de espermatozoides	28
3.3.10 Análisis estadístico	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	31
4.1. RESULTADOS A LA COLECCIÓN 37°C	31
4.1.1 Motilidad individual.	31
4.1.2 Motilidad progresiva.....	35
4.1.3 Vitalidad.....	36
4.1.4 Test – Hiposmotico.....	38
4.1.5 Integridad de acrosoma.....	40
4.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA A 5° GRADOS	42
4.2.1 Motilidad individual	42
4.2.2 Motilidad progresiva.....	44
4.2.3 Vitalidad.....	45
4.2.4 Test-hiposmotico	46
4.2.5 Integridad de acrosoma	47
4.3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA A LA DESCONGELACIÓN.....	48
4.3.1 Motilidad individual	48
4.3.2 Motilidad progresiva.....	51
4.3.4 Test-hiposmotico	54
4.3.5 Integridad de Acrosoma.....	55
V. CONCLUSIONES	60
VI. RECOMENDACIONES.....	61
VII. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	62
ANEXOS	76

LISTA DE GRAFICOS

	Pag.
Grafico 1. Motilidad espermática frente a la disminución de temperatura con el dilutor “TRIS”.	58
Grafico 2. Motilidad espermática frente a la disminución de temperatura con el dilutor “TRIS + PLASMA SEMINAL”.	58
Grafico 3. Motilidad espermática frente a la disminución de temperatura con el dilutor “PLASMA SEMINAL”.	59



RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.N.A. – Puno; se evaluó el efecto de los tres tratamientos; T1: Tris yema (testigo), T2: Tris yema + plasma seminal de bovino, T3: Plasma seminal de bovino; para ello se utilizó 3 alpacas macho de la raza Suri, mayores a 5 años de edad, a los que se sometió a la plastia de desvío de los conductos deferentes, la colección fue realizada en una fracción de 0.5 ml de cada tratamiento. La motilidad individual de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 43.98%(T1), 37.80%(T2) fueron superiores en comparación con 31.42%(T3) ($p \leq 0.05$), a la refrigeración 5°C fue 33.24%(T1) y 34.20%(T2) fueron similares ($p \geq 0.05$), a la descongelación 14.46%(T1) y 15.66%(T2) fueron similares ($p \geq 0.05$). La motilidad progresiva de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 32.35%(T1), 31.42%(T2) y 31.42%(T3) fueron similares ($p \geq 0.05$), a la refrigeración 5°C fue 26.14%(T1) y 24.03%(T2) fueron similares ($p \geq 0.05$), a la descongelación 9.97%(T1) y 11.22%(T2) fueron similares ($p \geq 0.05$). La vitalidad de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 34.73%(T1), 37.15%(T2) y 28.15%(T3) fueron similares ($p \geq 0.05$), a la refrigeración 5°C fue 26.45%(T1) fue inferior en comparación con 33.90%(T2) ($p \leq 0.05$), al momento de la descongelación fue 12.67%(T1) y 14.74%(T2) fueron similares ($p \geq 0.05$). La integridad de membrana (prueba de HOST) de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 46.63%(T1), 46.03%(T2) y 41.43%(T3) fueron similares ($p \geq 0.05$), a la refrigeración 5°C fue 33.51%(T1) fueron inferior en comparación al 40.10%(T2) ($p \leq 0.05$), al momento de la descongelación fue 21.54%(T1), 27.24%(T2) fueron similares ($p \geq 0.05$). La integridad de acrosoma de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 44.78%(T1), 40.47%(T2) y 38.20%(T3) fueron similares ($p \geq 0.05$), a la refrigeración 5°C fue 41.26%(T1), 40.47%(T2) fueron similares ($p \geq 0.05$), al momento de la descongelación fue 25.12%(T1) y 28.83%(T2) fueron similares ($p \geq 0.05$). Se observó influencia de la motilidad individual a la colección ($p \leq 0.05$), observándose así un mayor valor para el T1. Así mismo se observó influencia para vitalidad e integridad de membrana a 5°C ($p \leq 0.05$), observándose así un mayor valor para el T2. Se debe aclarar que el tratamiento 3 no se evaluó a 5°C y a la descongelación, por el uso de 100% plasma seminal de toro sin la adición de crioprotector. 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 hubo diferencia estadística.

Palabras clave: Alpaca, espermatozoides, plasma seminal, desviación de conducto deferente, tris y congelación.

I. INTRODUCCIÓN

La población nacional de camélidos sudamericanos a nivel nacional; alpacas es de 3 685,5 superando en 50,2% a la encontrada en el censo agropecuario de 1994. La raza Huacaya concentra el 80,4%, seguida de la raza Suri con 12,2% y Cruzados con 7,3%. La población alpaquera se concentra en la Sierra con 3 685,0 cabezas, que representa aproximadamente el 100, 0% del total. Considerando las razas, la Huacaya la que tiene mayor participación 78,9%, seguida por la Suri con 12, 0%. En la Costa, la raza predominante es Suris con 31,4%. La Sierra cuenta con alpacas de la raza Huacaya 78,9% y finalmente en la Selva no se encuentran (INEI-2012).

En camélidos sudamericanos la colección de semen, comúnmente, se utiliza la vagina artificial acondicionada a un maniquí en posición de copula. Esta técnica ha permitido evaluar y determinar las características seminales en alpacas Pérez (1997); Bravo et al. (1997a); Bravo et al. (1997b); Flores et al. (2002). Una de las principales desventajas que presenta es que se necesita contar machos entrenados, reportándose porcentajes de rechazo del 10 al 40% por indocilidad o falta de libido Lichtenwalner et al. (1996); Ferrer et al. (1996); von Baer y Hellemann. (1998); Aller et al. (2003); Giuliano et al. (2008). Y por otro lado los eyaculados extraídos mediante VA suelen contener impurezas del suelo y ser muy espumosos von Baer y Hellemann. (1998); Aller et al. (2003); Giuliano et al. (2008). Otro método de colección de semen en camélidos sudamericanos es la electroeyaculación Director et al. (2007); Giuliano et al. (2008); Vencato et al. (2008); Giuliano et al. (2010). Por otra parte, se pueden obtener eyaculados sin espuma y limpios de calidad igual o superior a los obtenidos mediante vagina artificial Giuliano et al. (2008). Su mayor desventaja es que se necesitan

profesionales y equipo especializado para realizar anestesia general y estimulación eléctrica. La obtención de semen mediante esponjas, fundas intravaginales o aspiración poscoital, sólo una pequeña proporción del eyaculado es recuperada y generalmente se encuentra mezclada con secreciones vaginales, contaminación con glóbulos rojos Director et al. (2007), son desfavorables para la supervivencia de los espermatozoides. La desventaja de que el eyaculado puede ser incompleto, ya que la muestra se toma de la vagina o de una funda y la eyaculación de los CSA es intrauterina.

Pérez et al. (2006) demostraron que es posible recuperar repetidamente espermatozoides de conductos deferentes desviados quirúrgicamente de alpacas y llamas machos y también facilitó la evaluación del volumen, concentración, motilidad, anormalidades y posterior criopreservación. La función de los conductos deferentes es transportar a los espermatozoides a la uretra en preparación para la eyaculación y también sirven de almacén de los espermatozoides (Knobil and Neill', 2006). En Camélidos sudamericanos, el conducto deferente es delgado (2 mm) en su comienzo y se engrosa cuando alcanza la cavidad abdominal (3 mm) (Youngquist y Threfall, 2007). Las ventajas de usar espermatozoides de epidídimo o de los conductos deferentes consisten en que estas células presentan movilidad progresiva y el manejo en el laboratorio es sencillo por la ausencia de la filancia y viscosidad característica del plasma seminal.

El semen de camélidos sudamericanos es extremadamente viscoso y se requiere su licuefacción para su evaluación de sus características microscópicas, funcionales y bioquímicas. La desgelificación puede ser realizada usando enzimas hidrolíticas no específicas que reducen la viscosidad antes de su procesamiento. El

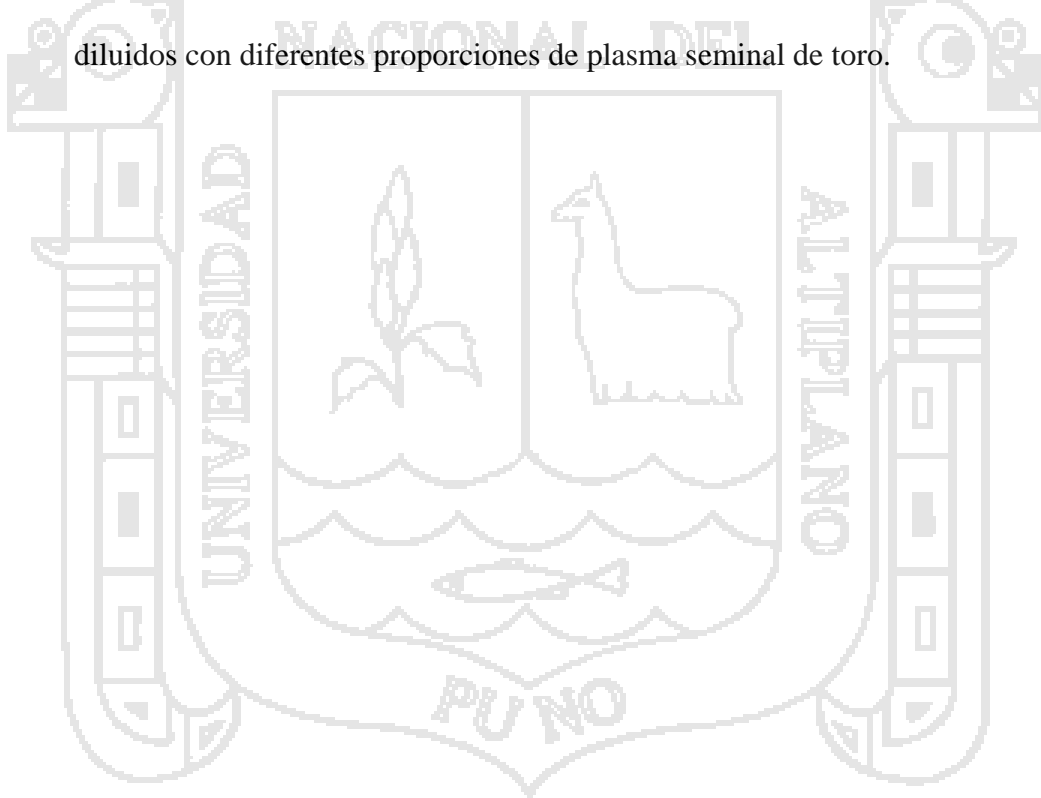
uso de enzimas reduce la viscosidad del plasma seminal de camélidos pero también afecta la función e integridad acrosómica, más que todo debido a una digestión no selectiva de las proteínas del plasma seminal (Bravo et al., 2000; Giuliano et al., 2010; Kershaw – Young and Maxwell, 2011).

En alpacas la eliminación de plasma seminal en animales *in vivo* fue posible al utilizar la bulbourectomía y la desviación de los conductos deferentes realizada por Paricahua, (2001), quien reporta que la viscosidad del semen se ve muy disminuida al utilizar la bulbourectomía pero es nula cuando se colecta semen de los conductos deferentes, confirmado por estudios posteriores Quintano (2002); Deza (2004); Quispe (2008); Caparo (2009) los autores evaluaron aspectos de dilución y congelación con buenos resultados; sin embargo, es destacable que el uso del plasma seminal en diversas especies es importante en la sobrevivencia espermática y fertilidad del semen. Es así que la adición de plasma seminal después de la criopreservación incrementa la motilidad y fertilidad en el carnero Maxwell et al. (1999), mejora la función espermática de semen descongelado de cabras Vadnais et al. (2005) y la adición del 10% de plasma seminal a semen colectado del epidídimo mejora notablemente la motilidad del semen de alpaca, más aún mantiene la integridad del acrosoma y reduce grandemente la proporción de espermatozoides no viables (Kershaw – Young and Maxwell, 2011).

Por todo lo anteriormente expuesto y ante la dificultad que implica la colección de semen por vagina artificial en alpacas para la obtención de plasma seminal de ésta especie y teniendo en consideración la similitud en las características del plasma seminal con otras especies y más aun con la del toro, es que se plantea realizar el presente trabajo de investigación en el que se desea evaluar el efecto de la adición de plasma seminal de toro en diferentes proporciones sobre la motilidad e

integridad de acrosoma de espermatozoides de alpaca colectados del conducto deferente, para ello se planteó los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto de la adición de plasma seminal de toro sobre la motilidad e integridad de membrana de espermatozoides de alpaca colectados por desviación de los conductos deferentes a la congelación y descongelación.
- Evaluar el efecto de la adición del plasma seminal de toro en diferentes proporciones sobre la motilidad individual e integridad de membrana de espermatozoides de alpaca colectados de los conductos deferentes.
- Evaluar la tasa de sobrevivencia de espermatozoides congelados – descongelados diluidos con diferentes proporciones de plasma seminal de toro.



II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. ANATOMÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO

2.1.1 Testículos

Son órganos pares relativamente pequeños de forma ovoide. En camélidos los testículos están situados en la región perineal en una posición oblicua el eje longitudinal y en dirección caudo dorsal, el peso de los testículos varía entre 13.5 a 28 gramos (Sato y Montoya, 1990).

2.1.2 Pene

Es un órgano fibroso elástico, que se extiende desde el arco isquiático hasta la región umbilical (Sato y Montoya, 1990).

El pene forma una curva en forma de "S", esta curvatura o flexura sigmoidal es pre-escrotal y puede ser observada en el macho desde la parte posterior, esta curvatura desaparece cuando se produce la erección del pene. El extremo terminal del pene posee un proceso peniano que se encarga de la dirección del pene a través de la cérvix en el momento de la copula (Bravo, 1995).

Perez (1997), afirma que el pene tiene una longitud de 26 cm sin erección, en tanto que Bustinza (2001), afirma que el pene de la alpaca tiene una longitud de 35 a 40 cm en estado de erección.

2.1.3 Epididimo

El epidídimo es un órgano fibroso compacto pegado al borde anterior del testículo, son dos conductos que conectan a los testículos con las vías deferentes, se divide en tres partes: cabeza, cuerpo y cola (Sato y Montoya, 1990).

La cabeza cubre la extremidad anterior del testículo libre de la túnica albugínea en la superficie lateral, el cuerpo es angosto, aplanado dorso ventralmente, se inserta el borde epidimal del testículo, la cola es menos extensa que la cabeza y se

encuentra relacionado a la extremidad posterior del testículo (Sato y Montoya, 1990).

Tiene funciones importantes durante la espermatogénesis puesto que en el epidídimo no solo se liberan los restos del aparato de Golgi y la gota citoplasmática y adquieren movimientos independientes, sino que también los espermatozoides adquieren capacidad para lograr óptimas tasas de fertilización (Salisbury *et al.*, 1982; Hafez, 2000).

La motilidad de los espermatozoides de la cabeza del epidídimo es nula en tanto que en el cuerpo es mínima y en la cola se acentúa hasta un promedio del 60%, esto tal vez sea debido a que en ciertas porciones del epidídimo se libera un sulfuro a partir de la cisteína, este sulfuro estimula en los espermatozoides al consumo de oxígeno y en combinación con los iones potasio que se encuentran elevados en el epidídimo, se inicia el metabolismo en los espermatozoides con un consecuente consumo de energía y movimiento de los mismos (Salisbury *et al.*, 1982).

2.1.4 Conducto deferente

El conducto deferente es un órgano que se inicia en la cola del epidídimo y finaliza en la uretra pelviana, a la cual llega luego de entrar a la cavidad abdominal (Sato y Montoya, 1990).

Una característica de las vías deferentes de los camélidos es una pequeña y poco desarrollada ampolla del conducto deferente, en tanto que en carneros y toros la ampolla es bien desarrollada y es uno de los principales lugares donde el semen es almacenado una pequeña ampolla del conducto deferente en los camélidos puede ser una de las razones del porque los intentos de colección de semen por electroeyaculación no son satisfactorios Bravo (1995), indica como funciones del

conducto deferente el pasaje y almacenamiento de los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación, y en vacunos y ovinos también tiene la función de agregar fructuosa y ácido cítrico al semen.

La función de los conductos deferentes es transportar a los espermatozoides a la uretra en preparación para la eyaculación y también sirven de almacén de los espermatozoides Knobil and Neill, (2006). El conducto deferente es delgado (2 mm) en su comienzo y se engrosa cuando alcanza la cavidad abdominal (3 mm) (Youngquist y Threfall, 2007).

2.1.5 Glándulas accesorias

La próstata es de forma irregular y difusa (forma de H) ubicada dorso lateralmente sobre el cuello de la vejiga (Bustinza, 2001).

Las glándulas bulbo uretrales son dos tienen una forma ovoide y se encuentran localizadas dorso lateralmente a la porción final de la uretra pelviana muy cerca del arco isquiático, están cubiertos por el musculo bulbouretral Sato y Montoya (1990) estas glándulas al igual que la próstata también secretan parte del plasma seminal y probablemente es la que provee del material viscoso presente en el semen de la alpaca (Bravo, 1995).

Sato y Montoya (1990), indican que en la alpaca las glándulas accesorias son la próstata y las glándulas bulbo uretrales, que elaboran secreciones, cuyo producto vierten en la uretra mezclándose con las secreciones producidas por los testículos, influyendo favorablemente sobre la vitalidad y movimientos de los espermatozoides.

2.2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

2.2.1 Pubertad

Para determinar la edad de pubertad se realizó un estudio de la testosterona sérica en alpacas machos de 9 a 12 meses de edad, estudio que revelo que el inicio de la pubertad ocurre a partir del 11vo mes de edad en el cual la producción media de testosterona no solo se hace mayor sino que se encuentra dentro de los rangos de animales machos adultos Losno y Coyotupa (1981), esto es confirmado por estudios realizados por Carpio *et al.* (1999), los que revelan que los niveles de testosterona son de 231 pg/mL, a la edad de 18 meses y pasan los 1000 pg/mL a la edad de 24 meses.

2.2.2 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso complejo que se compone de tres fases las cuales son: la espermatocitogénesis, fase que comprende el proceso por el cual las células germinales primordiales se convierten en espermátides; la fase siguiente es la espermiogénesis; fase en la cual las espermátides redondas se transforman en espermatozoides por una serie de cambios morfológicos y la última fase viene a ser la espermiación que es la liberación de las células germinales al interior de los túbulos seminíferos (Hafez, 2000).

La producción de espermatozoides por parte del testículo constituye un extraordinario proceso de modificación de las células comunes desde el crecimiento del feto para depositarse en el epitelio germinal mucho antes de que se requiera su función generativa, y finalmente la transformación de células germinales en espermatozoides libres (De Alba, 1985).

Durante el desarrollo embrionario las células germinales primordiales emigran desde el saco vitelino hacia las gónadas indiferenciadas; las células primordiales

se dividen varias veces antes de formar los gonocitos los mismos que se colocan en los tubos seminíferos del feto si esté es macho. Los gonocitos se multiplican y meses después del nacimiento dan origen a los espermatogonios, esta división ocurre antes de la pubertad (De Alba, 1985 y Hafez, 2000).

De Alba (1985) menciona que en el aspecto multiplicativo se reconocen en primer lugar las células madres las cuales producen dos espermatogonios del tipo A, uno de los cuales permanece en reposo mientras su compañero se multiplica en dos espermatogonios intermedios, estos en 4 del tipo B y estos tienen dos divisiones sucesivas para formar 16 espermatogonios.

Los 16 espermatogonios tipo B pasan por transformaciones preliminares de las divisiones de reducción o meióticas para formar los espermatocitos primarios los cuales experimentan cambios nucleares progresivos de la profase meiótica antes de dividirse para formar los espermatocitos secundarios. De 16 espermatocitos primarios se obtienen 32 espermatocitos secundarios que tienen una vida muy corta, pues rápidamente se multiplican en la segunda división meiótica y dan origen a 64 espermátides. El proceso divisional completo desde espermatogonios hasta espermátides dura unos 45 días en el toro (Hafez, 2000 y De Alba, 1985).

Durante la espermiación las espermátides alargadas que se orientan perpendicularmente sobre la pared tubular, sobresalen poco a poco hacia la luz del túbulo seminífero. Los lóbulos del citoplasma residual, a través de los cuales se conectan grupos de espermátides permanecen incrustados en el epitelio seminífero, la extrusión de los componentes espermáticos continúa hasta que solo un delgado tallo citoplasmático conecta el cuello de la espermátide con el cuerpo residual. Con la rotura del tallo se forma la gota citoplasmática en el cuello del espermatozoide liberado (gota proximal) Durante el tránsito por el

epidídimo la gota citoplasmática emigra desde la región del cuello hasta un sitio cercano al anillo citoplasmático. La presencia de dicha gota citoplasmática en una cantidad importante de espermatozoides eyaculados es indicativa de inmadures (Hafez, 2000).

2.2.3 Plasma seminal

El plasma seminal de los mamíferos es una secreción fisiológica de varias glándulas del tracto reproductivo del macho, que juega un rol importante en la maduración final de los espermatozoides, también interviene en los eventos hormonales, enzimáticos, modificación de superficie y de sobrevivencia de los mismos, además de cumplir la función como un vehículo para el eyaculado de los espermatozoides. Esta compleja mezcla difiere entre especies, como también entre machos de la misma especie y contiene una variedad de componentes bioquímicos (Muñoz-Blanco *et al.* 2008).

Los componentes orgánicos en el plasma seminal son esencialmente utilizados para mantener el metabolismo del espermatozoide, pH y osmolaridad, además las proteínas son las más importantes contribuyentes en la función espermática de los mamíferos Maxwell *et al.* (2007). La mayoría de las proteínas del plasma seminal son productos secretados por las vesículas seminales y las glándulas sexuales accesorias en casi todos los mamíferos, algunas proteínas del plasma seminal son relativamente específicas para la regulación de la función y fertilidad espermática. Los espermatozoides eyaculados tienen motilidad reducida, actividad metabólica y capacidad fertilizante o incluso puede morir si las concentraciones de plasma seminal se reducen consecuencia de la dilución o lavado, denominado como “efecto de dilución” descrito por Mann (1954). Estos efectos tienen incidencia sobre las estructuras espermáticas incluyendo la desestabilización de la

membrana, lo que finalmente produce la muerte celular (Maxwell y Jhonson, 1999).

La adición de plasma seminal a semen altamente diluido reduce el efecto de dilución e incrementa la vitalidad de los espermatozoides del carnero, conejo, toro y macho cabrío Muiño-Blanco *et al.* (2008); Maxwell y Jhonson, (1999). Es entonces importante la preservación de una adecuada membrana plasmática del espermatozoide para la retención de su capacidad fertilizante, especialmente después de todo el estrés producido consecuencia de la refrigeración, congelación y almacenaje; esta protección es otorgada por componentes específicos del plasma seminal particularmente proteínas que recubren la superficie del espermatozoide eyaculado (Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

Sin embargo, el rol del plasma seminal en la función espermática es aun materia de especulación especialmente sobre los efectos inhibitorios o estimulantes que pudiera tener. Al respecto, se reportó que el plasma seminal es muy importante para mantener la motilidad y la vitalidad espermática en el toro, carnero y macho cabrío Muiño-Blanco *et al.* (2008); Maxwell *et al.* (1996). Igualmente, la adición del plasma seminal a semen descongelado de carnero mejora la motilidad, vitalidad, integridad de acrosoma y respiración mitocondrial Ollero *et al.* (1997); Maxwell *et al.* (2007); Rebolledo *et al.* (2007), e incrementa la resistencia del espermatozoide del carnero, toro, macho cabrío y caballo a las crioinjurias (Garner *et al.* 2001; Ollero *et al.* 1997).

El plasma seminal bovino (BSP: bovine seminal plasma) contiene una familia de proteínas secretadas por las vesículas seminales. Se han descrito homólogos de estas proteínas presentes en el semen de todos los mamíferos, variando sus concentraciones entre las distintas especies. En el toro, estas proteínas del plasma

seminal representan el 65% del total de proteínas del semen y en el potro el 1,1% Bergeron y Manjunath (2006). En el potro se han caracterizado 8 proteínas de plasma seminal (HSP – 1 a HSP – 8), siendo las más abundantes HSP – 1 y HSP – 2, (renombradas SP1 y SP2) que representan entre un 70 y un 80% del total de proteínas BSP presentes en el plasma seminal Kareskoski y Katila (2008). Estas BSP se involucran en el reservorio espermático a nivel oviductal, modulan la capacitación Thérien *et al.*, (1997) y participan en eventos centrales dentro de la fertilización (fusión entre el espermatozoide y el ovocito) (Töpfer – Petersen *et al.*, 2005).

2.3. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL SEMEN

2.3.1 Volumen.

Varía según el estado fisiológico del macho, edad, raza, alimentación, frecuencia de colección y preparación psico sexual Derivaux (1982) existe una variabilidad de volumen de eyaculado entre individuos y aun en un mismo individuo entre una colección y otra Fernández Baca y Novoa (1968). Los valores más frecuentemente encontrados en semen colectado de alpaca oscilan entre 1 a 4 ml y excepcionalmente se ha reportado 12 ml, los valores de volumen disminuyen en eyaculaciones sucesivas y también está dado por el intervalo entre estas (Bustinza, 2001).

2.3.2 Color

En la mayoría de las especies el semen tiene una coloración blanquecina y su opacidad se halla en función de la concentración espermática Derivaux (1982) En la alpaca el semen es de color blanco variando de cristalino a lechoso, correspondiendo a concentraciones altas (gran cantidad de células espermáticas por ml de semen) el color blanco lechoso Mogrovejo (1952) y Quispe (1987)

Refuerza esta afirmación Pérez (1997) quien indica que un color cristalino corresponde a $30000\text{esp}/\text{mm}^3$, el color gris corresponde a 150000 a $210000\text{esp}/\text{mm}^3$, lechoso corresponde a 300000 a $600000\text{esp}/\text{mm}^3$.

2.3.3 Aspecto

El semen de alpaca es altamente viscoso siendo muy difícil separar los espermatozoides del plasma seminal lo cual dificulta la preparación de frotices Sumar y Leyva (1981); Quispe (1987) y Von Baer y Helleman 1998) la licuefacción de esta viscosidad es iniciada aproximadamente 8 horas después de la deposición del semen Bravo (1995) con un rango que va desde las 8 a 48 horas. Garnica *et al.* (1993) el semen de la alpaca es viscoso en todos los casos, además la viscosidad es semejante a un gel, esta alta viscosidad del semen se debe a las secreciones producidas por las glándulas bulbo uretrales (Quispe, 1987; Achata, 1989; Bravo, 1998 y 1995; Rivera, 1998 y Mendoza, 2000).

Debido a esta alta viscosidad del semen de la alpaca el movimiento de los espermatozoides es muy lento. Leyva *et al.* (1984) y Bravo (1995) en alpacas con desviación de conducto deferente no poseen viscosidad por la falta de las secreciones de las glándulas bulbouretrales y la próstata (Paricahua, 2001).

2.4. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN

2.4.1 Motilidad individual

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).

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).

2.4.2 Vitalidad

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) clasificó 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.

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).

2.4.3 Test Hiposmótico

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. 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).

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).

2.4.4 Integridad de acrosoma

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).

La integridad de las membranas plasmática y acrosomal es de gran importancia para la funcionalidad de los espermatozoides. Esto cobra especial relevancia teniendo en cuenta que luego de la refrigeración y del congelamiento profundo se ha observado que los espermatozoides de varias especies evidencian cambios similares a los de la capacitación, efecto que se ha llamado “criocapitación” cerdo: Maxwell y Johnson (1997); toro: Cormier *et al.*, (1997); equino: Neild *et*

al., (2003). En la actualidad existen varias pruebas para evaluar la integridad y/o funcionalidad de la membrana plasmática, entre ellas las tinciones vitales con fluorocromos (como la tinción con Diacetato de 6- carboxifluoresceína e Ioduro de Propidio). La evaluación de la membrana acrosomal se han utilizado varias técnicas, muchas de ellas costosas requiriendo de un equipamiento no disponible para el trabajo a campo.

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 espermatología.

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).

2.4.5 Concentración espermática

La alta viscosidad 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 esta entre cientos de miles Bravo (1995). 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).

2.5. CONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

2.5.1 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.

En cambio. 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 eutecticos 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).

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).

2.5.2 Congelación

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).

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 *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Aller *et al.*, 2003).

2.5.3 Descongelación

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).



III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar 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, Departamento 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 del Collao (SENAMHI, 2012).

3.2 Animales

Se utilizó 3 alpacas machos de la raza Suri, 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 METODOLOGÍA

3.3.1 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:

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

c) Se insensibilizó 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.

d) La técnica quirúrgica fue de la siguiente manera:

Paso 1.- Se incidió 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 separó 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 Metzemaum roma.

Paso 3.- Con un estilete se ubicó y separó el conducto deferente de las estructuras que conforman el cordón espermático, una vez que se logró separar la mayor longitud posible, se ligó y seccionó. 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).

3.3.2 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 resuspendidos en los diferentes tratamientos (TRIS, TRIS+PLASMA SEMINAL y PLASMA SEMINAL) según corresponda (ver punto 3.3.4.), de la siguiente manera:

- 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 minutos.
- 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.

3.3.3 Plasma seminal

El plasma seminal se obtuvo de un toro de la raza Brown Swiss de una edad >24 meses, de la siguiente manera:

- a) Se realizó la higienización de la región prepucial con agua atemperada y jabón, se colocó y sujetó una vaca en celo en el brete, una vez estimulado el toro se procedió a la colección de semen con la ayuda de una vagina artificial.
- b) El semen colectado fue evaluado, el cual no debía contener impurezas (orina, sangre, cuerpos extraños), se colocó en tubos graduados para su inmediata centrifugación a 7000 rpm por 30 min,
- c) El plasma seminal sobrenadante fue recuperado y el pellet de espermatozoides fue desechado. Para tener la certeza que el plasma seminal no contenga espermatozoide alguno se tomó una alícuota de 10uL del plasma centrifugado que fue colocado sobre una lámina portaobjeto y cubierto con una lámina cubreobjeto para ser observado en un microscopio óptico a un aumento de 100X.
- d) El plasma obtenido fue filtrado con papel filtro con una medida de 70 μ m, para luego colocarlos en viales de 1mL, en una cantidad de 0.5mL de plasma por vial, luego estos fueron congelados para su posterior uso.

3.3.4 Preparación de las diferentes proporciones de plasma seminal

El plasma seminal que fue utilizado para reconstituir los espermatozoides de alpaca fue preparado en tres proporciones distintas:

T1: 0% de plasma seminal de toro más 100% de TRIS (v/v).

T2: 50% de plasma seminal de toro más 50% de TRIS (v/v).

T3: 100% de plasma seminal de toro más 0% de TRIS (v/v).

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

Dilutor “tris-yema”

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

(Maxwell y Evans 1999)

A cada tubo se le agrego 0.5 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 3000 r.p.m. 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 50% Tris – yema + 50% de plasma seminal.- Se colocó 0.25ml del dilutor Tris – yema se agregó 0.25ml de plasma seminal para completar a

0.5ml 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 – 100% plasma seminal.- Para el uso de este tercer tratamiento se colocó 0.5ml de plasma seminal 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.

3.3.5 Motilidad total y motilidad progresiva

a) La motilidad espermática fue valorada subjetivamente a un objetivo de 100X 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 100 a 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 = Numero de espermatozoides motiles.

N = Número total de espermatozoides.

3.3.6 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 una gota pequeña de colorante tanto eosina y nigrosina.

b) Con la ayuda de una jeringa de tuberculina se colocó una gota pequeña de la muestra del predilutor con espermatozoides en el extremo de la lámina portaobjetos 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 100X con aceite de inmersión. Conteo de 100 a 200 espermatozoides.

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

V = Vitalidad espermática.

n = Numero de espermatozoides no coloreados.

N = Número total de espermatozoides.

3.3.7 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 0.735g de citrato de sodio, 1.351g 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 10mL 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 0.05mL e incubado por un tiempo de 30 minutos.
- c) Se tomó una alícuota de 10uL que fue colocada sobre una lámina porta objetos y observado a un aumento de 100X en un microscopio óptico, contando como mínimo de 100 a 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

3.3.8 Integridad de acrosoma

- a) El porcentaje de integridad de acrosoma fue determinado por la técnica de coloración eosina –nigrosina se colocó 10 uL de semen, 50uL de eosina y 50uL de nigrosina, juntamente se mesclo con ambos colorantes 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 de 100 a 200 espermatozoides como mínimo.

$$IA \text{ (Integridad de Acrosoma)} = \frac{n}{N} \times 100$$

IA = Porcentaje de espermatozoides con integridad de acrosoma.

n = Numero de espermatozoides con integridad de acrosoma.

N = Número total de espermatozoides.

3.3.9 Conservación de espermatozoides

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 horas 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 (ambiente 5°C) 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 resuspendidos 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 (Tris 3.634g, glucosa 0.5g, ácido cítrico 1.99 g, penicilina 100000UI, estreptomycin 100mg, yema de huevo 15mL y glicerol 5mL, completado hasta un volumen de 100 mL con agua destilada (Maxwell y Evans, 1999).

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 minutos, 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 segundos, luego se evaluó la motilidad individual total, motilidad progresiva, la integridad de membrana e integridad de acrosoma.

3.3.10 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 Tukey y la prueba de T.

1. Diseño completamente al azar cuyo Modelo Aditivo Lineal es:

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

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 es efecto del i-esimo tratamiento.

E_{ijk} = Es el error experimental.

2. Prueba de t, cuya fórmula es:

$$t = \frac{T_1 - T_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_{\text{tratamiento } 1}} + \frac{1}{n_{\text{tratamiento } 2}}}} \rightarrow t_{\alpha, n-2 \text{ gl}}$$

t = Valor de la prueba de t

$T_{\text{tratamiento } 1}$ = Promedio de tratamiento 1.

$T_{\text{tratamiento } 2}$ = Promedio de tratamiento 2.

$n_{\text{repetición } 1}$ = Número de repeticiones tratamiento 1.

$n_{\text{repetición } 2}$ = Número de repeticiones tratamiento 2.

S = Varianza común

$t_{\alpha, n-2 \text{ gl}}$ = Valor tabular de t con n - 2 grados de libertad

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados de motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad, test hiposmotico e integridad de acrosoma de espermatozoides con 100% TRIS, 50% TRIS + 50% PLASMA SEMINAL y 100% PLASMA SEMINAL en tres tiempos de evaluación (colectado a 37°C, a 5° grados y descongelación), se muestran en los siguientes cuadros:

4.1. RESULTADOS A LA COLECCIÓN 37°C

4.1.1 Motilidad individual.

En la tabla 01 se muestra la motilidad individual a la colección (37°C) Tris 43.98%, Tris + Plasma seminal 37.80% y Plasma seminal 31,42%.

**TABLA 01. MOTILIDAD INDIVIDUAL A LA COLECCIÓN (37°C)
SEGÚN DILUTOR.**

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL	PLASMA SEMINAL
n	5	5	5
Promedio	43.98 ^a	37.80 ^{ab}	31.42 ^b
Rango	39.10 – 46.80	35.36 - 41.12	24.49 - 42.91

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p \leq 0.05$)

Al análisis de varianza y a la prueba de Tukey muestra que los tratamientos de Tris- YH y Tris-YH + plasma seminal son superiores al tratamiento de con plasma ($p \leq 0.05$).

Los resultados del presente trabajo de motilidad individual del tratamiento con Ttris-YH (43.98%), Ttris-YH + plasma seminal (37.80%) y plasma seminal (31.42%) a la colección (37°C), obtenidos de muestras espermáticas de conductos

deferentes, fueron diferentes y menores numéricamente a los reportados por Perez *et al.* (2014a) utilizando la misma técnica de recuperación espermática logro 56,8 % de motilidad individual con dilutor comercial (Triladyl®, Minitube, Alemania), obteniendo espermatozoides de un solo conducto deferente por macho con frecuencia de dos veces por semana en tubos de ensayo con 0.5 mL de dilutor en baño maría a 37°C, estos resultados mayores obtenidos por el autor en comparación a nuestros resultados, pudo deberse a la obtención de espermatozoides en época reproductiva y el tipo de dilutor utilizado. Deza (2004) con la misma técnica reporto una motilidad individual de 77.7% en espermatozoides de alpaca, al momento de la colección a 37°C con dilutor Tris con 20% de yema de huevo, estos valores reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, esto se debería a la disponibilidad de alimentos en la época de lluvia. Quispe (2008) con la misma técnica reporto una motilidad individual de 71.33% de espermatozoides de alpaca, al momento de la colección a 37°C con dilutor Tris con adición del 30% de yema de huevo, este resultado mayor en comparación al presente trabajo se debería principalmente al mayor porcentaje de yema de huevo utilizado. La importancia de la yema de huevo en la acción protectora, dada por sus componentes específicos como la fosfatidylcolina (lecitina), fosfolípidos, extracto de lípidos, fracciones de lípidos y proteínas específicas que proveen alguna protección al espermatozoide durante el shock frío Jones and Martin (1972), Watson and Martin (1972), Petruzzi *et al.* (1976), Prendergast *et al.* (1995). Fernandez-Santos *et al.* (2006) indican que la yema de huevo provee al dilutor una propiedad de estabilizar la membrana de los espermatozoides contra el shock frío y protección durante la congelación-descongelación. Posteriormente, Moussa *et al.* (2002), Su *et al.* (2008), Hu *et al.*

(2010) indican que las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo posee una propiedad crioprotectora de la superficie de la membrana del espermatozoide durante la congelación, formando una capa protectora contra los cristales de hielo que se forman durante la congelación.

Banda *et al.* (2010) reporto una motilidad individual de espermatozoides de alpaca obtenidos de epidídimo logrando 31.3 % de motilidad individual a las 0 h, donde los espermatozoides de epidídimo fueron trasladados y refrigerados en frascos con suero fisiológico a 5°C, la adición de yema de huevo al dilutor Tris con el 10%; en comparación a los resultados al presente trabajo esta diferencia menor pudo deberse a la obtención de epidídimos de camal, refrigerados a 5°C y después recalentados a 37°C para la evaluación de los espermatozoides.

Mientras que Morton *et al.* (2010) reporto una motilidad de 52.7 % de espermatozoides obtenidos de epidídimo, refrigerados y transportados con PBS, fueron resuspendidos con lactosa, esta diferencia mayor en comparación al presente trabajo posiblemente se debe a la obtención directa de espermatozoides de epidídimos mediante la castración suspendidos en PBS y lactosa. Santiani *et al.* (2005) sugiere que la caseína y la lactosa, protegerían mejor al espermatozoide que el Tris y ácido cítrico.

Kershaw-Young *et al.* (2011) obtuvo una motilidad 56.3 % trabajando con espermatozoides de alpaca a partir de epidídimos, suspendidos en 100% plasma seminal al cual se adiciono 0.1% de BSA en baño maría a 37°C, cada 15 min se removía la fracción plasma seminal para evitar la separación del plasma seminal con la fracción de BSA, este mismo se utilizó para mantener la consistencia de la muestra diluida de espermatozoides obtenidos de epidídimos en todo el proceso del trabajo, aunque el autor indica que el BSA induce la capacitación de los

espermatozoides; estos datos mayores en comparación al presente trabajo, se debería a la adición de PBS y BSA al momento de la colección de espermatozoides y la utilización de plasma seminal homólogo. Se ha descrito un grupo de proteínas ácidas del plasma seminal de bajo peso molecular (13-16 kDa), las cuales se adsorben a la membrana plasmática del espermatozoide y desempeñan un papel crucial en la regulación de la capacitación Manjunath *et al.* (2009); Barrios *et al.* (2005). Estas proteínas, son secretadas por las vesículas seminales Desnoyers *et al.* (1994); Fernández-Juan *et al.* (2006), y se han empleado para proteger al espermatozoide contra el estrés térmico y oxidativo (Perez-Pe *et al.* 2000; Colas *et al.* 2009).

Estudios realizados en otras especies adicionando plasma seminal a espermatozoides obtenidos directamente del epidídimo; Martínez-Pastor *et al.* (2006) En ciervos realizó trabajos similares encontrando una motilidad 57.90% de espermatozoides obtenidos del epidídimo, libre de plasma seminal, donde los epidídimos fueron transportados y refrigerados a 5°C luego fueron recalentados a 37°C suspendidos en PBS, en comparación al presente trabajo los valores son menores, este valor encontrado por el autor se debería al factor especie y a la dilución de espermatozoides en PBS.

4.1.2 Motilidad progresiva.

En la tabla 02 se muestra la motilidad progresiva a la colección (37°C) Tris-YH 32.35 %, Tris-YH + Plasma seminal 25.12 % y Plasma seminal 24.70 %.

**TABLA 02. MOTILIDAD PROGRESIVA A LA COLECCIÓN (37°C)
SEGÚN DILUTOR.**

DILUTOR	TRIS+ YH	TRIS+PLASMA SEMINAL	PLASMA SEMINAL
n	5	5	5
Promedio	32.35 ^a	25.12 ^a	24.70 ^a
Rango	37.50 – 26.20	28.85 – 20.38	38.54 – 15.06

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza y a la prueba de Tukey muestra que los tratamientos de Tris-YH, Tris-YH + plasma seminal y plasma seminal son similares ($p \geq 0.05$).

Ordóñez *et al.* (2013) obtuvo una motilidad progresiva de 4.38% a partir de espermatozoides obtenidos por electroeyaculación, diluido en Tris con 25 ml de yema de huevo, estos resultados mucho menores respecto al presente trabajo se debería principalmente al método de colección y la presencia del plasma seminal al momento de la colecta. El mismo autor Ordoñez *et al.* (2012) con la misma técnica obtuvo una motilidad progresiva de 29.0 %, con el dilutor comercial Triladyl®, con intervalos de 21 días entre colectas, estos valores son similares respecto a los resultados encontrados en el presente trabajo, posiblemente se debería al dilutor e intervalo de colección.

En otras especies el autor Heise *et al.* (2011) reportó una motilidad progresiva de 67% en espermatozoides de caballo, obtenidos de epidídimos libres de plasma seminal, evaluados en baño maría a 37°C, suspendidos en leche desnatada sometidos

a centrifugación media; estos valores reportados por el autor son mayores en comparación a nuestros resultados esto se podría deber al factor especie y al tipo de dilutor utilizado. Santiani et al. (2005) sugieren que la caseína y la lactosa, presentes en la leche, protegerían mejor a los espermatozoides que el Tris y ácido cítrico, presentes en el dilutor en base a Tris. Esto también concuerda otros reportes Ratto et al., (1999); Morton et al., (2007). Se puede inferir que el uso de dilutores cuyos componentes incluyen lactosa o leche descremada favorecería la conservación espermática en alpacas y llamas frente a dilutores en base a Tris.

4.1.3 Vitalidad

En la tabla 03 se muestra la vitalidad a la colección (37°C) Tris-YH 34.73 %, Tris-YH + Plasma seminal 37.15 % y Plasma seminal 28.15%.

TABLA 03. VITALIDAD A LA COLECCIÓN (37°C) SEGÚN DILUTOR.

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL	PLASMA SEMINAL
n	5	5	5
Promedio	34.73 ^a	37.15 ^a	28.15 ^a
Rango	39.31 – 33.12	39.05 – 35.38	40.71 – 19.23

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza y a la prueba de Tukey muestra que los tratamientos de Tris-YH, Tris-YH + plasma seminal y plasma seminal son similares ($p \geq 0.05$).

Perez *et al.* (2014a) Reporto una vitalidad de 47,8 % de espermatozoides de alpaca, obtenidos de muestras espermáticas de conducto deferente con el dilutor comercial (Triladyl®, Minitube, Alemania), obteniendo espermatozoides dos veces por semana en tubos de ensayo con 0.5 mL de dilutor comercial en baño maría a 37°C, estos mayores resultados del autor en comparación a nuestros

resultados se deberían a la obtención de espermatozoides en época reproductiva y el tipo de dilutor. Deza (2004) con la misma técnica reporto una vitalidad de 58,25% en espermatozoides de alpaca, al momento de la colección a 37°C con dilutor Tris con 20% de yema de huevo, estos valores reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, esto se debería a la disponibilidad de alimentos en la época de lluvia. Quispe (2008) con la misma técnica reporto una vitalidad de 60.57% de espermatozoides de alpaca, al momento de la colección a 37°C con dilutor Tris con adición del 30% de yema de huevo, este resultado mayor en comparación al presente trabajo se debería principalmente al mayor porcentaje de yema de huevo utilizado.

Banda *et al.* (2010) reporto 32.6 % de vitalidad de espermatozoides obtenidos de epidídimos, donde los testículos fueron trasladados en frascos con suero fisiológico a 5°C refrigerados, la adición de yema de huevo al dilutor Tris fue solo fue del 10%; estos menores resultados que obtuvo el autor se debería a la obtención de epidídimos de camal transportados y refrigerados a 5°C, luego fueron recalentados a 37°C para la obtención de los espermatozoides en laboratorio que determinaría la vitalidad reportada por el autor.

Mientras que Pacheco *et al.* (2014) Reporto una vitalidad de 69.12%, obtenidos de muestras espermáticas de conducto deferente libre de plasma seminal, 0.1 mL de semen + 0.9 de solución hiposmotica y se detuvo la reacción con 0.1 mL de formaldehido al 14%, estos resultados mayores reportados por el autor en comparación a lo encontrado en el presente trabajo se debería a la adición de un medio hiposmotico al momento de la evaluación de vitalidad.

Kershaw-Young *et al.* (2011) obtuvo una vitalidad 46.9% a partir de espermatozoides de epidídimos, suspendidos en 100% plasma seminal al cual se

adiciono 0.1 % de BSA en un baño maría a 37°C, cada 15 minutos se removía la mezcla para evitar la separación del plasma seminal con la fracción de BSA, estos datos mayores obtenidos por el autor se debería a la adición de PBS y BSA al plasma seminal al momento de la colección de espermatozoides y la utilización de plasma seminal homologado que determinaría la vitalidad reportada por el autor. Existen estudios que señalan que la seroalbumina bovina, suero fetal homologado adicionado a los dilutores, estimulan la motilidad de los espermatozoides en pavos, debido posiblemente a la exposición a los ácidos grasos libres presentes en la seroalbúmina o suero para los espermatozoides (Bakst and Cecil, 1992; Palacios y Zarco, 1996).

4.1.4 Test – Hiposmótico

En la tabla 04 se muestra la integridad de membrana a la colección (37°C) Tris-YH 46.63 %, Tris-YH + Plasma seminal 46.03 % y Plasma seminal 41.43%.

**TABLA 04: TEST-HIPOSMOTICO A LA COLECCIÓN (37°C)
SEGÚN DILUTOR.**

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL	PLASMA SEMINAL
n	5	5	5
Promedio	46.63 ^a	46.03 ^a	41.43 ^a
Rango	54.20 – 41.94	53.58 – 41.36	50.28 – 35.29

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. (p>0.05)

Al análisis de varianza y a la prueba de Tukey muestra que los tratamientos de Tris-YH, Tris-YH + plasma seminal y plasma seminal son similares (p≥0.05).

Pacheco *et al.* (2014) Colecto espermatozoides del conducto deferente y reportó 53.37 %, 38.96 % y 21.51 % integridad de membrana obtenidos de muestras

espermáticas de conducto deferente libre de plasma seminal, con diferentes soluciones hiposmóticas 50, 100, 150 mOsmol respectivamente, se mezcló 0.1 mL de semen + 0.9 mL de solución hiposmótica y se detuvo la reacción con 0.1 mL de formaldehído al 14 %, estos resultados del autor son similares en comparación a presente trabajo.

Banda *et al.* (2010) reportó 34.5 % integridad de membrana de espermatozoides obtenidos de epidídimo, donde los testículos fueron y con suero fisiológico, y preservado con Tris con 10 % de yema de huevo; estos menores resultados que obtuvo el autor en comparación a nuestros resultados se debería a la obtención de epidídimos de camal transportados y refrigerado a 5°C, luego recalentados a 37°C que afectan la motilidad a la evaluación de los espermatozoides en laboratorio que determinaría los resultados reportados por el autor.

Fumuso *et al.* (2014) reportó una integridad de membrana de 23,1% en semen de llama, la muestra fue obtenida por electroeyaculación diluido en PBS a 37°C, se adicionó 50µl de semen a la solución de PBS, estos fueron incubados con 200µl de solución hipoosmótica conteniendo fructosa y citrato de sodio (50 mOsm), estos valores reportados por el autor son menores en comparación a presente estudio, posiblemente se debería principalmente al método de colección utilizado y la menor osmolaridad utilizada para la evaluación de la prueba de HOST.

4.1.5 Integridad de acrosoma.

En la tabla 05 se muestra la integridad de acrosoma a la colección (37°C) Tris-YH 44.78 %, Tris-YH + Plasma seminal 40.47 % y Plasma seminal 38.20 %.

**TABLA 05. INTEGRIDAD DE ACROSOMA A LA COLECCIÓN (37°C)
SEGÚN DILUTOR.**

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL	PLASMA SEMINAL
n	5	5	5
Promedio	44.78 ^a	40.47 ^a	38.20 ^a
Rango	48.80 – 41.11	42.53 – 38.32	50.98 – 30.42

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p \geq 0.05$)

Al análisis de varianza y a la prueba de Tukey muestra que los tratamientos de Tris-YH, Tris-YH + plasma seminal y plasma seminal son similares ($p \geq 0.05$).

Banda *et al.* (2010) reportó el 32.6 % integridad de acrosoma de espermatozoides obtenidos de epidídimo, estos menores resultados que obtuvo el autor se debería a la obtención de epidídimos de camal transportados y refrigerados a 5°C, luego recalentados a 37°C para la evaluación de los espermatozoides en laboratorio que determinaría la integridad de acrosoma reportada por el autor.

Mientras que Kershaw-Young *et al.* (2011) reportó 76.6% integridad de acrosoma, a partir de espermatozoides de alpaca a partir de epidídimos, suspendidos en 100% plasma seminal homólogo que se adicionó 0.1% de BSA en un baño maría a 37°C, cada 15 min se removía la mezcla para evitar la separación del plasma seminal con la fracción de BSA, estos datos mayores reportados por el autor en comparación al presente trabajo, se debería a la adición de PBS y BSA al plasma seminal al momento de la colección de espermatozoides y la utilización

de plasma seminal homologo que determinaría la integridad de acrosoma reportada por el autor.

Morton *et al.* (2010) reporto una integridad de acrosoma de 89.3% en espermatozoides de alpaca, a partir de espermatozoides de epidídimos transportados y refrigerados en PBS, en el laboratorio fue resuspendido con lactosa, los datos reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo posiblemente se debería a la obtención directa de epidídimos mediante la castración suspendidos en PBS y resuspendidas en lactosa. El mismo autor en el mismo año reporta una integridad de acrosoma de 92.3% con la misma técnica, donde los espermatozoides fueron diluidos con el dilutor comercial Biladyl® adicionando antioxidante comercial Equex STM®, los datos reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, esto posiblemente se debería a la adición de antioxidante y dilutor comercial.

Fumuso *et al.* (2014) reporto una integridad de acrosoma de 91.6 % en llamas, obteniendo semen por electroeyaculación, las muestras fueron incubadas con colagenasa al 0,1 % en medio H-TALP, se diluyeron en una proporción 4:1 con la enzima y se incubaron durante 4 min a 37° C. Posteriormente se centrifugaron durante 10 min a 800 g y el pellet obtenido se resuspendió con H-TALP. Se fijaron con paraformaldheído al 4% en PBS. Se tiñeron con colorante Coomassie Blue al 0.22 %, estos valores reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, posiblemente se debería principalmente al tipo de tinción utilizado y a la fijación de las muestras con paraformaldheído al 4 %.

4.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA A 5° GRADOS

4.2.1 Motilidad individual

En la tabla 06 se muestra la motilidad individual a los 5°C para el Tris-YH 33.24 %, Tris-YH + Plasma seminal 34.20 %.

TABLA 06. MOTILIDAD INDIVIDUAL A 5°C SEGÚN DILUTOR.

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	33.24	34.20
Rango	40.21 – 23.14	38.21 – 30.25

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza, muestra que los tratamientos de Tris-YH y Tris-YH + plasma seminal son similares ($p \geq 0.05$).

Pérez *et al.* (2014) reportó una motilidad individual a temperatura de 5°C de 64.81%, donde las muestras espermáticas fueron obtenidas por desviación de conducto deferente quirúrgicamente, diluidos en Tris + 20 % de yema de huevo adicionando suero fetal 5% evaluados y conservados a 5°C, estos valores son mayores respecto al presente trabajo, esto se debería a la adición de 5% de suero de cría nacida de alpaca que permitió una mejor conservación (mayor a 24 h) en refrigeración. Estudios señalan que la seroalbumina bovina, suero fetal homólogo adicionado a los dilutores, estimulan la motilidad de los espermatozoides en pavos, debido posiblemente a la exposición a los ácidos grasos libres presentes en la seroalbúmina o suero para los espermatozoides (Bakst and Cecil, 1992; Palacios y Zarco, 1996).

Mientras que el autor Morton *et al.* (2010) reportó una motilidad de 46.30 % a temperatura de 4 °C, donde los epidídimos fueron transportados y refrigerados en PBS, en el laboratorio fue resuspendido con lactosa, los datos reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo posiblemente se debería a la obtención directa de epidídimos mediante la castración suspendidos en PBS y resuspendidos en lactosa. El mismo autor en el mismo año reportó 47.0% a temperatura de 4°C realizando un diferente tratamiento donde los epidídimos fueron diluidos con el dilutor comercial Biladyl® adicionando antioxidante comercial Equex STM®, los datos son mayores en comparación al presente trabajo esto posiblemente se debería a la adición de antioxidante y dilutor comercial.

Comparando con espermatozoides de epidídimo en otras especies el autor Singh *et al.* (2007) reportó 71.7% motilidad individual en búfalos, donde la colección de espermatozoides fue por punciones múltiples del epidídimo suspendidos en Tris con 10% de yema de huevo. Estos valores reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, esta mayor motilidad se debería principalmente al factor especie.

4.2.2 Motilidad progresiva

En la tabla 07 se muestra la motilidad progresiva a los 5°C para el Tris-YH 26.14 %, Tris-YH + Plasma seminal 24.03 %.

TABLA 07. MOTILIDAD PROGRESIVA A 5°C SEGÚN DILUTOR

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	26.14	24.03
Rango	35.26 – 18.25	28.33 – 20.35

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza muestra que los tratamientos de Tris-YH 26.14% y Tris-YH + plasma seminal 24.03% son similares ($p \geq 0.05$).

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, se debería principalmente al método de colección y la presencia del plasma seminal al momento de la colecta. En otras especies con espermatozoides obtenidos de epidídimo el autor Heise *et al.* (2011) reporto 30.0 % motilidad progresiva en caballos, los espermatozoides se colectaron de epidídimos (castración) suspendidos en 2mL de leche descremada a una temperatura de 37°C, estos valores son mayores respecto al presente trabajo esto se debería al factor especie y al dilutor utilizado.

4.2.3 Vitalidad

En la tabla 08 se muestra la vitalidad a los 5°C para el Tris-YH 26.45 %, Tris-YH + Plasma seminal 33.90 %.

TABLA 08. VITALIDAD A 5°C SEGÚN DILUTOR.

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	26.45	33.90
Rango	31.20 – 15.23	37.44 – 29.98

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p \leq 0.05$)

Al análisis de varianza, muestra que el tratamientos Tris-YH 26.45% es inferior al tratamiento Tris-YH + plasma seminal 33.90% ($p \leq 0.05$).

No se encontró reportes acerca de estos parámetros evaluados de espermatozoides de alpaca a una temperatura de 5°C refrigeración, sin embargo estudios en otras especies reportados por el autor Singh *et al.* (2007) reporto una vitalidad de 83.6 % en búfalos, a partir de espermatozoides por punciones múltiples del epidídimo suspendidos en Tris con 10% de yema de huevo. Estos valores reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, esta mayor vitalidad se debería principalmente al factor especie. El autor Hishinuma *et al.* (2003) reporto 82.4% de viabilidad en ciervos, a partir de espermatozoides de epidídimo almacenados en recipientes a 4°C, por múltiples incisiones del epidídimo y suspendidos en 2-3 mL de tris por 15 min en baño maría a 37°C, se utilizó colorante Eosina evaluando espermatozoides coloreados de color rojo, estos

valores reportados por el autor son mayores respecto al presente trabajo, esto se debería principalmente al factor especie.

4.2.4 Test-hiposmotico

En la tabla 09 se muestra la integridad de membrana a los 5°C para el Tris-YH 33.51%, Tris-YH + Plasma seminal 40.10 %.

TABLA 09. INTEGRIDAD DE MEMBRANA A 5°C SEGÚN DILUTOR.

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	33.51	40.10
Rango	38.56 – 30.11	42.90 – 37.69

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p \leq 0.05$)

Al análisis de varianza, muestra que el tratamientos Tris-YH 33.51% es inferior al tratamiento Tris-YH + plasma seminal 40.10 % ($p \leq 0.05$).

No se encontró reportes acerca de estos parámetros evaluados de espermatozoides de alpaca a una temperatura de 5°C en refrigeración, sin embargo comparando estudios en otras especies; el autor Singh *et al.* (2007) reporto una integridad de membrana de 72.7% en búfalos, muestras obtenidas de espermatozoides de epidídimo por punciones múltiples suspendidos en Tris con 10% de yema de huevo, evaluada a una osmolaridad de 100mOsm/l a una temperatura de 5°C. Estos valores reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, este mayor valor de integridad de membrana se debería principalmente al factor especie y a la evaluación de integridad de membrana a una osmolaridad de 100mOsm/l. Fernández-Santos *et al.* (2006) reporto 86.7% de integridad de

membrana en ciervos, donde los espermatozoides fueron obtenidos de epidídimos de animales muertos en un tiempo de 3-6 h, estos fueron transportados a 22°C al laboratorio y diluidos en tris + yema de huevo para luego refrigerarlo a 5°C, para la evaluación de integridad de membrana se realizó un medio hiposmótico con (100 mOsmol/kg) por 30min, luego fueron fijados con 2% glutaraldehído para su posterior coloración con eosina-nigrosina.

4.2.5 Integridad de acrosoma

En la tabla 10 se muestra la integridad de acrosoma a los 5°C para el Tris-YH 41.26%, Tris-YH + Plasma seminal 40.47%.

TABLA 10. INTEGRIDAD DE ACROSOMA A 5°C SEGÚN DILUTOR.

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	41.26	40.47
Rango	45.80 – 35.24	42.53 – 38.32

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza muestra que los tratamientos de Tris-YH y Tris-YH + plasma seminal son similares ($p \geq 0.05$).

No se encontró reportes acerca de estos parámetros evaluados de espermatozoides de alpaca a una temperatura de 5°C en refrigeración, sin embargo comparando estudios en otras especies Fernández-Santos *et al.* (2006) Reporto 94.8% de integridad de acrosoma en ciervos, los espermatozoides fueron obtenidos de epidídimos de animales muertos en un tiempo de 3-6h, estos fueron transportados a 22°C al laboratorio y diluidos en Tris + YH para luego refrigerarlo a 5°C, para la

evaluación de integridad de acrosoma se realizó después de 1h y 20 min fijándolos primero en glutaraldehído al 2% en 0.165 M de cacodylate/HCl buffer (pH 7.3).

4.3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA A LA DESCONGELACIÓN.

4.3.1 Motilidad individual

En la tabla 11 se muestra motilidad individual a la descongelación para el Tris-YH 14.46%, Tris-YH + Plasma seminal 15.66%.

**TABLA11. MOTILIDAD INDIVIDUAL A LA DESCONGELACION
SEGÚN DILUTOR.**

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	14.46	15.66
Rango	22.51 – 10.38	22.93 – 10.26

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza muestra que los tratamientos de Tris-YH y Tris-YH + plasma seminal son similares ($p \geq 0.05$).

La menor motilidad después del proceso de congelación de los espermatozoides se debe probablemente a que este proceso produce cambios en la morfología espermática incluyendo daños en la mitocondrias, el acrosoma y cola del espermatozoide tal como señala Mc Clure *et al.* (2002). También se conoce que la motilidad individual total es uno de los parámetros más afectados durante la criopreservación tal como refiere Watson (2000). Las membranas espermáticas de los mamíferos son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y son sensibles al daño

inducido por el oxígeno mediado por la peroxidación lipídica y por lo tanto son sensibles al ataque de especies reactivas al oxígeno (ROS) lo cual resulta una disminución de la motilidad de los espermatozoides, presumiblemente por la rápida pérdida de ATP intracelular que conduce a daños en el axonema, disminución de la viabilidad espermática, y un incremento de los defectos morfológicos de la pieza media del espermatozoide con defectos deletéreos sobre la capacitación espermática y reacción del acrosoma tal como menciona (Bansal y Bilaspuri 2007; Peris *et al.* 2007).

La motilidad individual a la descongelación es similar a los resultados obtenidos por el presente trabajo en comparación a lo reportado por el autor Choez *et al.* (2014) 16.1% de motilidad individual promedio de espermatozoides de alpaca, a partir de espermatozoides epididimarios de testículos de camal transportados en cloruro de sodio 0.9% a 5°C, estos fueron diluidos en leche descremada + yema de huevo y recalentados a 35°C, se disminuyó la temperatura de 35°C a 5°C en 150 min (1°C/5m) luego se adiciono glicerol en diferentes proporciones, equilibrado por 30min y su posterior congelación en vapores de nitrógeno expuestos por 20min, estos valores similares posiblemente se deberían porque se utilizó espermatozoides de epidídimo libres de plasma seminal.

Morton *et al.* (2010) reportó una motilidad individual a la descongelación de 14.4%, donde los epidídimos fueron transportadas y refrigeradas en PBS, en el laboratorio fue resuspendido con lactosa, se suplementó con 1.5% Equex STM® antioxidante comercial (obteniendo una concentración final de 0.5%) luego se adiciono glicerol (obteniendo una concentración final de 2-4% de glicerol) para su posterior congelación, los datos reportados por el autor son similares en comparación al presente trabajo posiblemente se debería a la obtención de

espermatozoides de epidídimo libres de plasma seminal. El mismo autor en el mismo año reporta 21.5% motilidad individual a la descongelación realizado con diferente tratamiento donde los espermatozoides de epidídimos fueron congelados con 1 mL del dilutor comercial Biladyl® conteniendo 20% de yema de huevo, además adicionando antioxidante comercial Equex STM® 2%, para su congelación se adiciono glicerol 6% (obteniendo una concentración final de 3%), los datos son mayores en comparación al presente trabajo esto posiblemente se debería a la adición de antioxidante y porcentaje de glicerol utilizado.

Mientras que Banda, *et al.* (2010) Reporto una motilidad individual a la descongelación de 14.0%, espermatozoides a partir de testículos de alpaca conservados a 5°C, se adiciono 6 ml de glicerol, 0.15g de EDTA y 7.6g de trehalosa, el enfriamiento fue de 37°C a 5°C en 90 min, congelado en el software Cryogenesis 4.0; estos resultados similares que obtuvo el autor se debería a la obtención de espermatozoides de epidídimos libres de plasma seminal que determinaría la motilidad reportada por el autor.

4.3.2 Motilidad progresiva

En la tabla 12 se muestra la motilidad individual a la descongelación para el Tris-YH 9.97 %, Tris-YH + Plasma seminal 11.22 %.

**TABLA 12. MOTILIDAD PROGRESIVA A LA DESCONGELACION
SEGÚN DILUTOR.**

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	9.97	11.22
Rango	12.85 – 8.54	15.33 – 9.38

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza muestra que los tratamientos de Tris-YH 9.97% y Tris-YH + plasma seminal 11.22% son similares ($p \geq 0.05$).

Ordóñez *et al.* (2013) reportó una motilidad progresiva de 1.48%, la obtención de semen fue por electroeyaculación, diluido en tris con 25 ml de yema de huevo, se adicionó 7mL de glicerol y el tiempo de equilibrado fue de 1h a una temperatura de 4°C, los resultados menores del autor en comparación a nuestros resultados se debería principalmente al método de colección y la presencia del plasma seminal al momento de la congelación. Durante la criopreservación el plasma seminal tiene un efecto en la distribución de fosfolípidos y proteínas en la membrana plasmática se altera y provoca una capacitación prematura del spz, disminuyendo su viabilidad. Los estudios revelan que los cambios de temperatura afectan la integridad de las células en niveles estructurales por la rotura mecánica de la

membrana y por la redistribución de los fosfolípidos en la misma (Watson 1999; Moussa *et al.* 2002).

En otras especies el autor Heise *et al.* (2011) reportó una motilidad progresiva de 10 % en caballos, donde los espermatozoides de epidídimos fueron obtenidos por castración libre de plasma seminal y evaluados en baño maría a 37°C suspendida en leche desnata sometida a centrifugación media por 10 min a 600×g, fue equilibrado por 60 min a 4°C y se congeló a una altura de 3.5 cm por encima de vapores de nitrógeno por 20 min, estos valores reportados por el autor son similares al presente trabajo, esto se debería principalmente a la obtención de espermatozoides libres de plasma seminal y el proceso de refrigeración y congelación sin plasma seminal. El mismo autor en el mismo año realizó el mismo trabajo, reportando una motilidad progresiva de 10% pero incluyendo la adición de plasma seminal homólogo al momento de congelar, este valor reportado por el autor es similar al presente trabajo esto se debería al factor especie y la obtención de espermatozoides de epidídimo para su posterior reposición con plasma seminal homólogo. Componentes del plasma seminal como carbohidratos, lípidos, proteínas y minerales, influyen en la capacidad fecundante de los espermatozoides. El estudio de las funciones de las proteínas del plasma seminal, ha permitido su uso en el proceso de criopreservación, con el fin de incrementar la viabilidad espermática post-descongelación (Barrios *et al.* 2000; Moura y Hasan, 2006).

4.3.3 Vitalidad

En la tabla 13 se muestra la vitalidad a la descongelacion para el Tris-YH 12.67 %, Tris-YH + Plasma seminal 14.74 %.

TABLA 13. VITALIDAD A LA DESCONGELACION SEGÚN DILUTOR.

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	12.67	14.74
Rango	18.50 – 9.45	20.16 – 9.95

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza muestra que los tratamientos de Tris-YH y Tris-YH + plasma seminal son similares ($p \geq 0.05$).

No se encontró reportes acerca de estos parámetros evaluados de espermatozoides de alpaca a la descongelación, sin embargo estudios en otras especies estudiadas por el autor Singh *et al.* (2007) reporto una vitalidad de 67.9% en búfalos, donde la colección de espermatozoides fue por punciones múltiples del epidídimo suspendidos en tris con 10% de yema de huevo, el periodo de equilibrio fue en un tiempo de 3 h a 5°C, su congelación fue por 10 min sometidos a vapores de nitrógeno, estos valores reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, esta mayor vitalidad se debería principalmente al factor especie.

Mientras que el autor Hishinuma *et al.* (2003) reporto 83.2% de viabilidad en ciervos, de espermatozoides de epidídimo almacenados en recipientes a 4°C luego estos fueron trasportados al laboratorio donde se realizó múltiples incisiones y suspendidos en 2-3 mL de Tris por 15 min en baño maría a 37°C, se utilizó

colorante eosina evaluando espermatozoides coloreados de color rojo, para la congelación se adiciono 10% de yema de huevo y 8% de glicerol, equilibrado a 4°C por 1h, estos valores reportados por el autor son mayores respecto al presente trabajo, esto se debería principalmente al factor especie.

4.3.4 Test-hiposmotico

En la tabla 14 se muestra la integridad de membrana a la descongelacion para el Tris-YH 21.54 %, Tris-YH + Plasma seminal 27.24 %.

TABLA 14. TEST – HIPOSMOTICO A LA DESCONGELACION SEGÚN DILUTOR.

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	21.54	27.24
Rango	26.12 – 15.12	31.16 – 21.21

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza muestra que el tratamiento de Tris-YH 21.54% es inferior al tratamiento Tris-YH + plasma seminal 27.24% ($p \geq 0.05$).

Banda *et al.* (2010) reporto una integridad de membrana a la descongelación de 24.3%, a partir de espermatozoides de testículos trasladados y refrigerados con suero fisiológico a 5°C, se adiciono 10% de yema de huevo al dilutor Tris, se adiciono 6 ml de glicerol, 0.15g de EDTA y 7.6g de trehalosa, el enfriamiento fue de 37°C a 5°C en 90 min, congelado en el software Cryogenesis 4.0; estos resultados similares que obtuvo el autor en comparación a nuestros resultados se

debería a la obtención de espermatozoides de epidídimos libres de plasma seminal que determinaría la motilidad reportada por el autor.

Sin embargo estudios en otras especies existe reportes el autor Singh *et al.* (2007) reporto una integridad de membrana 59.4% a la descongelación en espermatozoides de búfalos, la colección de espermatozoides fue por punciones múltiples del epidídimo suspendidos en Tris con 10% de yema de huevo, el periodo de equilibrio fue por 3h a 5°C, la congelación realizada en 10 min sometidos a vapores de nitrógeno, estos valores reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, esta mayor integridad de membrana se debería principalmente al factor especie.

4.3.5 Integridad de Acrosoma

En la tabla 15 se muestra la integridad de membrana a la descongelación para el Tris-YH 25.12 %, Tris-YH + Plasma seminal 28.83 %.

**TABLA 15. INTEGRIDAD DE ACROSOMA A LA DESCONGELACION
SEGÚN DILUTOR.**

DILUTOR	TRIS+YH	TRIS+PLASMA SEMINAL
n	5	5
Promedio	25.12	28.83
Rango	29.45 – 19.94	31.55 – 26.33

a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ($p > 0.05$)

Al análisis de varianza muestra que el tratamiento de Tris-YH es inferior al tratamiento Tris-YH + plasma seminal ($p \geq 0.05$).

Choez *et al.* (2014). Reporto una integridad de acrosoma de 17.9% de espermatozoides de alpaca, a partir de espermatozoides epidídimarios de testículos de camal transportados y refrigerados en cloruro de sodio 0.9% a 5°C, diluidos en leche descremada + yema de huevo y recalentados a 35°C, se disminuyó la temperatura de 35°C a 5°C en 150 min (1°C/5m) luego se adiciono glicerol en diferentes proporciones, equilibrado por 30 min y su posterior congelación en vapores de nitrógeno expuestos por 20 min, estos valores menores reportados por el autor posiblemente se deberían que espermatozoides de epidídimo libres de plasma seminal fueron recalentados para su evaluación además influiría el tiempo de congelación.

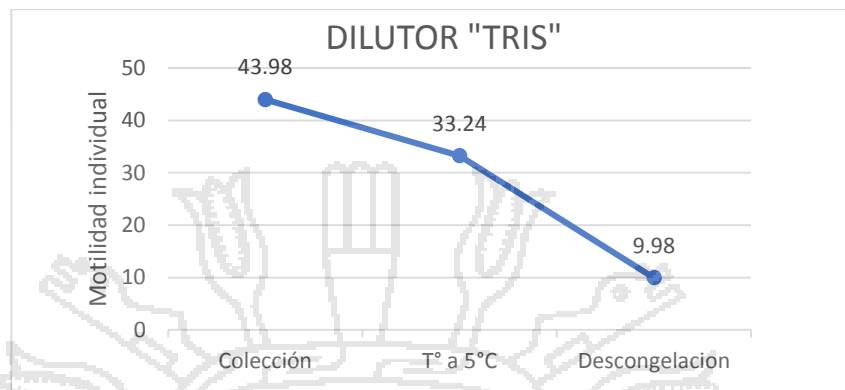
Morton *et al.* (2010) reporto una integridad de acrosoma a la descongelación de 81.3%, donde los epidídimos fueron transportadas y refrigeradas en PBS, en el laboratorio fue resuspendido con lactosa, se suplemento con 1.5% Equex STM® antioxidante comercial (obteniendo una concentración final de 0.5%) luego se adiciono glicerol en diferentes proporciones (obteniendo una concentración final de 2-4% de glicerol) para su posterior congelación, los datos reportados por el autor son similares en comparación al presente trabajo posiblemente se debería a la obtención de espermatozoides de epidídimo libres de plasma seminal. El mismo autor reporto 89.6% integridad de acrosoma a la descongelación realizando un diferente tratamiento donde los espermatozoides de epidídimos fueron congelados con el dilutor comercial 1ml Biladyl® conteniendo 20% de yema de huevo, además adicionando antioxidante comercial Equex STM® 2%, para su congelación se adiciono glicerol 6% (obteniendo una concentración final de 3%), los datos son mayores en comparación al presente trabajo esto posiblemente se debería a la adición de antioxidante. Los principales efectos nocivos de ROS en

espermatozoides incluyen la disminución de la motilidad, incremento de la peroxidación lipídica en la membrana plasmática e incremento en la fragmentación del ADN espermático. La pérdida de motilidad es el indicador más sensible de estrés oxidativo en comparación con otros parámetros seminales (Peris *et al.*, 2007). Sin embargo, cuando se adiciona estos antioxidantes a los 5°C, es decir al final de la curva de enfriamiento, se consigue una motilidad superior al Santiani (2003).

Sin embargo estudios en otras especies existe reportes el autor Singh *et al.* (2007) reporto una integridad de acrosoma 71.8% en búfalos, donde la colección de espermatozoides fue por punciones múltiples del epidídimo suspendidos en Tris con 10% de yema de huevo, el periodo de equilibrio fue en un tiempo de 3h a 5°C, su congelación fue por 10 min sometidos a vapores de nitrógeno, estos valores reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, esta mayor integridad de acrosoma se debería principalmente al factor especie.

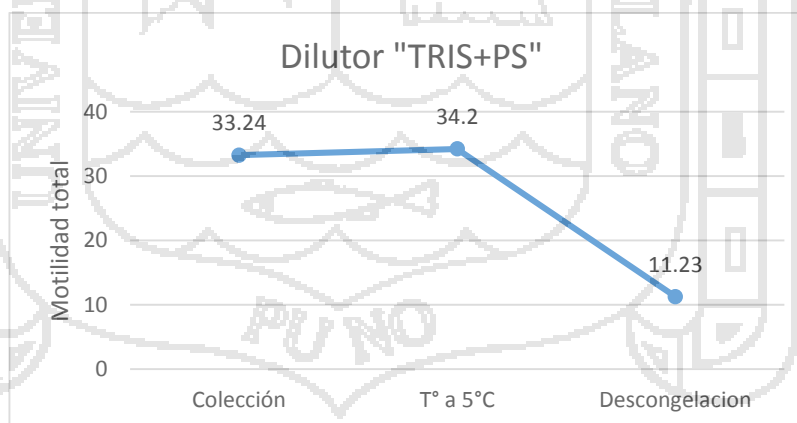
GRAFICOS DE MOTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA

Grafico 01: Motilidad espermática frente a la disminución de temperatura con el dilutor “TRIS”.



La motilidad de los espermatozoides colectados de conducto deferente disminuyó progresivamente a medida que disminuyó la temperatura. Indicando en el gráfico que la motilidad individual disminuyó de 43.98% al momento de colección frente a descongelación con 9.98% diluidos en Tris + 20% de yema de huevo.

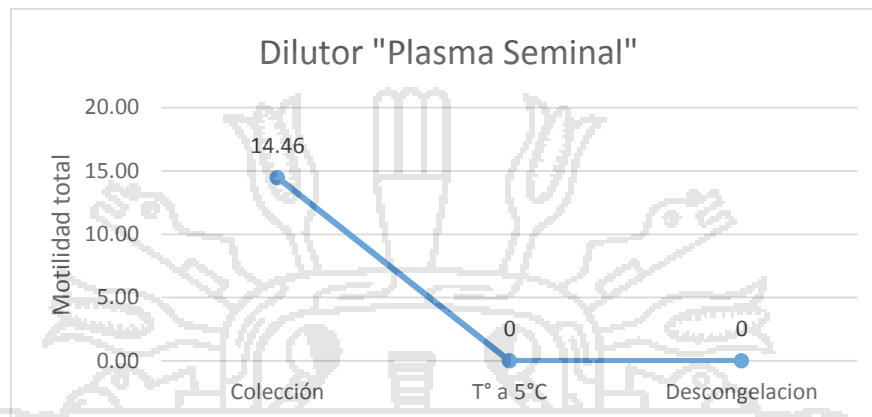
Grafico 02: Motilidad espermática frente a la disminución de temperatura con el dilutor “TRIS + PLASMA SEMINAL”.



La motilidad de los espermatozoides colectados de conducto deferente disminuyó progresivamente a medida que disminuyó la temperatura. Indicando en el gráfico que la motilidad individual disminuyó de 33.24% al momento de colección frente

a descongelación con 11.23% diluidos en Tris + 20% de yema de huevo + la adición de plasma seminal de toro.

Grafico 03: Motilidad espermática frente a la disminución de temperatura con el dilutor “PLASMA SEMINAL”.



La motilidad de los espermatozoides colectados de conducto deferente disminuyó drásticamente a medida que disminuyó la temperatura. Indicando en el gráfico que la motilidad individual disminuyó de 14.46% al momento de colección, así en este tratamiento no alcanzó a la temperatura de 5°C, habiendo una mortalidad total de los espermatozoides diluidos en puro plasma seminal de toro.

V. CONCLUSIONES

- 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 hubo diferencia estadística.



VI. RECOMENDACIONES

Utilizar plasma seminal heterólogo y/o homólogo en diferentes proporciones para incrementar y mejorar los parámetros del espermatozoide de alpaca.



VII. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ACHATA, R. 1989. Concentración de algunos componentes del plasma seminal en alpacas. Puno: Tesis FMVZ – UNA.

ALLER, J., G. E. REBUFFI, A. K. CANCINO, R. H. ALBEIRO. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*) Arch. de Zootecnia 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 R., V. EVANGELISTA, G. RUIZ, M. SANDOVAL, LL. RODRIGUEZ, C. VALDIVIA, Y A. SANTIANI. 2010. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y Leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos de epididimo de alpaca. Rev. Inv. Peru. 2010, vol. 21, p. 145-153.

BANSAL A, G. BILASPURI. 2007. Effect of ferrous ascorbate on in vitro capacitation and acrosome reaction in cattle bull spermatozoa. Animal Science Report. vol. 1, n°. 2, p. 69 – 77.

BAKST MR, AND HC.CECIL. 1992. Effect of bovine serum albumin on motility and fecundity of turkey spermatozoa before and after storage. J Reprod Fert; 94:287-293.

BARRIOS B, M. FERNÁNDEZ-JUAN, T. MUIÑO-BLANCO, J.A. CEBRIÁN-PÉREZ. 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. J Androl; 26:539-549.

BARRIOS B, PE. PEREZ, M. GALLEGU. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod*; 63:1531-1537.

BERGERON A, AND P. MANJUNATH. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Develop* 73 : 1338–1344.

BRAVO, P.W. 1995. Physiology of Reproduction in the Female Alpacas, *Rev. Camelids No 7*; Ed. Pos Graduate Foundation in Veterinary Science, Sidney – Australia.

BRAVO PW, U. FLORES, J. GARNICA, AND C. ORDOÑEZ. 1997a. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*; 47:619-626.

BRAVO PW, D. FLORES, AND C. ORDOÑEZ. 1997b. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biol Reprod*; 57:520-524.

BRAVO, W., 1998. Avances en la fisiología reproductiva del macho llama y alpaca, XXI Reunión científica anual APPA, Facultad MVZ UNA-Puno, Perú.

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.

BUSCH, W. Y D. WABERSKI, 2007. Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica. Editorial: Acribia, S.A. Zagoza. España.

BUSTINZA, V. 2001. La Alpaca, Primera Edición, Editorial UNA-PUNO, Puno, Perú.

Cebra C, Anderson D, Tibary A, Van Saun RJ, Johnson LW., 2014: Llama and alpaca care. 1st edition. Elsevier Inc. St Lois.

CAPARO, Y. 2009. Isenminacion artificial en alpacas (Lama pacos) con semen diluido, Tesis, FMVZ – UNA. Puno - Perú.

CARPIO, M., C .ORDOÑES, V. ALARCÓN Y W. BRAVO. 1999. Presencia de espermatozoides, niveles de testosterona y tamaño testicular en alpacas, II Congreso Mundial sobre Camélidos Sudamericanos, Cusco - Perú.

COLAS C, C. JUNQUERA, R. PEREZ-PE, JA. CEBRIÁN-PÉREZ, AND T. MUIÑO-BLANCO. 2009 Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microsc Res Tech*; 72:566-572.

CORMIER S, MA. SIRARD, AND JL. BAILEY. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl.* 18: 461-468.

CHOEZ K., S. EVANGELISTA, L. RUIZ, R. SANDOVAL, A. SANTIANI. 2014. Efecto de la concentración de tres crioprotectores sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de Espermatozoides criopreservados de epididimo de alpacas permova. 2014; 4(1): 80 – 82.

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.

DE ALBA, J., 1985. Reproducción Animal, Editorial La Prensa Médica Mexicana, México.

DERIVAUX, J. 1982. Reproducción de los animales Domésticos. España: Editorial Acribia.

DESNOYERS, L., I. THERIEN, AND P. MANJUNATH. 1994.

Characterization of the major proteins of bovine seminal fluid by two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Mol Reprod Dev*; 37:425-435.

DIRECTOR, A., S. GIULIANO, M. CARRETERO, M. PINTO, V.

TRASORRAS, AND M. MIRAGAYA. 2007. *Journal of Camel Practice and Research*. 14. N 2: 203- 206.

FERNÁNDEZ BACA, S. Y C. NOVOA, 1968. Primer ensayo de inseminación artificial en alpacas con semen de vicuñas, *Rev. FMV – UNMSM*. Lima – Perú.

FERNÁNDEZ-JUAN M, M. GALLEGO, B. BARRIOS, J. OSADA, J.A.

CEBRIÁN-PÉREZ Y T. MUIÑO-BLANCO. 2006. Immunohistochemical localization of sperm-preserving proteins in the ram reproductive tract. *J Androl*; 27:588-595.

FERNANDEZ-SANTOS MR, MC. ESTESO, V. MONTORO, AJ. SOLER,

JJ. GARDE. 2006. Cryopreservation of Iberian (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and coling rate. *Theriogenology*; 66: 1931-1942.

FERRÉR, L.B.; A. WERKMEISTER. 1996. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 16 (4), 363-365.

FUMUSO, F.G., M.L. GIMÉNEZ , D.M. NEILD , S.M. GIULIANO , M.G.

CHAVES , M.I. CARRETERO. 2014. Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosomá en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova*. 4(1): 50 - 53

FLORES P, J. GARCÍA-HUIDOBRO, C. MUÑOZ, E. BUSTOS-OBREGÓN AND B. URQUIETA. 2002. Alpaca semen characteristics previous to a mating period. *Anim Reprod Sci*, 72:259-266.

GARNER DL, CA. THOMAS, CG. GRAVANCE, CE. MARSHALL, JM. DEJARNETTE, AND CH. ALLEN. 2001: Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology* 56, 31–40.

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

GARNICA, J., R. ACHATA, AND W. BRAVO, 1993. Fisical and Biochemical Characteristic of Alpaca semen. *Revista animal Reproduction Sciense*.

GIULIANO, S., A. DIRECTOR, M. GAMBAROTTA, V. TRASORRAS, AND M. MIRAGAYA. 2008. *Ani Reprod Scien*, 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, Capítulo 10. *Reproducción de los animales domésticos*. España. Editorial Acribia S.A.

HAFEZ, E.S.E., 2000. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*, Traducido por: Roberto Palacios Martínez, Sexta Edición, Editorial Interamericana - Mc Graw - Hill, México.

HEISE A., P. THOMPSON, AND D. GERBER. 2011. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 123 (2011) 192–201.

HISHINUMA M., K. SUSUKI., J. SEKINE. 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stores at 4°C. *therionology*, 59. 813- 820.

HU JH, QW. LI, LS. ZAN, ZL. JIANG, JH. AN, LQ. WANG, AND YH. JIA. 2010. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins en extenders on bull spermatozoa following freezing-tawing. *Anim Reprod Sci*; 117:11-17

INEI. 2012. Instituto Nacional de Estadística e Informática, CENAGRO, IV Censo Nacional Agropecuario.

JEYENDRAN, R., H. VAN DER VEN, M. PEREZ-PELAEZ, B. CRABO, AND L. ZANEVELD. 1984 Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reprod. Fert.* 70, 219-228.

JONES, RC. ICA, MARTÍN. 1972. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrstructure of ram spermatozoa. *J Reprod Fert*; 35:311-320.

KNOBIL H. AND J. NEILL'S. 2006. *Physiolgy of reproduction*. In Vol. 1 Male reproductive system. Third ed. Elsevier Inc.

KARESKOSKI M, AND T. KATILA. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim. Reprod. Sci.* 107: 249-256.

KERSHAW – YOUNG AND WMC. MAXWELL. 2011. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64, 13–38.

KNOBIL AND NEILL'S. 2006. Physiology of reproduction. In Vol. 1 Male reproductive system. Third ed. Elsevier Inc.

LEYVA, V., J. SUMAR, Y E. FRANCO 1984. Estudio preliminar de la concentración de espermatozoides en el semen de alpacas obtenidos por vagina artificial, III Reunión APPA, Lima - Perú.

LICHTENWALNER, A.B., G.L. WOODS, AND J.A. WEBER. 1996. Theriogenology, 46: 293-305.

LOSNO, W. Y J. COYOTUPA, 1981. Testosterona sérica en alpacas machos pre púberes, Resúmenes compendiados de los proyectos de investigación realizados por la UNMSM, Periodo 1975 - 1979, Tomo II, Lima, Perú, pp 116.

LUBOS, H. 1983. Bases de la reproducción bovina, Primera Edición, Editorial Diana, México.

MANJUNATH P., J. LEFEBVRE, AND W. WRIGHT. 2009. New nomenclature for mammalian BSP genes. Biol Reprod; 80:394-397.

MANN, T. 1954: The Biochemistry of Semen. Methuen and Co Ltd, London.

MARTÍNEZ-PASTOR F., L. ANEL; C. GUERRA, M. ALVAREZ., J. SOLER, J. GARDE,; C. CHAMORRO, AND P. DE PAZ. 2006. Seminal plasma improves cryopreservation of Iberian red deer epididymal sperm. Science Direct. Theriogenology 66 (2006) 1847–1856

MAXWELL WMC, GR. WELCH, AND LA. JOHNSON, 1996. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. Reprod Fertil Dev 8, 1165–1178.

MAXWELL WMC, LA. JOHNSON. 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. Mol. Reprod. Dev. 46: 408-418.

MAXWELL W, AND L. JOHNSON. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52, 1353–1362.

MAXWELL WM, G. EVANS, ST. MORTIMER, L. GILLAN, ES. GELLATLY, AND CA. MCPHIE. 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*; 11:123– 6.

MAXWELL WMC, SP. DE GRAAF, RE-H. GHAOUI, AND G. EVANS. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64, 13–38.

MENDOZA, C. 2000. Evaluación de cuatro dilutores para la conservación de semen en alpacas, Tesis de la FMVZ- UNA, Puno - Perú.

MC CLURE N, M. O'CONNELL, AND SEM. LEWIS. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod.* 2002. Vol. 17. 704-9.

MOGROVEJO, D. 1952. Estudios del semen de alpacas. Tesis FMV, UNMSM. Lima Perú.

MORTON K., R. BATHGATE, G. EVANS, AND W. MAXWELL. 2007. Cryopreservation of epidymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of Citrate, Tris and Lactose based dilutents, and pellets and straws. *Reproduction Fertility y Develomepment.* 2007, vol. 19, p. 792-796.

MORTON K., G. EVANS, AND W. MAXWELL. 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 (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74 (2010) 311–316.

MOURA A, HASAN K., 2006. Identification of proteins in accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls. *J Androl*; 27(2):201-212.

MOUSSA M, V. MARTINET, A. TRIMECHE, D. TAINTURIER, AND M. ANTON. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-tawed bull semen. *Anim Reprod Sci.* 57:1695- 1706.

MUIÑO-BLANCO ET AL. 2008. Comparación y evaluación del plasma seminal de alpaca, llama y toro. Quinsachata-INIA. Puno – Peru.

NEILD DM, BM. GADELLA, AND MG. CHAVES. 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology.* 59:1693-1705.

ORDÓÑEZ C., E. AMPUERO, H. CUCHO, Y E. FRANCO. 2012. Avances en la determinación de la velocidad del Espermatozoide de alpaca en semen diluido usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). *Spermova*; 2(1): 63 - 64

ORDÓÑEZ C., H. CUCHO, E. AMPUERO, W. ANTEZANA, S. CAYO. 2013. Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. *Spermova.* 2013; 3(1): 65 – 66.

OLLERO M., J.A. CEBRIAN-PEREZ, AND T. MUIÑO-BLANCO, 1997: Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. *J Androl* 18, 732–739.

PACHECO, M., 1996. Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma del espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca, Tesis FMVZ UCSM, Arequipa - Perú.

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.

PACHECO J.-CURIE, R. MAMANI-CATO, F. FRANCO, O. ZEA, D. PEZO, Y V. VÉLEZ. 2014. Efecto de la osmolaridad sobre la respuesta endosmótica En espermatozoides de epididimo y eyaculados de alpaca (Vicugna pacos). Asociacion Peruana de Reproduccion Animal. SPERMOVA. 2014. Vol. 4(1) p. 36 – 38.

PALACIOS A, Y L. ZARCO 1996. Efecto de la sustitución de yema de huevo por albúmina sérica bovina, suero equino o suero bovino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad pos-descongelación del espermatozoide equino. Vet Mex; 27 (3) 221-227.

PARICAHUA, E. 2001. Evaluación del semen sin la secreción de las glándulas anexas en alpacas (Lama pacos), Tesis de la FMVZ- U NA, Puno - Perú.

PEREZ, G. 1997. Avances en la Inseminación artificial en Camélidos. La Técnica Completa, II Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos, Córdoba Argentina, pp. 97 -107.

PÉREZ, G.; E. APAZA, Y W. DEZA. 2006. Congelación de espermatozoides procedentes de conductos deferentes de camélidos. ALLPAQA Revista de Investigación del IIPC. Volumen 11-N°01.

PEREZ G., J. ZEVALLOS, Y H. PEREZ. 2014a. Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la epoca reproductiva. Spermova. 2014; 4(2): 139 – 144.

PEREZ G., J. QUINTANO, Y H. PEREZ. 2014b. Sobrevivencia espermática en refrigeración a 5 °c recuperados del conducto deferente de alpaca en tres dilutores con dos protectores de membrana. *Spermova*. 2014; 4(2): 153 – 158.

PEREZ-PE R, J. CEBRIÁN-PEREZ, Y T. MUIÑO-BLANCO. 2000. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*; 56:425-434.

PERIS SI, J. BOLIDEAU, M. DUFOUR, J. BAILEY. 2007. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram semen. *Mol Reprod Dev* 74:878-892.

PETRUZZI S.; S. TARANTINI, AND PN. ROYCHOUDHURY. 1976. Effect of different semen diluents on survival on ram spermatozoa at 5°C. *Zbi Vet Med A*; 23:556-561.

PRENDERGAST E., R. VISHWANATH, AND P. SHANNON. 1995. Protection of bovine sperm from the deleterious effects of seminal plasma by charged lipoprotein fractions of egg yolk. *Proc. 27 th Ann. Conf. Austr. Soc. Rep. Biol. Melbourne*; 27: p 50(abstract).

QUINTANO, J. 2002. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpacas (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores, Tesis de la 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.

RATTO, M., M. WOLTER, C. GÓMEZ, AND M. BERLAND. 1999. Refrigeration of epididymal sperm from lama with three different extenders. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.

REBOLLEDO AD., L. SIERRA, A. TAMAYO, A. LORIA, S. DENIS, R. OSES, E. PARRA, L. MONSREAL, AND J. UGALDE, 2007. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. Rev Cient Fac Cienc Veter 17, 73–76.

RIVERA, E. 1998. Uso de la yema de huevo y glicerina en la sobrevivencia de los espermatozoides en el semen de alpacas, Tesis 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.

SALISBURY, G., L. VAN DER MACK 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., W. HUANCA, R. SAPANA, T. HUANCA, N. SEPULVEDA, AND R. SANCHEZ, 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (Lama pacos) semen using two different cryoprotectants and extenders. Asian Journal of Andrology., vol. 7, p 303-9

SATO, A. Y C. MONTOYA. 1990. Aparato Reprodutor de la Alpaca (Lama pacos) Anatomía Macroscópica, Revista de Camélidos Sudamericanos, N°07 IVITA, CICCIS, UNMS, Lima - Perú.

SENAMHI, 2012 Servicio Nacional de Meteorología e Hidrografía, Puno – Peru. Revista.

SINGH P., H. HARSHAN, AND R. ANSARI. 2007. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 99 (2007) 395 – 400.

SUMAR, J. Y V. LEYVA. 1981. Colección de semen mediante VA en la alpaca (Lama pacos) Memoria IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos, Patagonia - Punta Arenas – Chile.

SU L, LI X, J. QUAN, S. YANG, Y. LI, X. HE, AND X. TANG. 2008. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Anim Reprod Sci* 104: 212-219.

TÖPFER – PETERSEN E, M. EKHLASI – HUNDRIESER, M. TSOLOVA, T. LEEB, C. KIRCHHOFF, AND P. MÜLLER. 2005. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrología* 37: 202 – 204

THERIEN I, S. SOUBEYRAND, P. MANJUNATH. 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by highdensity lipoprotein. *Biol. Reprod.* 57: 1080-1088.

VADNAIS ML, R. KIRKWOOD, D. SPECHER, AND K. CHOU, 2005: Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. *Anim Reprod Sci*; 90: 347–54.

- VENCATO, J.; D. PONCE; E. HUAMÁN; G. GAMARRA; W. VIVANCO. 2008.** Resúmenes Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal APPA.
- VON BAER, L. Y C. HELLEMAN. 1998.** Variables seminales en llama (Lama glama) Journal Arch. Med. Vet. Vol 30 n.2 Valdivia.
- VAUGHAN, J., D. GALLOWAY Y D. HOPKINS, 2003.** Artificial inseminación in Alpacas (Lama pacos). Australia government. 1(1) hallado en: www.rirdc.gov.au/reports/RNF/03-104sum.html
- WATSON P. 2000.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 2000, vol. 60, p. 481 – 492.
- WATSON PF. 1999.** Cooling of spermatozoa and fertility capacity. Reprod Domest Anim; 31:135-40.
- WATSON PF, AND ICA. MARTÍN ICA, 1972.** The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5 or – 196°C. Department of Veterinary Physiology, University of Sidney, Sidney. N.S.W, 927-934 pp.
- YOUNGUIST R. AND W. THRELFALL, 2007.** Current therapy in large animal theriogenology: in Reproductive Anatomy and Life Cycle of the Male and Female Llama and Alpaca. 2th ed. by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.



ANEXOS

ESPERMIOGRAMA DE ALPACA																				
TRATAMIENTO TRIS-YEMA DE HUEVO																				
FECHA	REPET.	COLECTADO							a 5 °C						DESCONGELADO					
		Mot. T.	Mot. P.	Vit.	Concentra.	T. H.	I. Ac.	TOTAL	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H.	I. Ac.	Nº Paj	Paj. Ev.	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H.	I. Ac.
15/06/2015	1	39.1	26.2	34.12	83000000	54.2	48.8	112	23.14	20.21	15.23	30.21	35.24	3.5	1	15.32	10.45	13.85	15.12	29.45
															2	18.15	9.18	15.81	23.6	29.41
20/06/2015	2	45.2	31.45	33.2	74000000	41.9	45.6	150	37.03	30.24	30.56	35.26	45.8	3.5	1	13.54	9.45	10.06	25.31	23.83
															2	10.38	9.23	10.25	22.04	25.46
23/06/2015	3	46.6	37.5	33.12	73000000	45.2	45.3	120	30.66	18.25	26.31	30.11	38.91	4	1	11.29	9.54	10.7	18.45	25.13
															2	11.36	9.26	9.82	18.2	24.31
25/06/2015	4	46.8	36.12	39.31	80000000	49.7	41.1	130	40.21	35.26	31.2	33.45	40.65	3.5	1	22.51	11.26	18.5	25.07	24.31
															2	20.35	12.85	17.45	25.32	28.92
27/06/2015	5	42.2	30.5	33.9	75000000	42.2	43.2	124	35.16	26.75	28.95	38.56	45.7	3.5	1	9.15	8.54	9.45	26.12	20.45
															2	12.58	10.01	10.87	16.21	19.94
PROMEDIO		43.98	32.35	34.73	77000000	46.6	44.8		33.24	26.142	26.45	33.52	41.26			14.463	9.977	12.68	21.54	25.12

ESPERMIOGRAMA DE ALPACA								
TRATAMIENTO 100% PLASMA								
FECHA	REPET.	COLECTADO						
		Mot. T.	Mot. P.	Vit.	Concentra.	T. H.	I. Ac.	TOTAL
13/07/2015	1	25.5	15.06	19.23	34000000	39.49	36.95	150
16/07/2015	2	42.91	38.54	40.71	30000000	50.28	50.98	140
19/07/2015	3	38.58	32.89	37.53	35000000	45.58	39.89	130
21/07/2015	4	24.69	18.26	20.19	35000000	35.29	30.42	120
25/07/2015	5	25.46	18.77	23.12	34000000	36.54	32.78	130
PROMEDIO		31.428	24.7	28.16	33600000	41.44	38.2	

ESPERMIOGRAMA DE ALPACA																				
TRATAMIENTO TRIS-YEMA DE HUEVO + PLASMA SEMINAL																				
FECHA	REPET.	COLECTADO							a 5 °C						DESCONGELADO					
		Mot. T.	Mot. P.	Vit.	Concentra.	T. H.	I. Ac.	TOTAL	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H.	I. Ac.	Nº Paj	Paj. Ev.	Mot. T.	Mot. P.	Vit.	T. H.	I. Ac.
30/06/2015	1	35.47	20.38	35.4	40000000	41.4	45.33	136	31.39	20.35	31.72	39.38	42.53	4	1	15.78	10.46	16.91	28.86	30.51
															2	15.65	11.02	15.99	30.12	29.92
03/07/2015	2	38.82	21.78	38.6	48000000	42.3	44.2	123	36.56	21.52	36.23	37.69	38.32	3.5	1	10.26	9.38	12.42	24.52	26.33
															2	11.98	9.87	9.95	21.21	28.12
05/07/2015	3	38.25	28.65	36.5	37000000	47.1	43.38	122	34.59	27.6	34.15	40.25	39.95	3	1	22.93	13.38	20.16	31.16	31.55
															2	18.83	11.54	18.86	29.56	30.01
07/07/2015	4	41.12	28.85	39.1	38000000	53.6	45.88	113	38.21	28.33	37.44	42.9	39.65	3.5	1	10.61	9.42	11.15	22.81	26.38
															2	11.54	9.88	10.45	25.79	26.36
09/07/2015	5	35.36	25.97	36.3	40000000	45.8	48.39	110	30.25	22.37	29.98	40.28	41.92	3	1	20.47	15.33	19.84	28.88	29.52
															2	18.56	12.01	11.74	29.55	29.66
PROMEDIO		37.804	25.126	37.2	40600000	46	45.436		34.2	24.034	33.904	40.1	40.47			15.661	11.229	14.747	27.25	28.84

TRATAMIENTO TRIS-YEMA DE HUEVO

TRATAMIENTO TRIS-YEMA DE HUEVO + PS

FECHA	REPET.	Nº	ASPEC.	VOL. (gtas)	Nº Colec.
15/06/2015	1	Alpa 01	BL	6	1
		Alpa 02	BC	3	1
		Alpa 03	BL	1	1
		Alpa 04	Bci	2	1
20/06/2015	2	Alpa 01	BL	6	2
		Alpa 02	BL	3	2
		Alpa 03	BL	1	2
		Alpa 04	BCi	2	2
23/06/2015	3	Alpa 01	BL	6	3
		Alpa 02	BL	3	3
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	2	3
25/06/2015	4	Alpa 01	BL	7	4
		Alpa 02	BL	2	4
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	2	4
27/06/2015	5	Alpa 01	BL	7	5
		Alpa 02	BL	2	5
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	2	5

FECHA	REPET.	Nº	ASPEC.	VOL. (gtas)	Nº Colec.
30/06/2015	1	Alpa 01	BL	5	6
		Alpa 02	BL	4	6
		Alpa 03			
		Alpa 04	Bci	2	6
03/07/2015	2	Alpa 01	BL	6	7
		Alpa 02	BL	2	7
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	4	7
05/07/2015	3	Alpa 01	BL	6	8
		Alpa 02	BL	3	8
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	2	8
07/07/2015	4	Alpa 01	BL	7	9
		Alpa 02	BL	3	9
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	2	9
09/07/2015	5	Alpa 01	BL	7	10
		Alpa 02	BL	3	10
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	4	10

TRATAMIENTO PLASMA SEMINAL

FECHA	REPET.	Nº	ASPEC.	VOL. (gtas)	Nº Colec.
13/07/2015	1	Alpa 01	BL	5	11
		Alpa 02	BL	1	11
		Alpa 03			
		Alpa 04	Bci	2	11
16/07/2015	2	Alpa 01	BL	5	12
		Alpa 02	BL	1	12
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	2	12
19/07/2015	3	Alpa 01	BL	4	13
		Alpa 02	BL	1	13
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	2	13
21/07/2015	4	Alpa 01	BL	4	14
		Alpa 02	BL	1	14
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	2	14
25/07/2015	5	Alpa 01	BL	4	15
		Alpa 02	BL	2	15
		Alpa 03			
		Alpa 04	BCi	2	15

**PRUEBAS ESTADÍSTICAS
(SAS)**

MOTILIDAD INDIVIDUAL

Obs trat rep motto

1	1	1	39.10
2	1	2	45.20
3	1	3	46.60
4	1	4	46.80
5	1	5	42.20
6	2	1	23.14
7	2	2	37.03
8	2	3	30.66
9	2	4	40.21
10	2	5	35.16
11	3	1	16.74
12	3	2	11.96
13	3	3	11.33
14	3	4	21.43
15	3	5	10.87

Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase Niveles Valores

trat 3 1 2 3

rep 5 1 2 3 4 5

Número de observaciones 15

Procedimiento GLM

Variable dependiente: motto

Fuente	Suma de DF	Cuadrado de cuadrados	la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	2231.478120	1115.739060	44.44	<.0001
Error	12	301.299920	25.108327		

Total correcto 14 2532.778040

R-cuadrado Coef Var Raiz MSE motto Media

0.881040 16.39559 5.010821 30.56200

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo I SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	2231.478120	1115.739060	44.44	<.0001



Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	2231.478120	1115.739060	44.44	<.0001

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para motto

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	25.10833
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	8.4544

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY

o	Media	N	trat
A	43.980	5	1
B	33.240	5	2
C	14.466	5	3

MOTILIDAD PROGRESIVA

Obs	trat	rep	motpro
1	1	1	26.20
2	1	2	31.45
3	1	3	37.50
4	1	4	36.12
5	1	5	30.50
6	2	1	20.38
7	2	2	21.78
8	2	3	28.65
9	2	4	28.85
10	2	5	25.97
11	3	1	15.06
12	3	2	38.54
13	3	3	32.89
14	3	4	18.26
15	3	5	18.77

Procedimiento GLM

Información del nivel de clase



Clase Niveles Valores
 trat 3 1 2 3
 rep 5 1 2 3 4 5

Número de observaciones 15

Procedimiento GLM

Variable dependiente: motpro

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	184.9076133	92.4538067	1.94	0.1861
Error	12	571.6993600	47.6416133		
Total correcto	14	756.6069733			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	motpro Media
0.244391	25.19575	6.902290	27.39467

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo I SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	184.9076133	92.4538067	1.94	0.1861

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	184.9076133	92.4538067	1.94	0.1861

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para motpro

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	47.64161
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	11.646

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY

o	Media	N	trat
A	32.354	5	1
A	25.126	5	2
A	24.704	5	3

VITALIDAD

Obs trat rep vital

1	1	1	34.12
2	1	2	33.20
3	1	3	33.12
4	1	4	39.31
5	1	5	33.90
6	2	1	35.38
7	2	2	38.55
8	2	3	36.52
9	2	4	39.05
10	2	5	36.27
11	3	1	19.23
12	3	2	40.71
13	3	3	37.53
14	3	4	20.19
15	3	5	23.12

Información del nivel de clase

Clase Niveles Valores

trat 3 1 2 3

rep 5 1 2 3 4 5

Número de observaciones 15

Procedimiento GLM

Variable dependiente: vital

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	216.7620933	108.3810467	2.88	0.0948
Error	12	450.8112400	37.5676033		
Total correcto	14	667.5733333			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	vital Media		
0.324702	18.38037	6.129242	33.34667		

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	216.7620933	108.3810467	2.88	0.0948

Fuente	DF	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	216.7620933	108.3810467	2.88	0.0948

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para vital

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa 0.05
 Error de grados de libertad 12
 Error de cuadrado medio 37.5676
 Valor crítico del rango estudentizado 3.77278
 Diferencia significativa mínima 10.341

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY

o	Media	N	trat
A	37.154	5	2
A	34.730	5	1
A	28.156	5	3

Obs	trat	rep	host
1	1	1	54.20
2	1	2	41.94
3	1	3	45.20
4	1	4	49.70
5	1	5	42.15
6	2	1	41.36
7	2	2	42.30
8	2	3	47.12
9	2	4	53.58
10	2	5	45.82
11	3	1	39.49
12	3	2	50.28
13	3	3	45.58
14	3	4	35.29
15	3	5	36.54



Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
trat	3	1 2 3
rep	5	1 2 3 4 5
Número de observaciones	15	



Procedimiento GLM

Variable dependiente: host

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	80.9720133	40.4860067	1.33	0.3012
Error	12	365.7173200	30.4764433		

Total correcto	14	446.6893333			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	host Media		
0.181271	12.34930	5.520547	44.70333		

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo I SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	80.97201333	40.48600667	1.33	0.3012

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	80.97201333	40.48600667	1.33	0.3012

Sistema SAS

Procedimiento GLM

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para host

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	30.47644
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	9.3145

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY

o	Media	N	trat
A	46.638	5	1
A			
A	46.036	5	2
A			
A	41.436	5	3



INTERGRIDAD DE ACROSOMA

Obs trat rep integr

1	1	1	48.80
2	1	2	45.62
3	1	3	45.26
4	1	4	41.11
5	1	5	43.15
6	2	1	45.33
7	2	2	44.20
8	2	3	43.38
9	2	4	45.88
10	2	5	48.39
11	3	1	36.95
12	3	2	50.98
13	3	3	39.89
14	3	4	30.42
15	3	5	32.78

Información del nivel de clase

Clase Niveles Valores

trat 3 1 2 3

rep 5 1 2 3 4 5

Número de observaciones 15

Variable dependiente: interg

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	2	160.1179733	80.0589867	3.14	0.0798
Error	12	305.5629200	25.4635767		
Total correcto	14	465.6808933			
R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	interg Media		
0.343836	11.78749	5.046145	42.80933		

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo I SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	160.1179733	80.0589867	3.14	0.0798

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
trat	2	160.1179733	80.0589867	3.14	0.0798

Prueba del rango estudentizado de Tukey (HSD) para interg

NOTA: Este test controla el índice de error experimentwise de tipo I, pero normalmente tiene un índice de error de tipo II más elevado que REGWQ.

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	25.46358
Valor crítico del rango estudentizado	3.77278
Diferencia significativa mínima	8.514

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

TUKEY

o	Media	N	trat
A	45.436	5	2
A			
A	44.788	5	1
A			
A	38.204	5	3

PRUEBA DE "T"

PRUEBA DE T: MOTILIDAD TOTAL A 5

Paired T for TRIS - TRIS PS

	N	Mean	StDev	SE Mean
TRIS	5	33.2400	6.6200	2.9606
TRIS PS	5	34.2000	3.3653	1.5050
Difference	5	-0.960000	5.177557	2.315474

95% CI for mean difference: (-7.388787, 5.468787)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -0.41 **P-Value = 0.700**

PRUEBA DE T: MOTILIDAD PROGRESIVA A 5

Paired T for TRIS - TRIS + PS

	N	Mean	StDev	SE Mean
TRIS	5	26.1420	7.0316	3.1446
TRIS + PS	5	24.0340	3.6685	1.6406
Difference	5	2.10800	7.21927	3.22856

95% CI for mean difference: (-6.85591, 11.07191)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 0.65 P-Value = 0.549

PRUEBA DE T: VITALIDAD A 5

Paired T for TRIS - TRIS + PS

	N	Mean	StDev	SE Mean
TRIS	5	26.4500	6.5500	2.9293
TRIS + PS	5	33.9040	3.0879	1.3810
Difference	5	-7.45400	5.65072	2.52708

95% CI for mean difference: (-14.47029, -0.43771)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -2.95 P-Value = 0.042

PRUEBA DE T: HOST A 5

Paired T for TRIS - TRIS + PS

	N	Mean	StDev	SE Mean
TRIS	5	33.5180	3.5714	1.5972
TRIS + PS	5	40.1000	1.8856	0.8432
Difference	5	-6.58200	4.13705	1.85014

95% CI for mean difference: (-11.71882, -1.44518)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -3.56 P-Value = 0.024

PRUEBA DE T: INTEGRIDAD A 5

Paired T for TRIS - TRIS + PS

	N	Mean	StDev	SE Mean
TRIS	5	41.2600	4.5404	2.0305
TRIS + PS	5	40.4740	1.7256	0.7717
Difference	5	0.786000	5.531173	2.473616

95% CI for mean difference: (-6.081859, 7.653859)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = 0.32 P-Value = 0.767

PRUEBA DE T: MOTILIDAD TOTAL A DESCONGELACION

Paired T for TRIS - TRIS + PS

	N	Mean	StDev	SE Mean
TRIS	10	14.4630	4.5060	1.4249
TRIS + PS	10	15.6610	4.4677	1.4128
Difference	10	-1.19800	8.02667	2.53826

95% CI for mean difference: (-6.93994, 4.54394)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -0.47 P-Value = 0.648

PRUEBA DE T: MOTILIDAD P. A LA DESCONGELACION

Paired T for TRIS - TRIS + PS

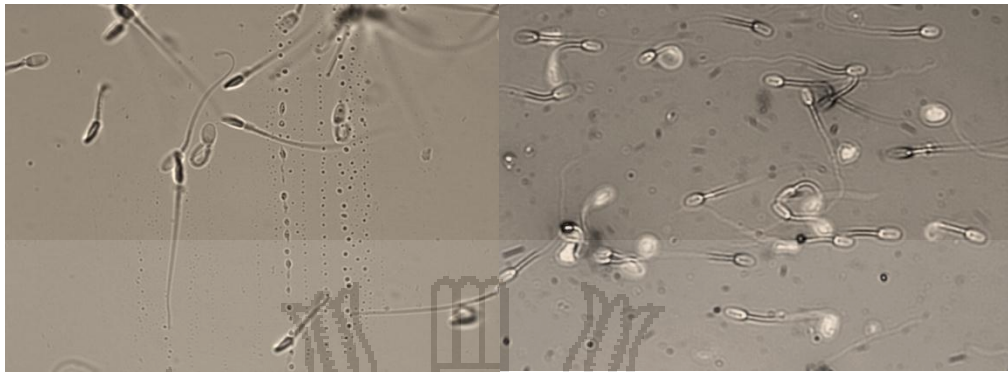
	N	Mean	StDev	SE Mean
TRIS	10	9.9770	1.2634	0.3995
TRIS + PS	10	11.2290	1.9190	0.6069
Difference	10	-1.25200	2.79642	0.88431

95% CI for mean difference: (-3.25244, 0.74844)

T-Test of mean difference = 0 (vs not = 0): T-Value = -1.42 P-Value = 0.190

IMÁGENES

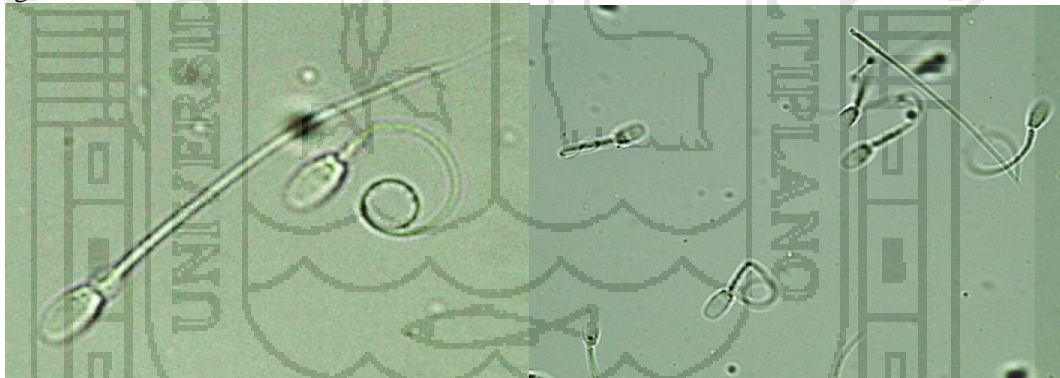
Motilidad.



Vitalidad.



Integridad de membrana.



Integridad de acrosoma.

