



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



**EFECTO DEL TIPO DE DILUTOR SOBRE LA CALIDAD DEL
ESPERMATOZOIDE DE LLAMA (*Lama glama*) PROCEDENTES
DEL CONDUCTO DEFERENTE A LA PRE-CONGELACIÓN Y
POST-DESCONGELACIÓN**

TESIS

PRESENTADA POR:

CARLOS WASHINGTON BUSTAMANTE QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2022



DEDICATORIA

A mis queridos padres Lino Bustamante y Margarita Quispe, con aprecio y mucho agradecimiento por darme la Vida, Amor, educación, comprensión, valores y ejemplos de superación que me motivaron ayudaron a lograr este anhelo.

Carlos Washington Bustamante Quispe



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a Dios por guiarme y encaminarme en el camino correcto en mi vida como estudiante, por brindarme salud y vida, sobre todo agradecerle por permitirme culminar con éxito.

A la Universidad Nacional del Altiplano-puno y a mi querida Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por acogerme en sus aulas y brindarme la formación profesional con la cual seguiré adelante en mi vida profesional.

Al Dr. Guido Pérez por haberme apoyado desinteresadamente en el presente trabajo. Al Dr. Harold Pérez por la orientación profesional y el tiempo dedicado a lo largo del mismo.

A mis queridos padres, a mi Hermana y Xiomara Alemán por el apoyo emocional y su esfuerzo, para que logre concluir esta etapa de mi vida.

A mi gran amigo y compañero Italo Coronel.

Carlos Washington Bustamante Quispe.



ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 13

ABSTRACT..... 14

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN..... 17

1.1.1. Objetivo general 17

1.1.2. Objetivos específicos 17

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN..... 19

2.2. PRINCIPIOS DE CRIOCONSERVACIÓN 19

2.3. AGENTES CRIOPROTECTORES (ACPS)..... 21

2.3.1. Agentes crioprotectores permeables..... 22

2.3.2. Agentes crioprotectores no permeables..... 22

2.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS DILUTORES..... 23

2.4.1. Yema de huevo..... 24

2.4.2. Extracto de soya (lecitina de soya)..... 25

2.5. PRINCIPALES DILUTORES USADOS PARA CRIOPRESERVÓ 25



2.5.1. Dilutor Tris-yema de huevo	25
2.5.2. AndroMed	25
2.5.3. Bioxcell	26
2.6. BIOTECNOLOGÍAS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS (CSA).....	26
2.7. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS (CSA)	27
2.7.1. Vagina artificial.....	27
2.7.2. Electroeyaculación	28
2.7.3. Aspiración vaginal postcoital.....	28
2.7.4. Fístula uretral	29
2.7.5. Desviación de los Conductos Deferentes	29
2.8. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE LOS CAMELIDOS (CSA).....	29
2.8.1. Concentración espermática	29
2.8.2. Motilidad.....	30
2.8.3. Vitalidad espermática.....	30
2.8.4. Test Hipoosmótico.....	31
2.8.5. Integridad de acrosoma.....	31

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	33
3.2. TIPO DE ESTUDIO	34
3.3. LUGAR DE ESTUDIO.....	34
3.4. LOS ANIMALES	34
3.5. MATERIAL BIOLÓGICO.....	35
3.6. METODOLOGIA	35



3.6.1. Desviación del conducto deferente	35
3.6.2. Preparación de los dilutores	35
3.7. COLECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DEL CONDUCTO DEFERENTE	39
3.8. ENFRIAMIENTO, FASE DE EQUILIBRIO Y ADICIÓN DEL CRIOPROTECTOR.....	40
3.9. CRIOPRESERVACIÓN	41
3.10. DESCONGELACIÓN.	41
3.11. LA EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS- MICROSCÓPICAS.....	42
3.11.1. Concentración espermática:	42
3.11.2. Motilidad espermática total:.....	42
3.11.3. Integridad de la membrana plasmática (Test Hipoosmótico):	43
3.11.4. Vitalidad Espermática:	44
3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
CAPITULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA A LA PRECONGELACIÓN (COLECCIÓN A 37 °C).....	47
4.2. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA A LA PRECONGELACIÓN (FASE DE EQUILIBRIO A 5 °C).....	50
4.3. EVALUACIÓN DE LOS DIFERENTES PATRONES DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA A LA POST-DESCONGELACIÓN.	53
4.4. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA A LA POST-DESCONGELACIÓN.....	56
V. CONCLUSIONES	64



VI. RECOMENDACIONES	65
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	66
ANEXOS.....	78

ÁREA : Reproducción animal.

TEMA: Efecto del tipo de dilutor sobre la calidad de espermatozoide en llamas.

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 05 de agosto del 2022



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diseño de la investigación (fuente: propia).....	33
Figura 2.	Pesaje de los ingredientes para la preparación del dilutor tris-yh	95
Figura 3.	Obtención de la yema de huevo.....	95
Figura 4.	Homogenización de dilutor madre tris con yema de huevo	95
Figura 5.	Centrifugado de dilutor madre tris y yema de huevo	96
Figura 6.	Filtrado del sobre nadante del dilutor madre tris más yema de huevo.	96
Figura 7.	Baño de maría a 37°C, acondicionado en un termo donde se colocaron tubos de ensayo con dilutor y jeringas de colección.	96
Figura 8.	Preparación del dilutor andromed.....	97
Figura 9.	Derribo de la llama	97
Figura 10.	Colección de las gotas de espermatozoides con una jeringa de hipodérmica adosada a un tips.....	97
Figura 11.	Enfriamiento y fase de equilibrio a 4.5°C durante 30 minutos.....	98
Figura 12.	Evaluación de la motilidad	98
Figura 13.	Evaluación de la concentración espermática	98
Figura 14.	Evaluación de la funcionabilidad de la membrana mediante el test hipoosmótico.	99
Figura 15.	Evaluación de vitalidad.	99



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Efecto de los dilutores sobre las características espermáticas a la colección a 37 °c (promedio \pm ds).	47
Tabla 2.	Efecto de los dilutores sobre las características espermáticas en fase de equilibrio a 5 °c (promedio \pm ds).	50
Tabla 3.	Efecto de los dilutores sobre los diferentes patrones de motilidad espermática crio-conservados con tres diferentes dilutores (promedio \pm ds).	53
Tabla 4.	Efecto de los dilutores comerciales sobre las características espermáticas post-descongelación (promedio \pm ds).	56
Tabla 5.	Composición de la fracción “a” del dilutor tris-yh.	79
Tabla 6.	Composición de la fracción “b” del dilutor tris-yh.	79
Tabla 7.	Composición de la solución hipoosmótica.	79
Tabla 8.	Composición de la tinción eosina-nigrosina.	80
Tabla 9.	Parámetros espermáticos a la colección 37°c con el dilutor tris-yh.	80
Tabla 10.	Parámetros espermáticos a la colección 37°c con el dilutor andromed.	80
Tabla 11.	Parámetros espermáticos a la colección 37°c con el dilutor bioxcell.	80
Tabla 12.	Parámetros espermáticos en fase de equilibrio 5°c con el dilutor tris-yh. ...	81
Tabla 13.	Parámetros espermáticos en fase de equilibrio 5°c con el dilutor andromed.	81
Tabla 14.	Parámetros espermáticos en fase de equilibrio 5°c con el dilutor bioxcell. .	81
Tabla 15.	Parámetros espermáticos a la post-descongelación 38°c con el dilutor tris-yh.	82
Tabla 16.	Parámetros espermáticos a la post-descongelación 38°c con el dilutor andromed.	83



Tabla 17. Parámetros espermáticos a la post-descongelación 38°C con el dilutor bioxcell.....	84
Tabla 18. Patrones de motilidad espermática post-descongelación 38°C con el dilutor tris-yh.....	85
Tabla 19. Patrones de motilidad espermática post-descongelación 38°C con el dilutor andromed.....	86
Tabla 20. Patrones de motilidad espermática post-descongelación 38°C con el dilutor bioxcell.....	87
Tabla 21. Valores transformados a arcoseno de raíz de los parámetros espermáticos a la colección 37°C	88
Tabla 22. Valores transformados a arcoseno de raíz de los parámetros espermáticos en fase de equilibrio 5°C.....	89
Tabla 23. Análisis de la varianza para motilidad total a la colección 37°C.....	89
Tabla 24. Análisis de la varianza (sc tipo iii) para motilidad total a la colección 37°C.....	89
Tabla 25. Test: tukey, para motilidad total a la colección 37°C.....	90
Tabla 26. Análisis de varianza para el test hipoosmótico a la colección 37°C.....	90
Tabla 27. Análisis de la varianza (sc tipo iii) para el test hipoosmótico a la colección 37°C.....	90
Tabla 28. Test: tukey, para el test hipoosmótico a la colección 37°C.....	90
Tabla 29. Análisis de la varianza para vitalidad a la colección 37°C.....	90
Tabla 30. Análisis de la varianza (sc tipo iii) para vitalidad a la colección 37°C.....	90
Tabla 31. Test: tukey, para vitalidad a la colección 37°C.....	91
Tabla 32. Análisis de la varianza para motilidad total en fase de equilibrio 5°C.....	91



Tabla 33.	Análisis de la varianza (sc tipo iii) para motilidad total en fase de equilibrio 5°C.....	91
Tabla 34.	Test: tukey, para motilidad total en fase de equilibrio 5°C.....	91
Tabla 35.	Análisis de la varianza para test hipoosmótico en fase de equilibrio 5°C	91
Tabla 36.	Análisis de la varianza (sc tipo iii) para test hipoosmótico en fase de equilibrio 5°C.....	92
Tabla 37.	Test: tukey, para test hipoosmótico en fase de equilibrio 5°C.....	92
Tabla 38.	Análisis de la varianza para vitalidad en fase de equilibrio 5°C.....	92
Tabla 39.	Análisis de la varianza (sc tipo iii) para vitalidad en fase de equilibrio 5°C.	92
Tabla 40.	Test:tukey, para vitalidad en fase de equilibrio 5°C.	92
Tabla 41.	Análisis de la varianza para motilidad total post-descongelación.	92
Tabla 42.	Análisis de la varianza (sc tipo iii) para motilidad total post-descongelación.	93
Tabla 43.	Test: tukey, para motilidad total post-descongelación.....	93
Tabla 44.	Análisis de la varianza para el test hipoosmótico post-descongelación.	93
Tabla 45.	Análisis de la varianza (sc tipo iii) para el test hipoosmótico post-descongelación.....	93
Tabla 46.	Test:tukey, para el test hipoosmótico post-descongelación.....	93
Tabla 47.	Análisis de la varianza (sc tipo iii) para vitalidad post-descongelación.	94
Tabla 48.	Análisis de la varianza (sc tipo iii) para vitalidad post-descongelación.	94
Tabla 49.	Test: tukey, para vitalidad post-descongelación.....	94
Tabla 50.	Manova de un factor para patrones de motilidad.....	94
Tabla 51.	Manova de un factor para patrones de motilidad prueba de hotelling con nivel corregido por bonferroni	94



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

CSA	: Camélidos Sudamericanos
PS	: Plasma seminal
PVOH	: Alcohol polivinílico
MP	: Movilidad progresiva
MO	: Movilidad oscilatoria
MC	: Motilidad circulante
MT	: Movilidad total
°C	: Grados Celsius
ACPs	: Agentes crio- protectores
IA	: Inseminación artificial
G	: Gramo
HOST	: Hypo Osmotic Swelling Test
LDL	: Lipoproteínas de baja densidad
Mg	: Miligramo
mL	: Mililitro
mOsm	: Miliosmoles
N ₂ (l)	: Nitrógeno líquido
ROS	: Especies reactivas de oxígeno
TRIS	: Tris(hidroximetil)aminometano
YH	: Yema de huevo
uL	: Microlitros
GL	: Glicerol



RESUMEN

El estudio se desarrolló en el laboratorio de reproducción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA-Puno, durante los meses de enero-marzo 2021. El objetivo fue evaluar las características microscópicas de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de llama sometidos a la pre-congelación y congelación/descongelación con tres dilutores (TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell). Se obtuvieron muestras de espermatozoides de 6 llamas a los que se realizó la desviación del conducto deferente, las muestras fueron diluidas con los diferentes dilutores, posteriormente fueron enfriadas a 5 °C y equilibradas durante 30 minutos las cuales se procesaron en pajillas de 0.25 ml con concentraciones de 45×10^6 y se congelaron con una tasa de -20 °C/min hasta los -120 °C, se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido hasta su evaluación a la post-descongelación. Las características espermáticas fueron evaluadas en dos fases pre-congelación (colección 37 °C y equilibrio 5 °C) y post-descongelación, determinándose: Motilidad total, test Hipoosmótico y Vitalidad. Se realizó un análisis de varianza y una prueba de Tukey. Los resultados encontrados a la post-descongelación para la motilidad total fueron de $26.1 \pm 5.49\%$, $32.6 \pm 3.66\%$ y $10.1 \pm 1.83\%$ para los dilutores TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell respectivamente; los porcentajes de integridad de la membrana plasmática mediante el test Hipoosmótico fueron de $23.2 \pm 13.2\%$, $31.9 \pm 9.28\%$ y $17.5 \pm 5.29\%$ para los dilutores TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell respectivamente y que para la vitalidad espermática fueron de $38.7 \pm 5.12\%$, $29.2 \pm 2.62\%$ y $10.8 \pm 1.5\%$ para los dilutores TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell respectivamente. En conclusión, los mejores parámetros de sobrevivencia fueron encontrados con el dilutor TRIS-YH y AndroMed para espermatozoides procedentes del conducto deferente de llama.

Palabras Clave: conducto deferente, criopreservación, dilutores, espermatozoides, llama.



ABSTRACT

The study was developed in the animal reproduction laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the UNA-Puno, during the months of January-March 2021. The objective was to evaluate the microscopic characteristics of spermatozoa from llama vas deferens subjected to pre-freezing and freezing/thawing with three dilutors (TRIS-EY, AndroMed and Bioxcell). Sperm samples were obtained from 6 llamas that underwent vas deferens detour, the samples were diluted with the different diluents, then cooled to 5 °C and equilibrated for 30 minutes which were processed in 0.25 ml straws with concentrations of 45×10^6 and frozen at a rate of -20 °C/min to -120 °C, stored in liquid nitrogen tanks until post-thaw evaluation. Sperm characteristics were evaluated in two phases pre-freezing (collection 37 °C and equilibrium 5 °C) and post-thawing, determining: Total motility, Hypoosmotic test and Vitality. An analysis of variance and Tukey's test were performed. The results found at post-thawing for total motility were $26.1 \pm 5.49\%$, $32.6 \pm 3.66\%$ and $10.1 \pm 1.83\%$ for TRIS-YH, AndroMed and Bioxcell dilutors respectively; the percentages of plasma membrane integrity by Hypoosmotic test were $23.2 \pm 13.2\%$, $31.9 \pm 9.28\%$ and $17.5 \pm 5.29\%$ for TRIS-EY, AndroMed and Bioxcell dilutors respectively and that for sperm vitality were $38.7 \pm 5.12\%$, $29.2 \pm 2.62\%$ and $10.8 \pm 1.5\%$ for TRIS-EY, AndroMed and Bioxcell dilutors respectively. In conclusion, the best survival parameters were found with the TRIS-EY diluter and AndroMed for spermatozoa from llama vas deferens.

Key words: vas deferens, cryopreservation, dilutors, spermatozoa, llama.



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Las llamas son especies domésticas, denominadas Camélidos Sudamericanos (CSA) están distribuidos geográficamente a lo largo de la región andina de América del Sur (Vallenas & Caribe, 1991). Por encima de los 4000 msnm, para la mayoría de sus criadores, es la principal fuente de proteína en su dieta y la única fuente de sustento económico (Huanca. et al., 2007), porque es una de las principales actividades pecuarias que provee de productos como la fibra, carne y pieles son el sustento económico de muchas familias ubicadas en el ande peruano (Meza, 2016). En el Perú se encuentran cuatro especies de CSA, donde se alberga la mayor población de alpacas y vicuñas. Mientras que la mayor población de llamas se encuentra en Bolivia (Sharpe et al., 2009). El interés en las llamas y alpacas ha aumentado en los últimos años en otros países por las ventajas que tiene a las condiciones ambientales adversas (Fernández, 2005; Raggi, 2005). Los actuales sistemas de producción en CSA, suelen reportar bajos niveles de producción y productividad, ya que gran parte de la población de CSA pasan por una promiscuidad en la crianza y características reproductivas particulares que en algunos casos influyen en su bajo rendimiento reproductivo y ello, insta a mejorar que las tasas reproductivas con la finalidad de elevar la producción y la productividad con el desarrollo de biotecnologías (Brown, 2000; Bustinza, 2001).

Dentro de las biotecnologías empleadas en la reproducción animal, se encuentra la criopreservación de semen, procesos que ocurren durante la exposición de material biológico a temperaturas muy bajas (Hogan et al., 1986). Por consiguiente, el almacenamiento de los espermatozoides necesita métodos que emplean nitrógeno líquido



(N2), para el almacenamiento a largo o corto plazo, lo que exige un mantenimiento rutinario y con amplios requisitos. La conservación de espermatozoides tiene diversos propósitos, como las tecnologías de reproducción artificial y la conservación de especies (Barbas & Mascarenhas, 2009), la finalidad de la criopreservación es mantener la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas (Choez, 2010). Todos los procedimientos de criopreservación de espermatozoides son diferentes según la especie animal, ya que sus particularidades varían con los diluyentes utilizados para la refrigeración y la congelación (Barbas & Mascarenhas, 2009). El proceso de criopreservación de los espermatozoides disminuye la calidad espermática, por el hecho de que expone a un estrés que puede causar daños letales o sub letales, dañando la estructura de los espermatozoides, lo que afectaría directamente a su capacidad de fecundación (Silva et al., 2003). Por tal razón, las combinaciones de la temperatura de almacenamiento, la tasa de enfriamiento, la estructura química del diluyente, la proporción de crioprotectores, la naturaleza del plasma seminal (PS) y el nivel de higiene son los elementos claves porque afectan a la duración de los espermatozoides (Barbas & Mascarenhas, 2009).

La congelación de semen es común en otras especies con resultados bastante aceptables, pero en los CSA no es todavía posible aún de forma óptima. Ya que un no se cuenta con un protocolo efectivo de congelación, al igual que en las demás especies, se deben a las diferencias fisiológicas de las especies y a la bioquímica de los espermatozoides (Holt, 2000a). La criopreservación de semen en CSA con fines de inseminación artificial es difícil, debido a la escasa sobrevivencia de los espermatozoides después del proceso de criopreservación. Factores como la forma del apareamiento, imposibilitan tener un método confiable de colección de semen, la duración de cópula y finalmente, las particularidades propias del semen (bajo volumen, baja concentración de



espermatozoides y alta viscosidad del plasma seminal), limitan el desarrollo de un método viable de criopreservación de semen para los CSA.

Se dispone poca información sobre el uso de dilutores y crioprotectores de semen en los camélidos. La mayoría de los dilutores, así como las técnicas de refrigeración y congelación utilizadas, se han tratado de adaptar de otras especies como vacunos y ovinos (Adams et al., 2009). Igualmente, los bajos porcentajes de preñez, obtenidos mediante la inseminación artificial con semen congelado (Aller et al., 2003; Bravo et al., 2000; Vaughan, 2003). Por estas razones es necesario realizar mayores investigaciones sobre el comportamiento de los dilutores que ayuden a conservar el semen de estas especies.

1.1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1. Objetivo general

- Evaluar las características microscópicas de los espermatozoides procedente de los conductos deferentes sometidos a la pre-congelación y congelación/descongelación con tres dilutores (TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell)

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar la calidad espermática procedente del conducto deferente de llama a la colección con tres dilutores (TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell).
- Determinar la calidad espermática procedente del conducto deferente de llamas en la fase de equilibrio con tres dilutores (TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell).



- Determinar la calidad espermática procedente del conducto deferente de llamas a la post- descongelación con tres dilutores (TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell).



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN

El proceso de crioconservación es una técnica que se aplica en la reproducción animal. La criopreservación (congelación a temperaturas extremadamente bajas) de tejidos y células es una técnica que se ha utilizado desde 1700. Este proceso expone a las células con su viabilidad y procesos metabólicos en suspensión indefinidamente. Las células crio-preservadas se almacenan a temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido, Spallanzani (1776) hizo el primer reporte de espermatozoides humanos con motilidad después de ser expuestos a bajas temperaturas. A mediados de 1900, la criobiología mejoró con el descubrimiento de los efectos de sustancias crio-protectoras las que se agregan a las soluciones celulares, siendo Polge et al., (1949) quien descubre el glicerol (GL) como un importante agente crioprotector para espermatozoides de pavo y luego en espermatozoides de humano. Sherman & Bunge, (1953) reporta el congelamiento exitoso de espermatozoides humanos en hielo seco, los cuales posteriormente fueron descongelados y usados en la fertilización *in-vitro* dando origen a la primera fertilización *in-vitro* con uso de espermatozoides congelados. Con el paso de los años, desde 1970, comenzó el crecimiento y desarrollo de las técnicas de criopreservación no solo de semen, sino también de ovocitos y embriones.

2.2. PRINCIPIOS DE CRIOCONSERVACIÓN

El espermatozoide durante todo el proceso de crioconservación es sometido a diferentes tipos de estrés debido a las alteraciones de la temperatura y la formación de cristales de hielo y la disolución de los mismos (Watson, 1995). El mayor estrés térmico



que experimentan los espermatozoides es cuando tienen que mantener su viabilidad en un rango de temperatura entre los -15 a -60 °C que corresponde a dos procesos muy importantes que son la congelación y durante la descongelación. A temperaturas de -196 °C no se producen ningún tipo de reacciones térmicas, ya que debajo de los -130 °C no existe ninguna molécula de agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

Cuando las muestras de espermatozoides se enfrían a temperaturas debajo de los 0 °C, ocurre la formación de cristales de hielo en el medio extracelular, pero los espermatozoides se encuentran suspendidos en la fracción líquida del medio que lo rodea, porque la membrana plasmática de los espermatozoides actúa como barrera, impidiendo que los cristales de hielo ingresen del medio extracelular hacia el medio intracelular del espermatozoide (Watson, 1979). Por otra parte, las sales que se encuentran en el medio no forman parte de los cristales de hielo, por lo que existirá una mayor concentración de sales en la fracción líquida del medio no congelada provocando que el aumento de la osmolaridad produzca difusión del agua intracelular del espermatozoide hacia el medio extracelular que lo rodea, iniciando así el proceso de la deshidratación de la célula y de la membrana plasmática del espermatozoide (Amann & Pickett, 1987). Siendo la deshidratación osmótica el principal proceso de las alteraciones ultraestructurales de la membrana plasmática (Graham & Parks, 1992).

Durante el proceso de criopreservación, los espermatozoides recuperan el equilibrio dependiendo de la velocidad de refrigeración y la permeabilidad al agua, si la velocidad de enfriamiento es lento o si la permeabilidad al agua es rápida, las células se equilibran por difusión del agua intracelular hacia el espacio extracelular donde ya se están formando los cristales de hielo; pero si el ritmo de enfriamiento es rápido si su permeabilidad al agua es baja, estas se van a equilibrar, por congelación intracelular



(Mazur, 1970). La presencia de los cristales de hielo en el medio extracelular, no produce ruptura ni daños irreversibles de la membrana plasmática sin embargo, la formación de cristales de hielo intracelular de los espermatozoides provoca daños irreversibles y muerte de los espermatozoides (Watson, 1979). La descongelación está influenciada por el proceso de criopreservación, si la velocidad de enfriamiento es rápida, la velocidad de descongelación también lo debe serlo; pero si la velocidad de enfriamiento es lenta también debe ser la descongelación es por eso que si las células que contienen microcristales de hielo intracelulares deben ser descongeladas muy rápidamente a fin de evitar la recristalización de estos pequeños cristales, ya que los grandes cristales pueden dañar las células de forma irreversible (Amann & Pickett, 1987).

La crioconservación hoy en día es un proceso rutinario para la conservación de gametos de diferentes especies y embriones de animales y humanos. Es por eso que en la actualidad se emplean muchos protocolos en los cuales se trabajan con concentraciones de crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides de diferentes especies, los cuales son clasificados en dos grandes grupos:

2.3. AGENTES CRIOPROTECTORES (ACPS)

El proceso de crioconservación debe mantener, la mayor proporción de integridad de las diferentes estructuras y la sobrevivencia de los espermatozoides. El empleo de agentes crioprotectores es indispensable para que minimicen los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Gao et al., 1995); pues los crioprotectores tienen efectos sobre los fenómenos que suceden en todo el proceso de la congelación y la descongelación de las células vivas, proporcionando protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras celulares y extracelulares y en la composición química del espermatozoide (Fahy et al., 1990). Los agentes



crioprotectores se clasifican según su capacidad para ingresar o no a través la membrana plasmática del espermatozoide:

2.3.1. Agentes crioprotectores permeables

Los agentes crio-protectores permeables tienen bajo peso molecular y por ello pueden ingresar a la célula a través de la membrana plasmática, al ingresar a la célula, evitan los efectos nocivos de la deshidratación excesiva causada por la congelación lenta. Los crio-protectores que ingresan dentro de la célula espermática reemplazan el volumen de agua que sale al medio extracelular. Consecuentemente, los crio-protectores también mantienen el volumen celular, evitando el colapso de los espermatozoides por una deshidratación excesiva (Medeiros et al., 2002). Los más utilizados son glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido y propanediol (Boiso, 2001). Los agentes crioprotectores penetrantes, dependiendo de su concentración, pueden ser tóxicos para los espermatozoides, induciendo alteraciones en la membrana plasmática y disminuyendo la vitalidad y motilidad espermática (Medeiros et al., 2002).

2.3.2. Agentes crioprotectores no permeables

Los agentes crioprotectores no permeables son sustancias de alto peso molecular que ejercen su acción crioprotectora por inducción osmótica debido a la rápida deshidratación celular, provocando una disminución del contenido hídrico intracelular, evitando la formación de cristales de hielo en la célula criopreservada (Medeiros et al., 2002). También aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas, por lo tanto reducen la formación de cristales de hielo (De Leeuw et al., 1991). Además, se ha encontrado que los azúcares interactúan con la membrana plasmática al formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los azúcares con los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana, Al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen



el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw et al., 1991). Estos agentes suelen usarse en asociación con los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidona, dextrano, polietilenglicol.

2.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS DILUTORES

Los espermatozoides no sobreviven por largos periodos de tiempo en el semen fresco natural, aunque se conserve en temperaturas bajas. Por esta razón, se adiciona dilutores para mejorar o mantener el medio que rodea a los espermatozoides, brindando un medio de energía, protección contra productos del metabolismo y a los cambios de temperatura. Un dilutor deseable debe proporcionar:

- Energía y nutrientes a los espermatozoides almacenados
- Brindar una acción amortiguadora para compensar los cambios de pH causados por la formación de ácido láctico
- Proporcionar protección contra los cambios de temperatura y el choque térmico
- Mantener una presión osmótica y un equilibrio de los electrolitos óptimos para el medio
- Inhibir el crecimiento de microorganismos
- Aumentar el volumen del eyaculado (Concannon, 1989; Herman et al., 1994; Vishwanath & Shannon, 2000).

La interacción entre el dilutor y los espermatozoides representa un factor crucial para la conservación de la integridad y la capacidad de los espermatozoides para la fecundación (Manjunath et al., 2002), donde la preparación y composición del dilutor puede interferir en la calidad del semen criopreservado (De-Leeuw et al., 2000; Snoeck et al., 2007).



Los dilutores compuestos por diferentes sustancias protegen a los espermatozoides de forma diferente entre las distintas especies e individuos de la misma especie (Holt, 2000b). Uno de los aditivos más estudiados y evaluados en los dilutores son los crioprotectores. El glicerol, LDL de la yema de huevo y la leche se utilizan habitualmente para la criopreservación del semen (Muiño et al., 2007).

2.4.1. Yema de huevo

Las LDL de la yema de huevo son uno de los principales crioprotectores no permeables y se utiliza ampliamente en asociación o no con otros componentes (Amirat et al., 2004). Su principal beneficio es el de proporcionar LDL fracción que evita la pérdida de fosfolípidos de la membrana, aumentando así la tolerancia al choque térmico y al proceso de criopreservación. El glicerol y la yema de huevo actúan de forma sinérgica, protegiendo la membrana celular, (Amirat et al., 2004; Bergeron et al., 2004; Holt, 2000a; Moussa et al., 2002; Thun et al., 2002). Los dilutores utilizados para la criopreservación de espermatozoides suelen contener alrededor de un 20% de yema de huevo, (Amirat et al., 2004; Hinsch et al., 1997; Snoeck et al., 2007)

A pesar de sus efectos beneficiosos, la yema de huevo presenta algunos inconvenientes como la posibilidad de contaminación, producción de endotoxinas capaces de dañar la capacidad de fecundación del espermatozoide (Aires et al., 2003; De-Leeuw et al., 2000; Pagl et al., 2006; Thun et al., 2002), Contiene sustancias que pueden inhibir la actividad mitocondrial de los espermatozoides disminuyendo su motilidad (Pace & Graham, 1974) y hormonas esteroides que pueden disminuir la capacidad de fecundación de los espermatozoides (Muiño et al., 2007). También puede interferir en el análisis microscópico del semen debido a la presencia de glóbulos de grasa (Vishwanath & Shannon, 2000).



2.4.2. Extracto de soya (lecitina de soya)

La lecitina de soya es una alternativa a los componentes de origen animal de los dilutores. La lecitina de soya contiene una mezcla natural de fosfatidilcolina y varios ácidos grasos como el ácido esteárico, oleico y palmítico. Las ventajas de los dilutores de semen a base de lecitina de soya sobre la yema de huevo en cuanto a cuestiones sanitarias son incuestionables, pero la eficacia de los dilutores de semen sigue siendo objeto de debate. Donde se ha comprobado la viabilidad de su uso para la congelación de espermatozoides (Aires, 2003; Hinsch et al., 1997). Sin embargo, otros investigadores no han encontrado resultados positivos con respecto a la crioprotección de los espermatozoides con el uso de dilutores libres de proteínas animales (De-Leeuw et al., 2000; Fukui et al., 2008; Herold et al., 2006).

2.5. PRINCIPALES DILUTORES USADOS PARA CRIOPRESERVÓ

2.5.1. Dilutor Tris-yema de huevo

El dilutor seminal Tris, debe su nombre al compuesto Trimetilol amino metano o "TRIS" hidroximetil amino metano de fórmula $C_4H_{11}NO_3$ y peso molecular de 121.4; dividido en dos fracciones A y B. La fracción A (sin glicerol) y la fracción B que contiene glicerol como crioprotector permeable. Posee sustancia de naturaleza orgánica, aspecto cristalino y cuya principal característica consiste en la capacidad de formar en soluciones acuosas sistemas buffer o reguladoras de la concentración de iones hidrógeno. En la criopreservación de semen, neutraliza los residuos del metabolismo espermático, principalmente del ácido láctico (Suarez, 2015).

2.5.2. AndroMed



AndroMed es un dilutor libre de yema de huevo para eyaculados bovinos. Es apropiado para la criopreservación del semen y para la conservación de semen fresco. Para la preparación del diluyente se adicionan 800 mL de agua destilada estéril al contenido de un frasco de AndroMed (200 mL) en proporción (1 parte de concentrado más 4 partes de agua bidestilada).

AndroMed contiene 1% de lecitina de soya (Salamon & Maxwell, 2000), fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).

2.5.3. Bioxcell

Es una fórmula innovadora, libre de proteínas de origen animal que elimina los riesgos sanitarios y metabólicos derivados del uso de leche y/o yema de huevo para la dilución final del semen bovino. Que contiene 1% de lecitina de soya (Muiño et al., 2008), azúcares, sales, glicerol, antioxidantes, fosfolípidos, lincomicina, espectinomicina, gentamicina y tilosina (Vaughan, 2003).

Puede usarse para el almacenamiento del semen en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El semen diluido en Bioxcell puede procesarse a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Es un líquido estéril concentrado de color ocre que se presenta en frascos de 100 mL y puede ser congelado a -20°C tras su dilución.

2.6. BIOTECNOLOGÍAS EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS (CSA)

Durante los últimos años se han producido nuevos avances en el uso de las biotecnologías reproductivas en los CSA (Sumar, 2013). En lo que respecta a las biotecnologías reproductivas de machos en los CSA, la inseminación artificial (IA) se



reduce al uso de semen fresco, con un porcentaje de gestación máximo del 77% en establecimientos experimentales y no más del 50% en ganaderos privados (Huanca et al., 2007). Usando semen congelado de llama y alpaca e inseminando a un tiempo fijo (24 horas luego de la inducción de la ovulación), se obtuvieron hasta ahora tasas de preñez del 26% (Bravo et al., 2000; Vaughan, 2003).

2.7. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN EN CAMÉLIDOS

SUDAMERICANOS (CSA)

La colección de semen en camélidos es uno de los principales elementos limitantes para el desarrollo de las biotecnologías reproductivas tales como la IA en alpacas y en llamas, así como para la evaluación de la capacidad reproductiva de los machos (Novoa & Leyva, 1996). Las particulares características reproductivas, anatómicas y fisiológicas de los CSA como el prolongado tiempo de cópula, el carácter nervioso, la posición de cópula, el lugar de deposición del semen, la eyaculación intracornual y la alta viscosidad del semen, determinan una gran dificultad para la recogida de semen, siendo aún inexistente un protocolo recomendado y una técnica óptima (Pacheco, 2015; San-martin et al., 1967).

2.7.1. Vagina artificial

Esta técnica de colección de semen fue desarrollada utilizando un maniquí con la apariencia de una hembra en posición de cópula, basándose en el hecho de que los machos camélidos montan a toda hembra que tenga la postura de decúbito esternal, que simula una cópula normal (Sumar & Leyva, 1981). realizaron más trabajos con la finalidad de mejorar dicha técnica (Bravo et al., 1997); mientras que Ferré & Werkmeister (1996) desarrollo de una vagina artificial termoeléctrica para la colecta de semen en camélidos.



2.7.2. Electroeyaculación

Se indica que primeramente se tiene que tranquilizar al animal con una mezcla de sedante y anestésico general; la colección se realiza con el animal acostado; la sonda del electro-eyaculador es introducida vía rectal sobre la próstata, cuya profundidad se evaluaba por medio de un ecógrafo (Giuliano et al., 2008, 2002). La estimulación se efectúa mediante unos estímulos eléctricos de 0,2 V(voltios) inducidos a intervalos de 1 segundo durante 3 segundos; el voltaje se incrementa paulatinamente de 2 a 10 V a lo largo de 6 a 12 minutos (Hanzen et al., 2014).

Por desgracia, el semen puede estar demasiado diluido por las secreciones de las glándulas accesorias y se contamina con la orina (Giuliano et al., 2012).

2.7.3. Aspiración vaginal postcoital

Es una técnica en la cual se pueden conseguir muestras de semen por aspiración del fondo de la vagina posterior a la cópula, ya que se eyacula una pequeña porción de semen al momento de pasar el pene de un cuerno al otro, este es un método no invasivo ni muy tedioso, pero la gran desventaja es que este semen se halla incompleto, contaminado y diluido por las secreciones del tracto genital femenino, este semen puede ser empleado para realizar la evaluación de los espermatozoides como la motilidad, vitalidad, morfología; Estas muestras se obtienen a menudo con residuos sanguinolentos y presentan un color rosado, ya que el endometrio está inflamado y lacerado debido a la cópula; la técnica es introducir un espéculo a lo largo de la vulva debidamente limpiada y con la asistencia de una fuente de luz se localiza el cérvix e inmediatamente se aspira con una pipeta acoplada a una jeringa, el empleo de este tipo de semen para evaluar la fertilidad del macho es muy dudoso (Bravo, 2002).



2.7.4. Fístula uretral

Se trata del método que necesita realizar una fístula quirúrgica en la uretra del pene que se encuentra entre el ano y el escroto; el semen se recoge en la cópula natural, esta es una técnica que se desarrolla con anestesia epidural y anestesia local para introducir una cánula de plástico en la uretra que va desde el pene hasta la vejiga, que sirve para guiar la cirugía y ayuda a reconocer la uretra; se efectúa la incisión en la piel, se aísla el músculo bulbocavernoso y se divide la uretra del cuerpo cavernoso; esta técnica no impide la cópula y las reacciones postoperatorias no afectan al animal (Kubicek, 1974).

2.7.5. Desviación de los Conductos Deferentes

Para colectar los espermatozoides sin las secreciones de las glándulas accesorias en las alpacas, se han desarrollado las técnicas de desvío de los conductos deferentes, La técnica intenta recoger los espermatozoides a partir de su reservorio, la cola del epidídimo, sin que estén en contacto con las secreciones de las glándulas accesorias, desviando quirúrgicamente los conductos deferentes en la región ventral del animal o en la cara interna del muslo, conformando una fístula permanente en la piel de donde pueden ser recogidos de manera continua sin que se necesite tener una hembra receptiva o someter a los espermatozoides a la acción de enzimas proteolíticas que tratan de licuar el coágulo del eyaculado para un mejor aprovechamiento y manejo de los espermatozoides (Pérez et al., 2016; Quintano, 2002).

2.8. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE LOS CAMELIDOS (CSA)

2.8.1. Concentración espermática

La concentración espermática viene a ser el número de espermatozoides por unidad de volumen de semen (Salisbury, 1982).



En Alpacas, con desviación de los conductos deferentes, logro obtener diferentes concentraciones, con un promedio de 515.0×10^4 esp/mm³ (Paricahua, 2001), con 23.87×10^4 esp/mm³ (Quintano, 2002) y 25.53×10^4 esp/mm³ (Deza, 2004).

2.8.2. Motilidad.

Los espermatozoides, son células con un solo objetivo de penetrar al óvulo, la capacidad de movilidad progresiva se desarrolla a medida que el espermatozoide madura, los espermatozoides tienen un aparato de propulsión llamado flagelo, compuesto por proteínas contráctiles que se halla en órganos longitudinales y fibras burdas que proporcionan la fuerza propulsiva necesaria para vencer la resistencia estructural interna y externa, dada por la viscosidad de los líquidos, el flagelo propaga ondas sinusoides repetitivas en ciclos alternos de contracción-relajación (Hafez, 1989).

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

2.8.3. Vitalidad espermática.

Las tinciones permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos, así la cabeza de los espermatozoides muertos tiene la propiedad de dejar pasar los colorantes por perturbación de la membrana cefálica (Lubos, 1983 citado por Arizabal, 2018). En algunas investigaciones con espermatozoides de alpacas procedentes de los conductos deferentes hallaron para la vitalidad un 58.99% (Paricahua, 2001) y de 41.75 al 86.25% (Quintano, 2002)



2.8.4. Test Hipoosmótico.

Jeyendran et al. (1984) realizó esta técnica para espermatozoides humanos, y que fue empleado 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).

2.8.5. 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 fecúndate del espermatozoide (Garner & Hafez, 2016).

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 & 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 y Yoduro 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 (Arizabal, 2019).

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 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).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

El desarrollo del estudio se realizó siguiendo el diseño experimental, donde se realizaron 8 colecciones por cada dilutor (TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell) para la evaluación de las características espermáticas a la pre-congelación (colección 37 °C y fase de equilibrio 5 °C) y a la post-descongelación.

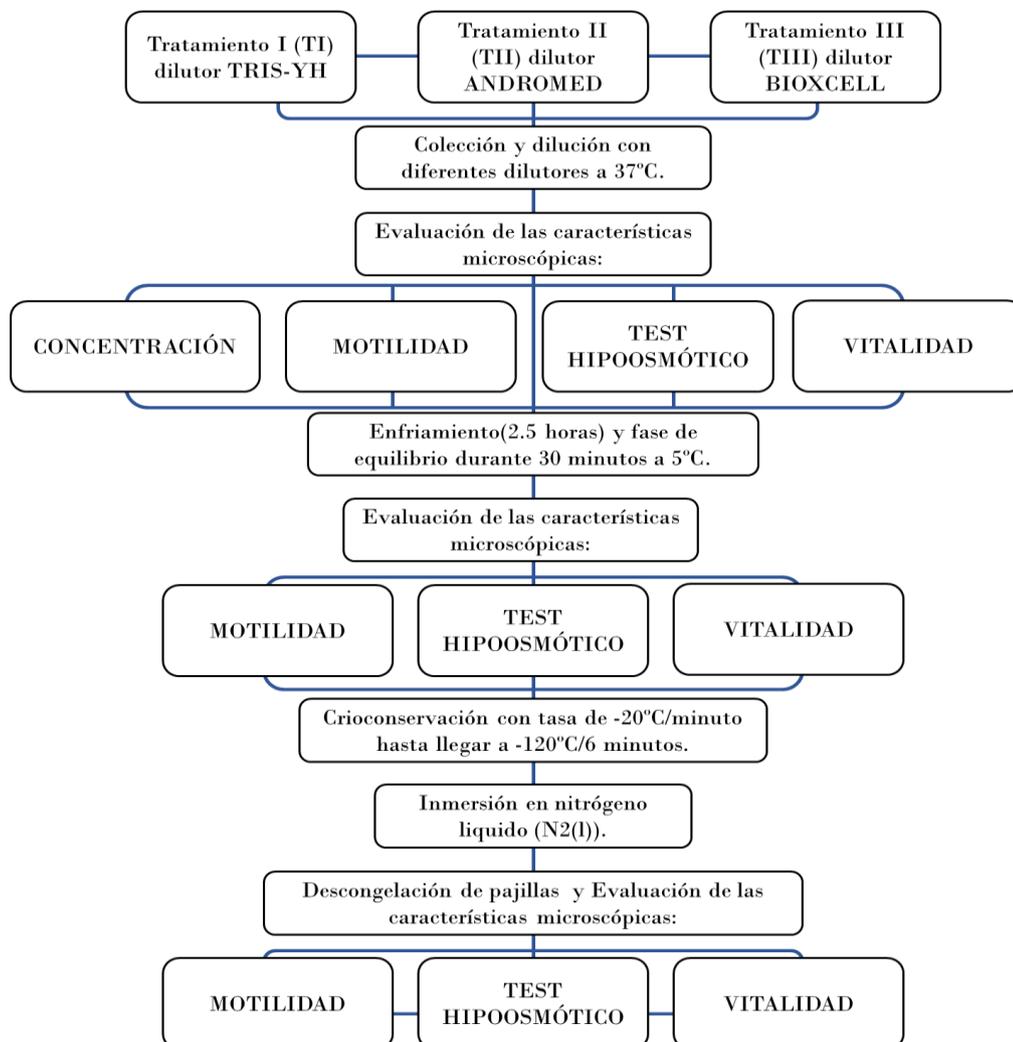


Figura 1. Diseño de la investigación (fuente: propia).



3.2. TIPO DE ESTUDIO

El trabajo fue de tipo experimental, ya que se empleó variables independientes (dilutores) para determinar la relación de causa y efecto de los diferentes dilutores sobre la calidad espermática a la pre-congelación (colección 37 °C y fase de equilibrio 5 °C) y post-descongelación de los espermatozoides de llama procedentes del conducto deferente. Corresponde a un estudio analítico, pues pretende explicar el efecto del tipo de dilutor sobre la calidad a la pre-congelación y post-descongelación de los espermatozoides (Hernández et al., 2018).

3.3. LUGAR DE ESTUDIO

La estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, a 3823 msnm; ubicado en el Distrito de Puno, Provincia de Puno, Departamento de Puno, latitud sur 15° 49' 20" y longitud 70° 01' 07" (SENAMHI, 2022); la fase experimental se realizó durante los meses de enero a marzo del 2021.

3.4. LOS ANIMALES

Se utilizaron seis llamas macho donadores de Espermatozoides de 3 a 4 años de edad. Provenientes del centro poblado de Mazocruz del distrito de Santa Rosa, provincia de El Collao, Departamento de Puno y del Centro de Investigación y Producción La Raya, de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, ubicado en el Distrito de Santa Rosa, Provincia de Melgar, Departamento de Puno. Fueron criados en iguales condiciones de alimentación, el cual fue a base de trébol blanco y césped común, fueron albergadas en el Hospital Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno; cuyos animales fueron sometidos a la desviación de los conductos deferentes.



3.5. MATERIAL BIOLÓGICO

Espermatozoides que fueron colectados procedentes de los conductos deferentes desviados de llamas macho, diluidos en tres diferentes dilutores (TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell) las muestras de espermatozoides fueron combinados en “pools” para descartar el efecto macho sobre el estudio.

3.6. METODOLOGIA

3.6.1. Desviación del conducto deferente

La técnica de desviación del conducto deferente se realizó según lo descrito por Pérez et al., (2014), para el presente trabajo de investigación se realizó la desviación de los conductos deferentes de seis llamas machos, las llamas bajo anestesia y en posición decúbito dorsal, se realizaron dos incisiones cráneo-caudales y para-mediales de aproximadamente 4 cm en el área donde se ubican los cordones espermáticos. Una vez ya aislado el conducto deferente, se secciono en la porción más distal del epidídimo para luego ser redireccionado por debajo de la piel hacia la cara interna del muslo fijando el conducto deferente. El postoperatorio se realizó durante 1 semana, limpiando con una torunda de algodón empapado con suero fisiológico, y para la curación con vaselina más penicilina sobre el conducto deferente expuesto, con la finalidad de favorecer la cicatrización y formación de la fístula.

3.6.2. Preparación de los dilutores

La preparación de los diferentes dilutores se realizó de la siguiente manera: El dilutor madre TRIS se preparó cada semana y se almacenó en refrigeración para su conservación hasta el día de la colección, mientras que para los dilutores AndroMed y Bioxcell se prepararon el día en que se realizó la colección de espermatozoides. Antes de



iniciar con la preparación de los diferentes dilutores, todos los materiales fueron esterilizados en la cámara de flujo laminar con rayos UV durante 30 minutos.

3.6.2.1. Dilutor TRIS-YH.

La preparación se realizó según lo mencionado por Hafez & Hafez, (2007) y Arizabal, (2019) con algunas modificaciones. Para la preparación se empleó el dilutor TRIS (Tris-hidroximetil-aminometano), se realizó el pesado de los insumos como: ácido cítrico, fructosa y TRIS (Tri-hidroximetil-aminometano) (Tabla N.º 1, Anexos). Todo fue vertido a una probeta graduada de 100 ml; y se le añadió agua bidestilada 75 ml, se homogenizó y disolvió los componentes. La probeta graduada fue colocada en agua a 80 °C (ebullición) durante 10 minutos para esterilizar el medio de preparación. Finalmente se enfrió la probeta con el dilutor madre TRIS a temperatura ambiente y se envasó en frascos de 5 ml esterilizados para su posterior refrigeración.

a) Preparación de la fracción “A”

Para cada día de la colección de espermatozoides se preparó el dilutor madre TRIS al 80% y se le añadió YH al 20% (Tabla N.º 1, Anexos).

- **Obtención de la yema de huevo (YH)**

Se desinfectó la cáscara del huevo con alcohol y sobre una superficie se colocó papel toalla y encima de ella se vertió la YH y con una aguja hipodérmica, se rompió la membrana para obtener 1 mL de YH.

Se extrajo 5 ml de la solución madre TRIS en un tubo de ensayo de 15 mL, luego se esterilizó en la cámara de flujo laminar con rayos UV durante 15 minutos y se añadió 20% de yema de huevo para luego homogenizar en un vórtex durante 1 min.



El tubo de ensayo con la fracción “A” se centrifugó a 4000 rpm durante 30 minutos, con la finalidad de que los gránulos de grasa grandes queden en la parte inferior. Y al finalizar se filtró el sobrenadante con papel filtro de 70 μm a un tubo de ensayo de 15 mL y se le añadió antibiótico (4.8 mg de gentamicina), se homogenizó en un vórtex durante 15 segundos y se extrajo 1 mL del dilutor TRIS-YH en un tubo de ensayo de 5 mL. El tubo se colocó en baño maría a 37 °C en un termo para su traslado hasta el lugar de la colección de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes desviados de llamas.

b) Preparación de la fracción “B”

La preparación de la fracción B se realizó según lo recomendado por Carretero et al., (2014), la concentración final de glicerol fue de 5%, para la adición de la fracción “B” se determinó la concentración deseada por cada pajilla.

Se extrajo 0.9 mL del dilutor TRIS-YH (fracción “A”) en un tubo de ensayo de 5 mL, donde se adicionó el 0.1 mL de glicerol, para luego homogenizar en un vórtex durante 30 segundos el tubo de ensayo con la fracción “B” (Tabla N.º 2, Anexos).

3.6.2.2. AndroMed

La preparación del dilutor se realizó según las indicaciones del fabricante y Mendoza, (2015), En una proporción de 1:4.

- Todo el procedimiento se realizó en baño maría a una temperatura de 35 °C, en un tubo de ensayo de 15 mL graduado, se colocó 4 mL de agua bidestilada y en otro tubo de ensayo de 5 ml graduado se extrajo 1 mL del dilutor AndroMed; ambos tubos se mantuvieron en baño maría por un tiempo de 10 minutos. Se agregó el dilutor AndroMed al tubo de ensayo



con agua bidestilada y se homogenizó en un vórtex durante 30 segundos, seguidamente se dejó por 5 minutos en el baño maría.

- En un tubo de ensayo de 5 mL se extrajo 1 mL del dilutor ya preparado y se colocó en baño maría a 37 °C en un termo para su traslado hasta el lugar de la colección de los espermatozoides procedente del conducto deferente de llamas.

3.6.2.3. Bioxcell

La preparación del dilutor se realizó según las indicaciones del fabricante y lo mencionado por Gallardo & Vargas (2015), en una proporción de 1:4

- Toda la preparación se realizó en baño maría a una temperatura de 35 °C, en un tubo de ensayo de 15 mL graduado se colocó 4 mL de agua bidestilada y en otro tubo de ensayo de 5 mL graduado se extrajo 1 mL del dilutor Bioxcell, ambos tubos de ensayo se mantuvieron en baño maría durante 10 minutos. Se agregó el dilutor Bioxcell al tubo de ensayo con agua bidestilada y se homogenizó en el vórtex durante 30 segundos, luego se dejó por 5 minutos en baño maría, y finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- En un tubo de ensayo de 5 mL se extrajo 1 mL del dilutor ya preparado y se colocó en baño maría a 37 °C, en un termo para su traslado al lugar de la colección de los espermatozoides de las llamas con conducto deferente desviado.



3.7. COLECCIÓN DE ESPERMATOZOIDES DEL CONDUCTO DEFERENTE

Se prepararon jeringas de tuberculina adosadas a tips de 10 uL, para la aspiración de espermatozoides en una bandeja se colocaron materiales de limpieza como: torundas de algodón, jeringas de 5 ml con suero fisiológico y vaselina más penicilina.

Se realizó según lo descrito por Pérez. et al., (2014) y Arizabal, (2019). La colección se realizó en un ambiente donde no se permita el ingreso de los rayos solares.

- Se colectó a seis llamas macho con el conducto deferente desviado, las llamas fueron inmovilizados y derribados y se les posicionó en cubito lateral derecho o izquierdo de acuerdo al lugar de la fistula a colectar, luego se realizó la limpieza de las fistulas con algodón humedecido con suero fisiológico, desde la cola del epidídimo hasta la fistula del conducto deferente desviado se realizaron masajes con la yema de los dedos en dirección caudo-craneal; facilitando la salida de los espermatozoides por la fistula.
- Las gotas de espermatozoides que salieron hacia la fístula del conducto deferente desviado, fueron colectadas con un tips de 10 µL adosados a una jeringa de tuberculina que a su vez estuvo empapada con dilutor; Las muestras de las 6 llamas fueron combinadas en un pool y prediluido con 1 ml de dilutor TRIS-YH (fracción “A”), AndroMed y Bioxcell. Las muestras en todo momento estuvieron a una temperatura de 37 °C hasta su traslado al laboratorio, luego de la colección sobre la fístula se añadió vaselina más penicilina como medio de protección de la fístula y se procedió a la liberación de la llama.



3.8. ENFRIAMIENTO, FASE DE EQUILIBRIO Y ADICIÓN DEL CRIOPROTECTOR

Se realizó según Delgado & Quispe (2015), con algunas modificaciones. Para el descenso de la temperatura se usó una caja de Tecnopor con bloques de hielo en cada lado y al medio de estos bloques se colocó un vaso de precipitados de 500 mL con agua procedente del termo de colección el cual enfrió desde 37°C hasta llegar a 5 °C, durante un periodo de 2.5 horas. Al llegar a 5 °C se adicionó la fracción “B” de los diferentes dilutores TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell. Se aproximaron a una concentración promedio de 45 millones de espermatozoides/pajilla; la adición de la fracción “B” se realizó por las paredes del tubo de ensayo lentamente para luego homogenizar el tubo de ensayo con ambas fracciones. Las muestras de espermatozoides se mantuvieron durante 30 minutos en fase de equilibrio entre 4.5 a 5 °C.

Para determinar el número de pajillas con la concentración deseada se tomó en cuenta; la concentración inicial con 1 ml de volumen inicial.

Ecuación 1. Fórmula cantidad de dilutor a utilizarse.

$$Dil. total = \frac{\% \text{ de Motilidad} \times \text{concentración espermática} \times \text{volumen inicial}}{\text{concentración esperada por pajilla}}$$

Posteriormente fueron envasados en pajillas de 0.25 mL con una jeringa de tuberculina adosada a una manguerilla de látex.



3.9. CRIOPRESERVACIÓN

Previo a la criopreservación, se realizó el rótulo de las pajuelas de 0.25 ml con un plumón indeleble indicando la fecha y el tipo de dilutor, todas las pajuelas rotuladas se colocaron dentro de una bolsa de plástico estéril para que se atemperen entre 4.5 a 5 °C.

Los espermatozoides diluidos con los diferentes dilutores se homogenizaron. Se aspiró 0.25 mL, dejando un espacio de aire entre el tope de la pajilla y los espermatozoides diluidos, finalmente se realizó el sellado de las pajillas con alcohol polivinílico (PVOH) y para solidificar se introdujo la pajilla en agua a 5 °C.

La congelación de las pajillas se realizó en un biocongelador de semen utilizando una tasa de descenso de la temperatura de -20 °C/minuto llegando hasta una temperatura de -120 °C/6 minutos, al finalizar las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido (N₂), finalmente las pajillas se almacenaron en un tanque criogénico hasta el momento de la descongelación para el respectivo análisis (Vita, 2008).

3.10. DESCONGELACIÓN.

Se realizó según lo mencionado por Muiño, (2007) con algunas modificaciones, se descongelaron pajillas en baño maría con una temperatura de 38 °C durante 40 segundos.

Para el análisis microscópico se atemperaron láminas porta y cubreobjetos a 38° C y sobre las láminas portaobjetos se colocó muestras de espermatozoides para la evaluación de las características espermáticas.



3.11. LA EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS- MICROSCÓPICAS.

La evaluación de las características espermáticas-microscópicas como la concentración, motilidad, Integridad de la membrana plasmática (test Hipoosmótico) y vitalidad espermática. Se realizaron en dos etapas, las cuales fueron: a la pre-congelación (colección 37 °C y en fase de equilibrio 5 °C) y a la post-descongelación a 38 °C.

3.11.1. Concentración espermática:

La evaluación de la concentración espermática se realizó luego de la colección, con una pipeta De Thoma para el conteo de Glóbulos Rojos, se aspiró espermatozoides diluidos hasta la marca de 0.5 y luego se completó con agua bidestilada hasta llegar a la marca de 101. Las primeras 3 gotas se eliminaron y posterior a eso se colocó una gota del contenido a la cámara de Neubauer, con el menor aumento se ubicó el primer cuadrante se amplió el campo a una magnificación de 40 X, para posteriormente realizar el conteo en 5 cuadrantes al azar.

Ecuación 2. Ecuación de la concentración espermática.

$$C. \text{ESPERMATICA} = N^{\circ} \text{ Espermatozoides contados } \times (10 \times 10^6) \times 10$$

3.11.2. Motilidad espermática total:

Para la evaluación de la motilidad se realizó según lo descrito por Toro, (2009) con ligeras modificaciones.

Los diferentes patrones de motilidad espermática evaluados fueron: Motilidad progresiva (MP) Motilidad oscilatoria (MO) y Motilidad circulante (MC) y la sumatoria



de los diferentes patrones de motilidad determinó la motilidad espermática total (MT) (Fumuso, 2018).

En una lámina portaobjeto temperada a 37 °C se agregó 10 µl de la muestra de espermatozoides y se cubrió con una lámina cubreobjetos (22x22mm) temperada (Cabrera et al., 2012). La evaluación se realizó en un microscopio óptico Leica provisto de una platina térmica, para la visualización de las imágenes el microscopio estuvo conectada por un puerto USB a una laptop provista del programa de captura de imagen LAZ EZ. Que permitió la captura de imágenes y videos.

Esta característica espermática se evaluó en la fase de colección, en fase de equilibrio a 5 °C y a la post-descongelación. Se contabilizó un mínimo de 200 espermatozoides de cada muestra y los datos fueron expresados en porcentajes.

Ecuación 3. Porcentaje de Motilidad total.

$$\%MT = \frac{\text{Número de espermatozoides motiles}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3.11.3. Integridad de la membrana plasmática (Test Hipoosmótico):

Se realizó, según lo mencionado por Apaza, (2017) con algunas modificaciones

- Para lo cual se utilizó una solución Hipoosmotica (Tabla 3. Anexos). Se incubó a 37 °C, 50 µl de muestra de espermatozoides diluidos en 500 µl de la solución Hipoosmótica durante 45 minutos. Para la evaluación se colocó 10 µL de la solución Hipoosmótica que contiene las muestras de espermatozoides en una lámina portaobjetos. Se clasificaron de dos maneras espermatozoide que presentaron la cola enrollada a las que se denominaron vivos o con la membrana plasmática integra, y los que no

presentaron cola enrollada se consideraron como espermatozoides muertos o con la membrana plasmática no integra.

- Esta característica espermática, se evaluó en la fase de colección, en fase de equilibrio a 5 °C y a la post-descongelación. La evaluación se realizó en un microscopio óptico, para lo cual se contaron un mínimo de 200 espermatozoides y se expresaron en porcentajes con la siguiente ecuación.

Ecuación 4. Porcentaje de espermatozoides positivos al test Hipoosmótico.

$$\% \text{ test Hipoosmótico} = \frac{\text{Número de espermatozoides con cola enrollada}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3.11.4. Vitalidad Espermática:

La preparación de la tinción eosina-nigrosina se realizó según lo descrito por (Campbell et al., 1956) (Tabla 4. Anexos). Mientras que la evaluación se efectuó según lo descrito por Ávalos et al, (2018) con algunas modificaciones, Para lo cual se atemperaron laminas portaobjetos sobre un platina térmica a 37 °C.

- Se colocó una gota de 4 µL de la muestra de espermatozoides en un extremo de una lámina portaobjeto temperada a 37 °C y luego se agregó 4 µL de colorante eosina-nigrosina al costado de la muestra, transcurrido 30 segundos ambas gotas se homogenizaron y se realizó el frotis, la evaluación se realizó en un microscopio óptico con una magnificación de 100 X; para lo cual se colocó la lámina portaobjeto con la muestra de espermatozoides extendida sobre la platina del microscopio. Sobre la lámina portaobjeto con la muestra extendida se colocó una lámina cubreobjetos y una gota de aceite de inmersión.



- Esta característica espermática, se evaluó en la fase de colección, en fase de equilibrio a 5 °C y a la post-descongelación. Para la evaluación se contaron un mínimo de 200 espermatozoides, en donde se consideraron espermatozoides vivos aquellos que no se lograron colorearse y espermatozoides muertos aquellos que se colorearon de color rosado, los valores se expresaron en porcentajes mediante la siguiente ecuación.

Ecuación 5. Porcentaje de Vitalidad Espermática.

$$\%Vitalidad = \frac{\text{Número de espermatozoides no teñidos}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el software estadístico InfoStat versión 2020e/estudiantil. Donde las características espermáticas microscópicas obtenidas en porcentajes fueron transformados a valores angulares (arcoseno de la raíz de p). Se evaluaron las muestras de espermatozoides provenientes del conducto deferente de llamas en pools combinado de los machos en dos fases; pre-congelación (colección 37 °C, fase de equilibrio 5 °C) y a la post-descongelación (38 °C) y se les procedió a efectuar un ANOVA entre las distintas variables independientes, dilutores comerciales (TRIS-YH, AndroMed y Bioxcell.) mientras que las variables dependientes fueron la calidad espermática (motilidad total, integridad de la membrana plasmática y vitalidad), para la evaluación de los patrones de motilidad post-descongelación se realizó un MANOVA entre las distintas variables independientes, dilutores comerciales (TRIS-YH, AndroMed



y Bioxcell.) y las variables dependientes, patrones de motilidad (progresiva, oscilatoria y circular).

El análisis se realizó con un nivel de significancia de 0.05.

El modelo aditivo lineal del ANOVA fue:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_y$$

Donde:

i = Tratamientos 1 (TRIS-YH), 2 (AndroMed) y 3 (Bioxcell).

y_{ij} = Variable respuesta

μ = Media general

α_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

e_y = Error experimental

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA A LA PRECONGELACIÓN

(COLECCIÓN A 37 °C).

Tabla 1. Efecto de los dilutores sobre las características espermáticas a la colección a 37 °C (promedio \pm DS).

	n	TRIS-YH	ANDROMED	BIOXCELL	p Value
Motilidad total (%)	8	64.1a \pm 5.25	63.6a \pm 4.51	37.4b \pm 1.65	<0.0001
Test Hipoosmótico (%)	8	46.9a \pm 6.09	61.9b \pm 2.36	58.8b \pm 4.24	<0.0001
Vitalidad (%)	8	59.9a \pm 2.23	67.5b \pm 6.88	55.8a \pm 2.87	<0.0001

Nota: a, b, c: letras diferentes en cada fila indican diferencia significativa.

La Tabla 1. Muestra las características microscópicas, donde se aprecia entre los parámetros la motilidad total, test Hipoosmótico y vitalidad, existen diferencia entre dilutores.

Respecto a la motilidad total al momento de la colección diluido con diferentes dilutores, las proporciones de motilidad con el dilutor TRI-YH y AndroMed fueron similares, mientras que la proporción con el dilutor Bioxcell fue inferior; estas diferencias probablemente se deba a la composición del dilutor TRIS-YH que contiene como crioprotector no permeable a las lipoproteínas de bajo peso molecular de la yema de huevo que interaccionan con la membrana plasmática del espermatozoide y modifican la permeabilidad mientras que el dilutor AndroMed contiene lecitina de soya como crioprotector no permeable que confiere estabilidad estructural a las membranas celulares



(Oke et al., 2010). Sin embargo, el dilutor Bioxcell que también contiene lecitina de soya como crio-protector no permeable y muestra parámetro de motilidad inferior con respecto a los dos dilutores antes mencionados. Esto se podría deberse al origen de fabricación del dilutor, ya que el dilutor Bioxcell proviene de IMV Technologies, L'Aigle, Francia y posiblemente contenga algunos componentes que disminuye la motilidad total (Jimenez et al., 2020). En líneas generales, el dilutor Bioxcell no mantiene adecuadamente la motilidad de espermatozoides de llama procedente del conducto deferente.

Los resultados contrastados con otros autores con la misma técnica de colección de espermatozoides para la motilidad empleando un dilutor que contiene yema de huevo, reporto valores similares del 56.20% a 65.16% (Arizabal, 2019; Pérez. et al., 2014; Pérez et al., 2016), estos resultados están dentro de nuestros parámetros encontrados en el presente estudio. Del mismo modo, encontraron para la motilidad 57.50 % (Aisen et al., 2021), siendo un porcentaje menor a lo encontrado en el presente estudio.

Por otra parte, autores con la misma técnica de colección de espermatozoides empleando el dilutor TRIS-YH reportaron proporciones inferiores del 17.03% al 43.98% (Cabrera, 2018; Calderon, 2015; Quispe, 2015). Con el dilutor TRIS-YH reportó 53.3% y con el dilutor AndroMed 50.7% (Bertuzzi et al., 2020), estos valores en proporción inferiores por los autores se deberían principalmente a la época no reproductiva en que realizaron el trabajo. Por otro lado, con la misma técnica de colección de espermatozoides reportó una motilidad de 77.7% (Deza, 2004), el cual es superior respecto al presente estudio; nuestra menor proporción encontrada se debería a la frecuencia de colección con la que realizamos el presente trabajo.



Autores con la misma técnica de colección de espermatozoides al realizar la prueba de funcionalidad de la membrana plasmática mediante el Test Hipoosmótico encontraron valores similares en espermatozoides de alpacas del 46.64% (Cabrera, 2018); con el dilutor Tris-YH del 46.63% (Calderon, 2015). Mientras que autores reportaron valores superiores en alpacas del 51.55% y 52.98 con el dilutor TRIS-YH (Pérez et al., 2016); con TRIS-YH reportó 55.40% (Arizabal, 2019); finalmente con el dilutor TRIS-YH reportó 54.76% (Torres, 2018), las proporciones menores en el presente trabajo se debería a la mayor frecuencia de colección con la que realizamos y en esta diferencia también afectó la especie, ya que el trabajo se realizó en llamas.

Pacheco et al.,(2014), indica al comparar 2 técnicas de colección de semen en alpacas; como la técnica de vagina artificial y la técnica de desviación de los conductos deferentes; los autores sometieron las muestras a diferentes soluciones Hipoosmóticas de 50, 100 y 150 mOsmol, reportando para 100 y 150 mOsmmol, 38.96% y 21.51% y al contrastar los resultados se observa que nuestros porcentajes fueron superiores. En alpacas en época no reproductiva con la misma técnica de recuperación de espermatozoides, utilizando el dilutor base TRIS con diferentes concentraciones de solución Hipoosmótico de 100, 125, 150, 175 y 200 mOsm incubadas a 5 y 15 minutos hallaron valores de 38.53%, 38.93% y 37.11% respectivamente (Quispe, 2015). La mayor proporción encontrada en el presente trabajo se debería a que se sometió a una sola osmolaridad y al manejo adecuado de la muestra.

Para la vitalidad espermática, autores con la misma técnica de colección de espermatozoides en alpaca empleando dilutores a base de yema de huevo reportaron entre el 20% a 52.7% (Cabrera, 2018; Pérez. et al., 2014; Torres, 2018), al contrastar estos porcentajes con los resultados del presente estudio son en menor proporción y esto se

debería probablemente al manejo realizado el laboratorio y experiencia del personal en vista de que estas investigaciones se vienen realizando por bastantes años.

Por otro, lado reportó valores similares con el dilutor TRIS-YH de 58.25% (Deza, 2004). Así mismo, otros autores hallaron proporciones mayores entre el 65.80 y 74.49% (Arizabal, 2019; Quispe, 2015). La variabilidad de los resultados se podría deber a influencia de factores como la especie, individuo y manejo durante la recuperación de los espermatozoides.

4.2. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA A LA PRECONGELACIÓN (FASE DE EQUILIBRIO A 5 °C).

Tabla 2. Efecto de los dilutores sobre las características espermáticas en fase de equilibrio a 5 °C (promedio \pm DS).

	N	TRIS-YH	ANDROMED	BIOXCELL	p Value
Motilidad total (%)	8	54.0 a \pm 8.38	56.5 a \pm 2.12	33.2b \pm 3.21	<0.0001
Test Hipoosmótico (%)	8	39.1a \pm 6.24	57.1b \pm 3.58	48.5c \pm 2.6	<0.0001
Vitalidad (%)	8	55.6a \pm 6.19	62.6b \pm 5.53	51.4a \pm 2.36	0.0008

Nota: a, b, c: letras diferentes en cada fila indican diferencia significativa.

La tabla 2. Muestras las características microscópicas, Donde se aprecia que los valores de motilidad total, test Hipoosmótico y vitalidad espermática en la fase de equilibrio mostrando diferencia entre dilutores.

Con relación a la motilidad total, los resultados contrastados con otros autores con la misma técnica de recuperación de espermatozoides empleando dilutores que contiene yema de huevo reportaron valores similares de 58.1%, 52.63% y 48.31% en espermatozoides de alpaca (Gómez et al., 2016; Pérez et al., 2016), estos resultados se



encuentran dentro de nuestros parámetros, y se debería a la misma técnica de colección y a la presencia de yema de huevo que se empleó.

Por otra parte, autores con la misma técnica de colección de espermatozoides empleando el dilutor TRIS-YH hallaron valores inferiores de 33.24 % y 34.20% (Calderon, 2015); 33.24% (Cabrera, 2018), estos valores inferiores respecto al presente estudio se debería al tiempo prolongado de exposición a concentraciones elevadas del crioprotector (GL) que causan daño a los espermatozoides disminuyendo la motilidad (Carretero et al., 2014). Mientras que diversos autores con diferentes técnicas de colección de semen con presencia de plasma seminal, con el dilutor TRIS-YH y AndroMed reportó 44.7% y 39.6% respectivamente (Bertuzzi et al., 2020); mientras que en semen de llama con el dilutor AndroMed reportó 29.5% y 21.0%; en 24 y 48 horas de equilibrio (Bertuzzi et al., 2021), estos valores inferiores respecto al presente estudio se debería a que los autores sometieron a los espermatozoides a tiempos prolongados a los crioprotectores permeables, ya que la fase de equilibrio fue mayor de 30 minutos. Y se corroboraría con lo indicado por Perez, et al.,(2014), con diferentes tiempos de enfriamiento de 0 a 48 horas con el dilutor TRIS-YH reportó 67.37%, 56.29%, 34.71% y 7.78%; observando que el tiempo de equilibrio afecta la motilidad de los espermatozoides, ya que los espermatozoides están condicionados a cambios durante prolongados periodos de conservación, por el metabolismo de los espermatozoides que influye en la motilidad; esta condición puede ser afectada en gran manera cuando se trabaja con muestras de espermatozoides obtenidas del epidídimo y del conducto deferente (Pérez et al., 2014).

Por otro parte, en trabajos realizados en camellos dromedarios en semen entero al emplear dilutores comerciales que contiene lecitina de soya encontraron valores inferiores



con el dilutor AndroMed de 41.4 % y con el dilutor Bioxcell 12.6%, las proporciones inferiores a los resultados del presente trabajo se deberían al tiempo prolongado de equilibrio que fue durante 24 horas; así mismo al emplear diferentes dilutores comerciales que contiene yema de huevo, hallaron valores superiores de 83.0%, 78.9% y 72.4% con Triladyl, Green buffer y Biladyl respectivamente (Al-Bulushi et al., 2019); y podría deberse a la diferencia que existe entre la especie y al método de colección, ya que los dilutores comerciales a base de yema de huevo serían los más adecuados para mantener la motilidad y almacenar a 5 °C semen de camello dromedario y es probable que por esa razón los valores reportados sean muy superiores respecto a nuestro estudio con los dilutores a base de yema de huevo.

Respecto a la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el Test Hipoosmótico y al contrastar nuestros resultados, hallaron porcentajes inferiores con la misma técnica de colección de espermatozoides empleando el dilutor Tris-YH reportó 33.51% (Calderon, 2015), la proporción inferior se debería a los tiempos prologados de refrigeración que causa daño celular a los espermatozoides durante el proceso de refrigeración, produciendo alteraciones morfológicas, ruptura de la membrana plasmática (De Leeuw et al., 1991; Hammerstedt et al., 1990).

Por otra parte, hallaron valores similares con la misma técnica de colección de espermatozoides, empleando el dilutor Tris-YH + Plasma seminal de 40.10% (Calderon, 2015); de igual manera con el dilutor TRIS-YH de 42.80% (Torres, 2018). Proporciones superiores se reportaron empleando un dilutor a base de yema de huevo de 46.67% y 55.93% (Pérez et al., 2016); la inferioridad de nuestros resultados se debería a la frecuencia de colección con la que se realizó el presente trabajo y a la influencia de la especie.

Respecto a la vitalidad espermática, al contrastar las proporciones del presente trabajo, autores con la misma técnica de colección de espermatozoides, empleando el dilutor TRIS-YH encontraron porcentajes inferiores de 34.97% (Torres, 2018); 26.45% y 33.90% (Calderon, 2015), los valores inferiores respecto al presente estudio se debería al efecto de la especie llama y al manejo durante la fase de equilibrio que realizamos.

Mientras que con técnicas de colección con presencia de plasma seminal como la vagina artificial empleando el dilutor AndroMed encontraron 72.61%, 69.86%, 71.25%, 69.64% y 67.46% (Ramírez, 2019), las proporciones inferiores en el presente estudio se debería a que los espermatozoides del conducto deferente no poseen plasma seminal, que poseen diferentes sustancias que protegen al espermatozoide.

4.3. EVALUACIÓN DE LOS DIFERENTES PATRONES DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA A LA POST-DESCONGELACIÓN.

Tabla 3. Efecto de los dilutores sobre los diferentes patrones de motilidad espermática crio-conservados con tres diferentes dilutores (promedio \pm DS).

PATRONES DE MOTILIDAD	TRIS-YH	ANDROMED	BIOXCELL
Motilidad Progresiva (%)	11.6a \pm 3.89	8.37b \pm 3.09	2.24c \pm 0.648
Motilidad oscilatoria (%)	12.6a \pm 3.61	23.1b \pm 3.61	6.43c \pm 1.64
Motilidad circular (%)	1.91a \pm 2.29	1.19a \pm 1.08	1.4a \pm 0.476

Nota, a: el uso de la misma letra en cada fila indica valores similares ($p < 0.0001$).

La tabla 3, muestra los diferentes patrones de motilidad a la post-descongelación, como la motilidad progresiva, oscilatoria y circular son diferentes para los dilutores Bioxcell, AndroMed y Tris-YH.



Debido a la característica reológica como la filancia en el semen de camélidos, los espermatozoides presentan motilidad oscilatoria y no progresiva en muestras de semen con plasma seminal (Giuliano. et al., 2010). Al separar espermatozoides de muestras de semen fresco de llama, del PS los espermatozoides conservan la motilidad oscilatoria a pesar de aislar los espermatozoides del PS (Bertuzzi et al., 2018), mencionan que las diluciones de los eyaculados de llama no inducen a los espermatozoides a adquirir motilidad progresiva (MP), pero al emplear YH en procesos de criopreservación, permiten que los espermatozoides de llama adquieran MP, pese a que las muestras poseen características reológicas como la filancia (Fumuso, 2018), esta sería la principal característica por la cual en nuestro estudio se encontró valores superiores de MP con el dilutor TRIS-YH seguido del dilutor AndroMed y proporciones muy inferiores con el dilutor Bioxcell.

La evaluación de los diferentes patrones de motilidad espermática en espermatozoides de llama tiene una gran importancia porque, la fragmentación de los espermatozoides se correlaciona negativamente con la motilidad progresiva, pero no con la motilidad total y esto indicaría que la evaluación de la motilidad progresiva de los espermatozoides es un parámetro útil para determinar el daño sub-estructural, ya que cuanto mayor es el índice de fragmentación del ADN, menor es la fertilidad en varias especies ya que se vería afectada la motilidad progresiva que se encarga de la fertilidad (Stewart et al., 2016).

Los resultados contrastados con otros autores con diferente método de colección de semen como la electroeyaculación reportaron valores similares empleando el dilutor TRIS -YH para motilidad progresiva de 9.3% y motilidad oscilatoria 7.0% (Zampini et al., 2020).



Por otro lado, al contrastar nuestros resultados con diferentes autores reportaron proporciones inferiores para la motilidad progresiva y motilidad oscilatoria de 1.1% y 7.3% respectivamente (Guillén et al., 2021), la inferioridad de las proporciones reportadas se deberían al método de criopreservación que empleo el autor. Mientras que empleando dilutores como AndroMed, Triladyl y base Tris reportaron para motilidad progresiva 0.00%, 0.14% y 0.12% respectivamente para cada dilutor; mientras que para la motilidad no progresiva obtuvo 0.00%, 15.56% y 10.97% respectivamente para cada dilutor (Ordoñez, 2015), las proporciones inferiores que reporta el autor en comparación con los resultados encontrados en él presenta trabajo se deberían al método de criopreservación en pellets hielo seco (-78°C) que realizo el autor y que no favorecería a los diferentes patrones de motilidad espermática.

Mientras que un reporte con la misma técnica de colección de espermatozoides de camélidos empleando el dilutor TRIS-YH para la motilidad progresiva reportó 24.4% (Gómez et al., 2016), los valores superiores reportados por el autor respecto al presente trabajo se debería a que el autor adiciono un antioxidante en la dilución espermática para la criopreservación.

4.4. EVALUACIÓN ESPERMÁTICA A LA POST-DESCONGELACIÓN.

Tabla 4. Efecto de los dilutores comerciales sobre las características espermáticas post-descongelación (promedio \pm DS).

	TRIS-YH	ANDROMED	BIOXCELL	p Value
Motilidad total (%)	26.1a \pm 5.49	32.6b \pm 3.66	10.1c \pm 1.83	<0.0001
Test Hipoosmótico (%)	23.2a \pm 13.2	31.9b \pm 9.28	17.5c \pm 5.29	<0.0001
Vitalidad (%)	38.7a \pm 5.12	29.2b \pm 2.62	10.8c \pm 1.5	<0.0001

Nota: a, b, c: letras diferentes en cada fila indican diferencia significativa.

La tabla 4. Muestras las características microscópicas, donde se aprecia que los valores de motilidad total, test Hipoosmótico y vitalidad al momento de la post-descongelación, mostrando diferencia entre los diferentes dilutores.

Respecto a la motilidad total, la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el test Hipoosmótico y vitalidad espermática, se observa que el dilutor AndroMed y TRIS-YH muestran superioridad respecto al dilutor Bioxcell que muestra proporciones inferiores. En los procesos de criopreservación/descongelación de semen se producen cambios ultraestructurales en los espermatozoides, particularmente en la membrana plasmática y las membranas acrosómicas externas, función mitocondrial alterada y finalmente la motilidad reducida (Layek et al., 2016). Las diferencias entre los diferentes dilutores probablemente se deba a la composición del dilutor TRIS-YH que contiene como crioprotector no permeable a las lipoproteínas de bajo peso molecular que interaccionan con la membrana plasmática de las células espermáticas y modifican la permeabilidad de la membrana plasmática (Holt, 2000b). Por otro lado, la yema de huevo posee fosfolípidos, como la fosfatidilcolina, que proporciona protección al espermatozoide en el proceso de criopreservación/descongelación (Pillet et al., 2012), las LDL protegen a los espermatozoides del shock térmico protegiendo la integridad de la



membrana de los espermatozoides (Watson, 1981). Y están compuestas por 87% de lípidos y 12% de proteínas, presentando una forma esférica con un centro formado por triglicéridos, los que están rodeados por una envoltura de proteínas y fosfolípidos, y durante procesos de criopreservación/descongelación, las LDL son desordenadas y los fosfolípidos son liberados, y forman una cubierta protectora en la superficie de los espermatozoides (Hu et al., 2010), que brindarían protección a los espermatozoides durante los procesos de criopreservación/descongelación.

Mientras que el dilutor AndroMed contiene lecitina de soya como crio-protector no permeable que confiere estabilidad estructural a la membrana celular de los espermatozoides (Oke et al., 2010), ya que la lecitina de soya, posee una mezcla natural de fosfatidilcolina y varios ácidos grasos como el ácido esteárico, oleico y palmítico (Kumar et al., 2015) y le conferiría al espermatozoide una estabilidad estructural para mantener las diferentes características microscópicas de los espermatozoides de llama procedente del conducto deferente.

En líneas generales al comprar los dilutores AndroMed y Bioxcell que poseen lecitina de soya, apreciándose que el dilutor AndroMed superaran ampliamente al dilutor Bioxcell en mantener las características microscópicas como la motilidad total, la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el test Hipoosmótico y la vitalidad espermática a la post-descongelación; pese a que ambos dilutores presentan como crioprotector no permeable a la lecitina de soya, esta diferencia se podría deber a la composición y el origen de los dilutores; ya que el dilutor Bioxcell es de origen IMV Technologies, Francia con un pH 6.9 y posee componentes derivados de la soya, tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina; mientras que el dilutor AndroMed es de origen Minitub, Tiefenbach, Alemania con un pH 6.7 y posee Lecitina de soya,



fosfolípidos, tris, ácido cítrico, antioxidantes, glicerol, tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina. Mientras que los dilutores comerciales a base de yema de huevo como Triladyl de origen Minitub, Tiefenbach, Alemania, con un pH 6.7 y posee componente Tris, ácido cítrico, fructosa, glicerol, tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina; el dilutor Biladyl (fracción A) de origen Minitub, Tiefenbach, Alemania con un pH 6.7 y posee componente Tris, ácido cítrico, fructosa, tilosina, gentamicina, espectinomicina y lincomicina. Y el dilutor Green buffer de origen IMV Technologies, Francia con un pH 6.9 cuya composición no está revelada (Al-Bulushi et al., 2019), notando variaciones en el pH del dilutor. Es por eso que indican que en los procesos de criopreservación/descongelación suceden las alteraciones estructurales y bioquímicas que afectan los distintos organelos de los espermatozoides y llevando a la muerte durante todo el proceso de criopreservación/descongelación seminal (Watson, 1995). Los cambios ultraestructurales en los espermatozoides, particularmente en la membrana plasmática y las membranas acrosómicas externas, función mitocondrial alterada y motilidad reducida, se producen durante la criopreservación/descongelación (Layek et al., 2016). Dentro de las principales causas de la disminución de la motilidad y la sobrevivencia espermática se tiene a los cambios de pH; es por eso que se busca dilutores adecuados que tenga una capacidad amortiguadora que mantenga el pH en las muestras seminales adecuadamente (Buitrago & Pérez, 2008); los solutos disueltos en el medio que rodean al espermatozoide ejerzan presión sobre la membrana celular conociéndose a este fenómeno como presión osmótica del diluyente (Evans et al., 1990). Y se podría concluir que el pH de 6.7 del dilutor AndroMed mantiene adecuadamente las características microscópicas de los espermatozoides provenientes del conducto deferente de llama en procesos de criopreservación/descongelación.



Respecto a la motilidad total, al contrastar con diferentes autores con técnicas de colección con presencia de plasma seminal, reportaron proporciones inferiores en semen de llamas de 16.3% con el dilutor TRIS-YH (Zampini et al., 2020); con el dilutor TRIS-YH 17.03%, mientras que empleando dilutor AndroMed no presentó motilidad (Limachi et al., 2016), y se debería principalmente al método de criopreservación en vapores de nitrógeno de congelación tradicional. De esta misma manera, en semen de alpacas utilizando dilutores como AndroMed, Triladyl y base Tris, reportaron 0.00%, 15.7% y 11.09% respectivamente para cada dilutor (Ordoñez, 2015), los valores en proporciones inferiores reportados en comparación al presente trabajo se debería principalmente al método de criopreservación en pellets en hielo seco (-78°C) que realizó el autor. Mientras que en alpacas con el dilutor TRIS- taurina reportaron 11.68% y para el dilutor AndroMed 16.96% (Mendoza, 2015), los valores con proporciones inferiores respecto al presente trabajo se debería a la época del año y al método de criopreservación.

Por otra parte; diversos autores con la misma técnica de colección de espermatozoides reportaron valores inferiores en espermatozoides de alpacas, con el dilutor TRIS-YH de 13.45% (Torres, 2018); mientras con el dilutor Tris- YH de 14.46% y con TRIS-YH+ Plasma seminal de 15.66% (Calderon, 2015). Estos resultados inferiores respecto al presente trabajo se deberían al método de criopreservación y la exposición prolongada a concentraciones elevadas del crio-protector (GL) que no favorecerían a la motilidad. Mientras, autores con la misma técnica de colección de espermatozoides hallaron variabilidad con el dilutor Triladyl 24.51% y 33.18% (Pérez et al., 2016), debiéndose a la diferencia entre los individuos y entre los eyaculados recolectados del mismo macho (Raymundo et al., 2000); por otro lado, en espermatozoides de Alpaca con el dilutor TRIS-YH encontraron porcentajes de 18.20%, 34.20% y 29.00% con 3, 5 y 7



cm sobre el nivel de nitrógeno líquido respectivamente (Arizabal, 2019), la variabilidad de estos resultados se debe al método de criopreservación.

En la criopreservación de semen de camellos dromedarios con un dilutor específico Shotor (Sh) y la adición de diferentes crioprotectores como Sh-dimetilformamida, Sh-glicerol y Sh- dimetilsulfóxido, encontraron valores de 55.83%, 47.50% y 45.0%, respectivamente (El-badry et al., 2017), la superioridad de estos resultados frente a los valores obtenidos en el presente trabajo se debería al tipo de dilutor que es específico para los dromedarios y la diferencia entre especies.

Existe muy poca información al emplear el dilutor Bioxcell en procesos de criopreservación/descongelación de espermatozoides de camélidos, pero sí en otras especies como en semen cabra angora con el dilutor bioxcell reportó 38% (Daskin & Akcay, 2011). Por otra parte, en espermatozoides epididimarios de alpaca con el dilutor TRIS-YH reportaron 24.53% y con el dilutor Bioxcell 33.34% (Moina, 2014), los valores superiores respecto al presente trabajo se debería a la influencia de los individuos y la especie.

Cabe mencionar que los menores porcentajes de motilidad después del proceso de criopreservación de los espermatozoides se debe cambios en la morfología espermática, que incluyendo daños en la mitocondria, el acrosoma y cola del espermatozoide (Connell et al., 2002). La motilidad total es uno de los parámetros más afectados durante la criopreservación (Kumar et al., 2003). Las membranas espermáticas de los mamíferos son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y son sensibles al daño inducido por las especies reactivas al oxígeno (ROS) llevando a la disminución de la motilidad, por la rápida pérdida de ATP intracelular que conduce a daños en el axonema, la disminución de la viabilidad espermática y un incremento de los defectos morfológicos de la pieza



media del espermatozoide con defectos graves sobre la capacitación espermática y la reacción del acrosoma (Peris et al., 2007); daños que se verían al emplear el dilutor Bioxcell en el presente trabajo, ya que es el dilutor en presentar valores de motilidad inferiores respecto a los dilutores TRIS-YH y AndroMed.

Respecto a la funcionalidad de la membrana plasmática mediante el test Hipoosmótico se indica que en las muestras seminales de los camélidos existe una importante población de espermatozoides inmóviles, pero con las membranas funcionales intactas (Giuliano et al., 2008). Por esa razón es importante la evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática. Autores reportaron similitud con la misma técnica de colección de espermatozoides en alpacas con el dilutor TRIS-YH halló 27.67% (Torres, 2018); 21.54% y 27.24% (Calderon, 2015); Mientras con técnicas de colección sin presencia de plasma seminal como la recuperación de espermatozoides epididimarios de alpacas utilizando el dilutor TRIS-YH reportó 20.65% y con Bioxcell 19.95% (Moina, 2014), estos resultandos muestran similitud respecto al presente trabajo.

Autores con la misma tecnica de colecccion de espermatozoides reportaron varabialidad en los resultados en espermatozoides de alpacas usando el dilutor Triladyl reportaron 20.06% y 32.18% (Pérez et al., 2016); con el dilutor TRIS-YH reportaron 18.40%, 31.40% y 27.00% (Arizabal, 2019), esta variabilidad se debería a la diferencia entre individuos y a los métodos de criopreservación. Por otra parte, también indican que la variabilidad de los resultados se debería afectada por la concentración de solución Hipoosmotica ya que, los espermatozoides epididimarios o recuperados de los conductos deferentes tienen contacto directo con las soluciones Hipoosmoticas, por lo que soluciones de 100, 125 y 150 mOsml, son suficientes para la reacción de endosmosis (Quispe, 2015). Seria esta la razón por la cual existe mucha variación respecto a esta prueba.



Al emplear el dilutor Bioxcell para la criopreservación de semen cabras Angora reportaron 39% (Daskin & Akcay, 2011) la superioridad de este resultado se debería a la especie animal.

Finalmente, para la vitalidad espermática, al contrastar los resultados con diferentes autores con la misma técnica de colección, hallaron valores inferiores en alpacas con el dilutor TRIS- YH de 25.38% (Torres, 2018); con TRIS-YH de 12.67% y con TRIS-YH + Plasma seminal 14.74% (Calderon, 2015), la inferioridad en los resultados respecto al presente trabajo se debería a la exposición prolonga a concentraciones elevadas del crio-protector permeable. Por otro lado, la variabilidad en los resultados se debería a las diferentes temperaturas de congelación en espermatozoides de alpaca con el dilutor TRIS-YH, hallando 22.40%, 36.20% y 32.40% (Arizabal, 2019), los resultados se debería a la influencia de la temperatura de criopreservación sobre la vitalidad espermática.

Así mismo, por otra parte, con diferentes técnicas de colección de semen con presencia de plasma seminal como la electroeyaculación en llamas con el dilutor TRIS encontraron porcentajes de 20.13% y con AndroMed 3.8% (Limachi et al., 2016), las proporciones inferiores respecto al presente estudio se debería al método de criopreservación. Mientras que valores similares se reportaron en semen de llamas de 36.7% con el dilutor TRIS-YH con técnicas de recuperación de espermatozoides epididimarios (Zampini et al., 2020). Utilizando el dilutor Bioxcell reportaron 38% (Moina, 2014), la superioridad respecto al presente estudio se debería al método de criopreservación, la influencia de la especie y el individuo; el mismo autor con el dilutor TRIS-YH obtuvo 32.02%, la proporción reportada es inferior respecto al presente estudio se debería al método de criopreservación.



El proceso de criopreservación/descongelación, afecta principalmente la integridad de los espermatozoides, por esta razón que se han utilizado diferentes dilutores a base de la yema de huevo y derivados de origen vegetal para prevenir el daño criogénico. El principal componente activo de la yema de huevo es la fracción de lipoproteínas de baja densidad, que protege la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides (Moussa et al., 2002). Sin embargo, la gran variabilidad en su composición y el aumento del riesgo de contaminación microbiana (Aires, 2003), quizás sea una de las razones por las que tiene menor porcentaje respecto al dilutor AndroMed, sin embargo, algunos autores como Todd & Jones (1972), Tamuli & Watson (1994), mencionan la importancia en la acción protectora de la yema de huevo dada por sus componentes específicos como la fosfatidylcolina (lecitina), fosfolípidos, extracto de lípidos, fracciones de lípidos y proteínas específicas que proveen protección al espermatozoide durante el shock frío. El más importante efecto de la yema de huevo es la porción del complejo de lipoproteínas (fosfolípidos, lecitinas y cefalinas) que protegen al espermatozoide contra el shock térmico (Kampschmidt et al., 1953). Las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo poseen una propiedad crio-protectora 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 (Moussa et al., 2002).



V. CONCLUSIONES

- Los dilutores TRIS-YH y AndroMed presentan porcentajes superiores de motilidad total y vitalidad frente al dilutor Bioxcell mientras que los dilutores AndroMed y Bioxcell presentan porcentajes superiores del test Hipoosmótico frente al dilutor TRIS-YH en la colección a 37 °C.
- Los dilutores TRIS-YH y AndroMed presentan porcentajes superiores de motilidad total frente al dilutor Bioxcell, mientras que dilutor AndroMed y Bioxcell presentan porcentajes superiores del test Hipoosmótico frente al dilutor TRIS-YH y para la vitalidad espermática el dilutor AndroMed muestra superioridad frente a los dilutores TRIS-YH y Bioxcell en la fase de equilibrio a 5 °C.
- El dilutor TRIS-YH y AndroMed, presentan porcentajes superiores a la descongelación frente al dilutor Bioxcell con relación a la motilidad total, test Hipoosmótico y vitalidad espermática, mientras que para los diferentes patrones de motilidad espermática el dilutor TRIS-YH y AndroMed muestran porcentajes mayores de motilidad progresiva y motilidad oscilatoria frente al dilutor Bioxcell y la motilidad circular presenta similitud con los tres dilutores.



VI. RECOMENDACIONES

- Congelar los espermatozoides procedentes del conducto deferente con los dilutores Tris=YH o AndroMed.
- Evaluar los espermatozoides congelados/descongelados con pruebas supravitales para ver la integridad del ADN y acrosoma.
- Probar la fertilidad in vivo inseminando a la hembra con espermatozoides congelados/descongelados.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adams, G. P., Ratto, M. H., Collins, C. W., & Bergfelt, D. R. (2009). *Artificial insemination in South American camelids and wild equids*. 71, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.005>
- Aires, V. A., Hinsch, K. D., Mueller-Schloesser, F., Bogner, K., Mueller-Schloesser, S., & Hinsch, E. (2003). In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 60(2), 269–279. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01369-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01369-9)
- Aisen, E. G., López, W. H., Durand, M. G. P., Mamani, E. T., Mori, J. C. V., Ousset, M. J., Medina, V. H., Guerra, U. H. P., & Mamani, T. H. (2021). *Spermatozoa Obtained From Alpaca vas deferens . Effects of Seminal Plasma Added at Post-thawing*. 8(February), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.611301>
- Al-Bulushi, S., Manjunatha, B. M., Bathgate, R., Rickard, J. P., & de Graaf, S. P. (2019). Liquid storage of dromedary camel semen in different extenders. *Animal Reproduction Science*, 207(May), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.06.008>
- Aller, J. F., Rebuffi, G. E., Cancino, A. K., & Alberio, R. H. (2003). Influence of Cryopreservation on the Motility, Viability and Fertility of Llama (Lama Glama) Spermatozoa. *Archivos de Zootecnia*, 52(197), 15–23. http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/30_10_28_02aller.pdf <http://www.redalyc.org/pdf/495/49519702.pdf>
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(3), 145–173. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)
- Amirat, L., Tainturier, D., Jeanneau, L., Thorin, C., Gérard, O., Courtens, J. L., & Anton, M. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: A comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61(5), 895–907. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00259-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00259-0)
- Apaza, L. stephany. (2017). “Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero.” Universidad Nacional del Altiplano-puno.
- Arizabal, J. (2019). Efecto de tres niveles de congelamiento de espermatozoides de conducto deferente en alpacas (Vicugna pacos). In *SEGUNDA ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL*. http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/12303/Yana_Aydee_Quispe_Patricia.pdf?sequence=1&isAllowed=y



- Ávalos, A., Jorge, G., Ana, V., & Herrera, J. (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro. In *UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-XOCHIMILCO* (1st ed., Vol. 1).
- Banda, J., Shirley Evangelista, V., Luis Ruiz, G., Rocío Sandoval, M., Claudia Rodríguez, L., Martha Valdivia, C., & Alexei Santiani, A. (2010). Effect of extenders based on tris, tes and skim milk on cryopreservation of epididymalalpacaca sperm. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 20(1), 145–153.
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, 10, 49–62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- Bergeron, A., Crête, M. H., Brindle, Y., & Manjunath, P. (2004). Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. *Biology of Reproduction*, 70(3), 708–717. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022996>
- Bertuzzi, M., Fumuso, F., Arraztoa, C., Neild, D., Miragaya, M., & Carretero, M. I. (2018). *The use of Androcoll-ETM permits separation of raw llama sperm without the need for enzymatic treatment.*
- Bertuzzi, M., Fumuso, F., Velasquez Gonzalez, N., & Carretero, M. (2021). *Comparacion de dos diluyentes comerciales para refrigerar semen de llama.* 48.
- Bertuzzi, M., Torres, E. Y., Huanca, T., Neild, D., & Carretero, M. I. (2020). Comparison of Extenders With the Addition of Egg Yolk for Cooling Alpaca Sperm Obtained From Deferent Ducts. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597954>
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 18(4), 4–6.
- Bravo, P. W. (2002). *The reproductive process of South American camelids.* Seagull Printing.
- Bravo, P. W., Ccallo, M., & Garnica, J. (2000). *The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas.* 38, 91–95.
- Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J., & Ordofiez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 48(97), 361–367.
- Brown, B. W. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 58(3–4), 169–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00081-0)
- Buitrago, J. M., & Pérez, L. M. (2008). *Comparacion de dos diluyentes para la*



criopreservacion de semen ovino.

- Bustinza, C. (2001). *La Alpaca*, primera edición, Tomo I, Editorial Universitaria. *Puno Perú*.
- Cabrera, M. ali P. (2018). “*VIABILIDAD IN VITRO DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ALPACAS CONGELADOS/DESCONGELADOS CON DILUTORES A BASE DE LECHE DESCREMEDA*” (Issue 051). Universidad nacional del altiplano de puno.
- Cabrera, Orellana, J., & Pantoja, C. (2012). Efecto De Dos Dilutores Sobre La Motilidad E Integridad De La Membrana Espermática En Semen Congelado De Ovinos. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 21(2), 154–160. <https://doi.org/10.15381/rivep.v21i2.130>
- Calderon, D. (2015). *Efecto de la adición del plasma seminal de toro (Bos taurus) sobre la viabilidad de los espermatozoides criopreservados colectados de los conductos deferentes de alpacas (Vicugna pacos)*. http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/13203/Zirena_Velasquez_GianeIla.pdf?sequence=3&isAllowed=y
- Campbell, R. C., Dott, H. M., & Glover, T. D. (1956). Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *The Journal of Agricultural Science*, 48(1), 1–8. <https://doi.org/10.1017/S002185960003029X>
- Carretero, M. I., Neild, D. M., Ferrante, A., Caldevilla, M., Arraztoa, C. C., Fumuso, F. G., & Giuliano, S. M. (2014). Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of Lama glama spermatozoa. *Andrologia*, 47(6), 685–693. <https://doi.org/10.1111/and.12319>
- Choez, K. (2010). Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos. *Sistema de Revisiones En Veterinaria. UNMSM. Lima. Perú*.
- Concannon, P. W. (1989). Canine semen freezing and artificial insemination. *Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice*, 1247–1259.
- Connell, M. O., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). *The effects of cryopreservation on sperm morphology , motility and mitochondrial function*. 17(3), 704–709.
- Cormier, N., Sirard, M., & L.bailey, J. (1997). premature capacitation of Bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Society*, I(4).
- Daskin, A., & Akcay, E. (2011). *The Effect of Different Dilution Rates of Angora Buck Semen Frozen with Bioxcell ® Extender on the Post-thaw Quality * The Effect of Different Dilution Rates of Angora Buck Semen Frozen with Bioxcell ®*. January.
- De-Leeuw, W., Haring, R. M., Kaal-Lansbergen, L. M. T. E., & Daas, J. H. G. den.



- (2000). *Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract*. 00, 57–67.
- De Leeuw, F. E., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1991). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals*, 1(9), 95–104.
- Delgado, P., & Quispe, Y. (2015). Efecto de tres niveles de glicerol y tiempos de equilibramiento sobre la viabilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*) post- descongelado. *Revista Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Investigation*, 17(3), 445. <https://doi.org/10.18271/ria.2015.169>
- Deza, H. (2004). *Conservación de espermatozoides obtenidos a través del conducto deferente en alpacas (*Lama pacos*) y llama (*Lama glama*) y su posterior viabilidad*. Tesis FMVZ-UNA-Puno.
- El-badry, Ha, M., & Abo, E. T. R. (2017). *The effect of some cryoprotectants on dromedary camel thawed semen*. May 2016, 1–4. <https://doi.org/10.1111/rda.12934>
- Evans, G., Maxwell, W. M. C., & Salamon, S. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 204p.
- Fahy, G. M., Lilley, T. H., Linsdell, H., Douglas, M. S. J., & Meryman, H. T. (1990). Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, 27(3), 247–268. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90025-Y](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90025-Y)
- Fernández, S. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. *Proyecto de Cooperación Técnica En Apoyo de La Crianza y Aprovechamiento de Los Camélidos Sudamericanos En La Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura y La Alimentación (FAO)*.
- Ferré, L. B., & Werkmeister, A. (1996). Desarrollo De Una Vagina Artificial Termoeléctrica Para La Colecta De Semen En Camélidos (Resultados Preliminares). *Arg. de Prod. Animal*, 16(4), 363–365.
- Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M., & Okabe, K. (2008). Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *Journal of Reproduction and Development*, 54(4), 286–289. <https://doi.org/10.1262/jrd.20004>
- Fumuso, F. (2018). *Efecto del plasma seminal sobre los espermatozoides criopreservados de llama (*Lama glama*)*. 125.
- Gallardo, J., & Vargas, C. (2015). “Evaluación de tres diluyentes para criopreservar



semen bovino de toros cruce sahiwal (Bos taurus) en el trópico húmedo.”
<https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15728/1/T-IASA I-005483.pdf>

- Gao, D., Liu, J., Liu, C., McGann, L., Watson, P., Kleinhans, F., Mazur, P., Critser, E., & Critser, J. (1995). *Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glicerol.*
- Garner, D. L., & Hafez, E. S. E. (2016). Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in Farm Animals*, 96–109. <https://doi.org/10.1002/9781119265306.ch7>
- Giuliano., Bisiau, C., Carretero, M. I., Arraztoa, C. C., & Neild, D. (2012). Use of comassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet*, 14(1), 279.
- Giuliano., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M., & Miragaya, M. (2010). Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science*, 118(1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.005>
- Giuliano, Chaves, G., Trasorras, L., Gambarotta, M., Neild, D., Director, A., Pinto, M., & Miragaya, H. (2012). Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Animal Reproduction Science*, 131(3–4), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.010>
- Giuliano, Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., & Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science*, 104(2–4), 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.016>
- Giuliano, S. M., Spirito, S. E., Miragaya, M. H., Capdevielle, E. F., Agüero, A., Boquet, M. D., & Ferrari, M. R. (2002). ABSTRACTS FOR POSTER PRESENTATION- Exotic Species-ELECTROEJACULATION AND SEMINAL PARAMETERS IN VICUGNA (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology*, 57(1), 583.
- Gómez, O. E., Pérez, M. G., & Machaca M., V. (2016). Adición del Antioxidante Tempol en la Criopreservación de Espermatozoides de Alpaca (*Vicugna pacos*) Colectados por Desviación del Conducto Deferente. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 27(2), 294. <https://doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11642>
- Graham, K., & Parks, J. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, 209–222.
- Guillén, C., Fumuso, F. G., Bertuzzi, M. L., Giuliano, S. M., & González, N. V. (2021). *Use of Androcoll-E TM to Separate Frozen-Thawed Llama Sperm From Seminal Plasma and Diluent*. 7(January), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.594926>



- Hafez. (1989). *Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ta edición editora Interamericana Mc Graw Hill*. México.
- Hafez. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (6ta Ed.). Editorial Interamericana - Mc Graw – Hi.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2007). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. McGraw-hill.
- Hammerstedt, H., Graham, K., & Nolan, P. (1990). *Cryopreservation What of Mammalian Sperm : We Ask Them to Survive other retrace*. 11(1).
- Hanzen, C., Cucho, H., Ampuero, E., Ordoñez, C., & Sumar, J. (2014). Principios de la reproducción de los camélidos sudamericanos. *FUNSAAC. Cusco-Perú*, 58–59.
- Herman, H. A., Mitchell, J. R., & Doak, G. A. (1994). *The artificial insemination and embryo transfer of dairy and beef cattle: A handbook and laboratory manual* (Issue 636.08245 H551a). Illinois, US: Interstate Publishers.
- Hernández, Roberto, & Mendoza, C. (2018). *Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta*.
- Herold, F. C., de Haas, K., Colenbrander, B., & Gerber, D. (2006). Comparison of equilibration times when freezing epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus caffer*) using Triladyl™ or AndroMed®. *Theriogenology*, 66(5), 1123–1130. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.007>
- Hinsch, E., Hinsch, K., Boehm, J. G., & Schill, W. (1997). *Functional Parameters and Fertilization Success of Bovine Semen Cryopreserved in Egg-yolk Free and Egg-yolk Containing Extenders*. 149, 143–149.
- Hogan, B., Costantini, F., & Lacy, E. (1986). *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*.
- Holt, W. V. (2000a). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- Holt, W. V. (2000b). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Hu, J. H., Li, Q. W., Zan, L. Sen, Jiang, Z. L., An, J. H., Wang, L. Q., & Jia, Y. H. (2010). The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*, 117(1–2), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.001>
- Huanca., Apaza, N., & Sapaná, R. (2007). Defectos congénitos y hereditarios visibles en



- alpacas de dos zonas representativas de la region Puno. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 14(480), 57–65.
- Huanca, W., Cordero, A., & Adams, G. P. (2007). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 15(1), 195–201.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70(1), 219–228.
- Jimenez, S., Álvarez Rodríguez, M., Hidalgo, C. O., Peña, A. I., Rodríguez Gilb, J. E., & Mogasb, T. (2020). *Evaluación in vitro de diluyentes a base de yema de huevo, lecitina de soja y liposomas para la criopreservación de semen de toros lecheros*. 215.
- Kampschmidt, R. F., Mayer, D. T., & Herman, H. A. (1953). Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 36(7), 733–742.
- Kubicek, J. (1974). Semen collection in alpaca with an urethral fistula. *Zeitschrift Fuer Tierzuechtung Und Zuechtungsbiologie (Germany, FR)*.
- Kumar, S., Millar, J. D., & Watson, P. F. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: A comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 46(3), 246–253. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00040-3)
- Kumar, Saini, M., Kumar, D., Balhara, A. K., Yadav, S. P., Singh, P., & Yadav, P. S. (2015). Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, 159, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.05.010>
- Layek, S. S., Mohanty, T. K., Kumaresan, A., & Parks, J. E. (2016). Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Animal Reproduction Science*, 172, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.04.013>
- Limachi, L., Loza, M. G., & Delgado, P. Á. (2016). Evaluación de características microscópicas de semen de llama (*Lama glama*) crioconservados en dos dilutores. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 3(1), 8–21. <https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2016.030100008>
- Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., & Me, M. (2002). *Major Proteins of Bovine*



Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen ' s Egg Yolk 1. 1258, 1250–1258. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.004358>

- Maxwell, W. M. C., & Johnson, L. A. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*, 46(3), 408–418. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199703\)46:3<408::AID-MRD21>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<408::AID-MRD21>3.0.CO;2-T)
- Mazur, P. (1970). Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, 138(3934), 939–949.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*, 247(3 Pt 1), 0–4. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). CURRENT STATUS OF SPERM CRYOPRESERVATION: WHY ISN'T IT BETTER? *Theriogenology*, February 1921, 1–4.
- Mendoza, E. (2015). *Evaluación de dos protocolos para la congelación de semen de alpaca (Vicugna pacos) a 2736 m.s.n.m. - Ayacucho 2013.* <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2825>
- Meza, D. (2016). *Efecto de dos dilutores en la refrigeracion de semen de alpaca(Vicugna-pacos) en el centro de investigacion y produccion quimsachata-INIA-distrito de santa lucia-puno 4200msnm. 2008.* Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga.
- Moina, M. (2014). *Efecto de dos dilutores y dos metodos de congelacion sobre la viabilidad de espermatozoides epididimarios de alpacas(vicugna pacos) obtenidos post-mortem.*
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695–1706.
- Muiño, R. (2007). Evaluación de la motilidad y viavilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. In *Uclm.Es.* [https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2406/9788497509886_content.pdf;jsessionid=9259B4AB24E94133189B15F7AD45A8BC?sequence=1%0Ahttp://www.uclm.es/irec/Ecologia/pdf/repro_tesis/Tesis Doctoral Olga García Álvarez 2011.pdf](https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2406/9788497509886_content.pdf;jsessionid=9259B4AB24E94133189B15F7AD45A8BC?sequence=1%0Ahttp://www.uclm.es/irec/Ecologia/pdf/repro_tesis/Tesis%20Doctoral%20Olga%20García%20Álvarez%202011.pdf)
- Muiño, R., Fernández, M., & Peña, A. I. (2007). Post-thaw survival and longevity of bull



- spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(3), 305–311. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00784.x>
- Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, C. O., & Peña, A. I. (2008). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*, 109(1–4), 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.10.007>
- Neild, Deborah M., Gadella, Bart M., Chaves, Maria Graciela, Miragaya, Marcelo H., Colenbrander, B., & Agüero, A. (2003). *Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation*. 59, 1–6.
- Novoa, C., & Leyva, V. (1996). Reproducción en alpacas y llamas. *Publ. Cient. IVITA*, 26, 1–2.
- Oke, M., Jacob, J. K., & Paliyath, G. (2010). Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. *Food Research International*, 43(1), 232–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.021>
- Ordoñez, C. (2015). Evaluación de tres dilutores en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*) en pelets. *SPERMOVA*, 5(1), 119–123. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.27>
- Pace, M. M., & Graham, E. F. (1974). *COMPONENTS IN EGG YOLK WHICH PROTECT BOVINE SPERMATOZOA DURING FREEZING*.
- Pacheco, J. (2015). Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos Redalyc Sistema de Información Científica Pacheco Curie , Joel Iván Veterinaria Organización España. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 9(May 2008), 1–17.
- Pacheco, J., Mamani, R., Franco, F., Zea, O., Pezo, D., & Vélez, V. (2014). Efecto de la osmolaridad sobre la respuesta endosmótica en espermatozoides de epididimo y eyaculados de alpaca. *Spermova*, 4(1), 36–38.
- Pagl, R., Aurich, J. E., Müller-Schlösser, F., Kankofer, M., & Aurich, C. (2006). Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. *Theriogenology*, 66(5), 1115–1122. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.03.006>
- Paricahua, E. (2001). *Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca*. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- Pérez, Zevallos, J., & Pérez, U. H. (2014). Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. *Spermova*, 4(2), 139–144.



- Pérez, Quintano, J., & Perez, U. H. (2014). Sobrevivencia espermática en refrigeración a 5°C recuperado del conducto deferente de alpaca en tres dilutores con dos protectores. *Spermova*, 4(2), 153–158.
- Pérez, Zevallos, J., & Perez, H. (2016). *Viabilidad in vitro e in vivo de los espermatozoides congelados/descongelados del conducto deferente de alpacas (Vicugna pacos)*. 18, 223–230.
- Peris, S. I., Bilodeau, J.-F., Dufour, M., & Bailey, J. L. (2007). *Impact of Cryopreservation and Reactive Oxygen Species on DNA Integrity, Lipid Peroxidation, and Functional Parameters in Ram Sperm*. 892(December 2006), 878–892. <https://doi.org/10.1002/mrd>
- Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., & Magistrini, M. (2012). Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*, 77(2), 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.08.001>
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration. In *Nature (London)* (Vol. 164, p. 666).
- Quintano, J. (2002). *Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (Lama pacos) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores*. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- Quispe, H. (2015). Test hipoosmótico en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) recuperados del conducto deferente. *Spermova*, 5(1), 10–14. <https://doi.org/10.18548/asp/0002.2>
- Raggi, L. A. (2005). *Situación actual de los camélidos sudamericanos en Chile. Proyecto de cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina*. TCP/RLA/2914. Santiago: FAO.
- Ramírez, A. A. (2019). Evaluación de tres tratamientos de semen sobre la filancia, motilidad y vitalidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*) a 2736 m.s.n.m. - Ayacucho 2017. In *repositorio de tesis digital - unsch*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA.
- Raymundo, F., Huanca, W., Huertas, S., & Gaulty, M. (2000). Influence of different extenders on the motility in alpaca (*Lama pacos*) semen. *Proceedings of the 2nd International Camelid Conference—Agroeconomics of Camelid Farming*, 79.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Salisbury, G. W. (1982). *Fisiología de la Reproducción Animal*. España: Edit. ACRIBIA.



- San-martin, M., Copaira, M., Zuniga, J., Rodreguez, R., & Bustinza, G. (1967). Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fert*, *16*, 395–399.
- SENAMHI. (2022). *Imágenes de satélite*. <https://www.senamhi.gob.pe/?p=satelites>
- Sharpe, M. S., Lord, L. K., Wittum, T. E., & Anderson, D. E. (2009). Pre-weaning morbidity and mortality of llamas and alpacas. *Australian Veterinary Journal*, *87*(1–2), 56–60. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2008.00377.x>
- Sherman, J., & Bunge, R. (1953). Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. © *Nature Publishing Group* *Nature Publishing Group*.
- Silva, A. R., Cardoso, R. C. S., Uchoa, D. C., & Silva, L. D. M. (2003). Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Elsevier-Theriogenology*, *59*, 821–829. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01130-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01130-5)
- Snoeck, P. P. N., Henry, M., & Melo, M. I. V. (2007). *Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen equino*. 56–64.
- Spallanzani, L. (1776). Osservazioni e speienze interno ai vermicelli spermatici dell'uomo e degli animali. *Opusculi Di Fisica Animale e Vegetabile*, Modena.
- Stewart, J. L., Shipley, C. F., Katich, A. S., Po, E., Ellerbrock, R. E., Lima, F. S., & Canisso, I. F. (2016). Cryopreservation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) semen using soybean-, liposome-, and egg yolk-based extenders. *Animal Reproduction Science*, *171*, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.05.006>
- Suarez, C. (2015). *Fertilidad de semen congelado de toros nacionales Holstein usando los dilutores leche-yema, Tris-yema y Triladyl*.
- Sumar, J. (2013). Embryo transfer in domestic South American camelids ♂. *Animal Reproduction Science*, *136*(3), 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.029>
- Sumar, J., & Leyva, V. (1981). Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). *Memorias Del IV Convención Internacional Sobre Camélidos Sudamericanos*. Punta Arenas. Chile.
- Tamuli, M. K., & Watson, P. F. (1994). Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Reproduction Science*, *35*(3–4), 247–254. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)90040-X](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)90040-X)
- Thun, R., Hurtado, M., & Janett, F. (2002). *Comparison of Biociphos-Plus 1 and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen*. *57*, 1087–1094.



- Todd, J. E., & Jones, L. M. (1972). *Matrimonial Property: A Survey Carried Out on Behalf of the Law Commission, Among Married Couples and Formerly Married People in England and Wales, Establishing the Current Pattern of Ownership of Matrimonial Property and the Opinions of Those Interviewed* (Vol. 475). HM Stationery Office.
- Toro, A. (2009). Espermograma. *Medicina & Laboratorio*, 15(3–4), 145–170.
- Torres, E. (2018). Efecto de la adición de plasma seminal antes y después de la congelación de espermatozoides colectados del conducto deferente de alpacas sobre algunas características espermáticas. In *Universidad Nacional del Altiplano - Puno*. Universidad Nacional del Altiplano-Puno.
- Vallenas, A., & Caribe, F. A. O. O. R. para A. L. y el. (1991). Características anatomofisiológicas. *Avances y Perspectivas de Los Camélidos Sudamericanos*. Ed. Saúl FernándezBaca. Oficina Regional de La FAO Para América Latina y El Caribe.
- Vaughan, J. (2003). Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). In *Rural Industries Research and Development Corporation- Australian Government* (Issue 03).
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). *Storage of bovine semen in liquid and frozen state*. 23–53.
- Vita, B. D. E. (2008). *Estudo de diferentes sistemas e curvas de congelação na eficiência da congelabilidade e fertilidade de sêmen equino*. Universidade estadual paulista faculdade.
- Watson, P. F. (1979). The preservation of semen in mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, 1, 283–350.
- Watson, P. F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction and Fertility*, 62(2), 483–492. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0620483>
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
- Zampini, R., Castro-gonzález, X. A., Sari, L. M., Martin, A., Diaz, A. V, Argañaraz, M. E., & Apichela, S. A. (2020). *Effect of Cooling and Freezing on Llama (Lama glama) Sperm Ultrastructure*. 7(October), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.587596>



ANEXOS

MATERIALES

Sustancias:

- Nitrógeno líquido
- Gentamicina 160 mg/2 ml
- Yema de huevo fresco
- Agua bidestilada
- Vaselina sólida, Portugal®
- Solución Hipoosmótico
- Colorante eosina nigrosina
- Agua ultra pura
- Glicerol
- Alcohol 70°
- Alcohol polivinílico
- Fructosa
- Dilutor AndroMed
- Dilutor Bioxcell
- Dilutor TRIS- citrato
- Ácido cítrico

Materiales de laboratorio:

- Termómetro digital
- Termocupla
- Vaso de precipitados, 100 ml
- Cámara de flujo laminar
- Tanque criogénico
- Probeta graduada, 100 ml
- Tubos de ensayo, 4 ml y 10ml
- Microscopio óptico
- Platino calentador
- Homogeneizador vortex
- Centrifugadora
- Balanza digital
- Refrigeradora
- Baño de maría
- Gradillas
- Equipo congelador de semen (TK 3000 COMPACTA CSE, TK Technologies®, Brasil)
- Termo de colección



Materiales:

- Torundas de algodón
- Pajillas de semen, 0.25 ml (IMV Technologies®; Francia)
- Jeringas, 10 mL; 5 mL; 3 mL y 1 mL
- Papel toalla
- Laminas portaobjetos
- Laminas cubreobjetos
- Papel filtro

ANEXO A: TABLAS

Tabla 5. Composición de la FRACIÓN “A” del dilutor TRIS-YH.

Producto	Cantidad
Tris	2.42 g
Ácido cítrico monohidratado	1.34 g
Fructuosa	1.25 g
Gentamicina	5 uL
Yema de huevo	20%
Agua bidestilada (completar a volumen final)	100 ml

Fuente: (Hafez, 2002).

Tabla 6. Composición de la FRACIÓN “B” del dilutor TRIS-YH.

Producto	Cantidad
Tris	2.42 g
Ácido cítrico monohidratado	1.34 g
Fructuosa	1.25 g
Glicerol	5%
Gentamicina	5 uL
Yema de huevo	20%
Agua bidestilada (completar a volumen final)	100 ml

Fuente: (Hafez, 2002).

Tabla 7. Composición de la Solución Hipoosmótica.

Producto	Cantidad
Citrato de sodio	0.734 g
Fructuosa	1.351 g
Agua bidestilada (completar a volumen final)	100 ml

Fuente: (Jeyendran et al., 1984)



Tabla 8. Composición de la tinción Eosina-Nigrosina.

Producto	Cantidad
Eosina	10 g
Nigrosina	1.67 g
Agua bidestilada (completar a volumen final)	100 ml

Fuente: (Campbell et al., 1956)

Tabla 9. Parámetros espermáticos a la colección 37°C con el dilutor TRIS-YH.

DILUTOR TRIS-YH			
COLECTA	MOTILIDAD TOTAL	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
1	61.422	51.563	62.963
2	63.85	42.326	60.307
3	72.358	43.269	58.198
4	60	57.307	57.75
5	57.235	38.095	62.713
6	71.358	48.269	57.198
7	63.422	44.563	60.963
8	63.235	50.095	58.713
PROMEDIO ±DS	64.1 ± 5.25	46.9 ± 6.09	59.9 ± 2.23

Tabla 10. Parámetros espermáticos a la colección 37°C con el dilutor AndroMed.

DILUTOR ANDROMED			
COLECTA	MOTILIDAD TOTAL	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
1	61.905	58.242	65.55
2	63.347	62.673	63.084
3	69.512	63.551	63.366
4	71.689	63.672	63.084
5	61.441	65.217	78.469
6	59.064	62.217	77.469
7	60.762	59.418	68.55
8	61.22	60.551	60.366
PROMEDIO ±DS	63.6 ± 4.51	61.9 ± 2.36	67.5 ± 6.88

Tabla 11. Parámetros espermáticos a la colección 37°C con el dilutor Bioxcell.

DILUTOR BIOXCELL			
COLECTA	MOTILIDAD TOTAL	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
1	36.8	62.069	54.506
2	38.889	62.385	52.347
3	40.271	54.222	59.402
4	36.1	64.319	58.088
5	37.118	55.721	55.093
6	40.271	54.222	59.402
7	36.8	62.069	52.347
8	37.118	55.721	55.093
PROMEDIO ±DS	37.4 ± 1.65	58.8 ± 4.24	55.8 ± 2.87



Tabla 12. Parámetros espermáticos en fase de equilibrio 5°C con el dilutor TRIS-YH.

DILUTOR TRIS-YH			
COLECTA	MOTILIDAD TOTAL	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
1	42.99	44.93	57.43
2	52.71	35.8	41.58
3	66.99	39.91	60.12
4	47.57	42.25	53.69
5	50.85	30.49	60.35
6	65.99	41.91	59.12
7	51.99	46.93	58.43
8	52.85	30.49	54.35
PROMEDIO \pm DS	54 \pm 8.38	39.1 \pm 6.24	55.6 \pm 6.19

Tabla 13. Parámetros espermáticos en fase de equilibrio 5°C con el dilutor AndroMed.

DILUTOR ANDROMED			
COLECTA	MOTILIDAD TOTAL	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
1	55.42	52.61	60.27
2	57.66	51.5	60.19
3	55.98	59.5	57.62
4	57.49	59.17	58.9
5	52.97	60.38	70.85
6	54.61	59.38	71.85
7	59.17	54.61	61.27
8	58.61	59.5	59.62
PROMEDIO \pm DS	56.5 \pm 2.12	57.1 \pm 3.58	62.6 \pm 5.53

Tabla 14. Parámetros espermáticos en fase de equilibrio 5°C con el dilutor Bioxcell.

DILUTOR BIOXCELL			
COLECTA	MOTILIDAD TOTAL	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
1	31.03	48.33	49.75
2	33.01	44.31	48.18
3	36.32	48.75	53.41
4	33.48	53.68	53.25
5	32.18	47.26	53.09
6	39.32	46.75	54.41
7	30.03	49.33	49.18
8	30.18	49.26	50.09
PROMEDIO \pm DS	33.2 \pm 3.21	48.5 \pm 2.6	51.4 \pm 2.36



Tabla 15. Parámetros espermáticos a la post-descongelación 38°C con el dilutor TRIS-YH.

DILUTOR TRIS-YH				
COLECTA	REPETICION	MOTILIDAD	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
I	1	17.11	20.72	30.1
II	1	38.57	27.05	39.8
II	2	27.43	32.56	41
II	3	31.11	39.05	39.5
III	1	36.59	84.47	46.53
III	2	32.26	23.71	42.65
IV	1	23.9	16.67	38.5
IV	2	23.89	15.81	40.89
IV	3	20.43	13.64	47.55
V	1	21.51	12.5	41.18
V	2	24.76	10.26	34.48
V	3	26.11	23.71	30.73
V	4	23.21	19.12	36.71
V	5	25.21	22.33	32.8
V	6	26	21.59	47.55
VI	1	23.9	23.72	40.65
VI	2	25.21	20.35	32.73
VI	3	25.21	16.26	30.8
VI	4	17.11	19.47	40
VII	1	36.59	21.81	31.1
VII	2	27.43	20.12	37.8
VII	3	26.11	20.47	36.5
VII	4	31.11	19.81	41.53
VII	5	23.21	22.5	38.5
VIII	1	20.43	21.72	39.8
VIII	2	21.51	19.33	40.89
VIII	3	32.26	20.72	47.55
VIII	4	23.9	20.12	36.73
PROMEDIO ±DS		26.1±5.49	23.2±13.2	38.7±5.12



Tabla 16. Parámetros espermáticos a la post-descongelación 38°C con el dilutor AndroMed.

DILUTOR ANDROMED				
COLECTA	REPETICION	MOTILIDAD	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
I	1	30.88	31.9	26.77
I	2	26.15	30.95	31.58
I	3	29.78	30.28	31.85
I	4	30.58	31.91	32.39
I	5	28.37	33.33	26.82
I	6	33.19	32	25.48
II	1	35.62	32.2	32.04
II	2	38.01	32.99	31.65
II	3	37.39	30.25	29.44
II	4	31.38	25.36	28.83
II	5	32.09	30.94	28.64
II	6	32.86	33.04	31.9
II	7	38.81	29.95	31.37
III	1	34.59	32.44	27.03
III	2	38.06	31.86	22.83
III	3	31.08	31.53	25.53
III	4	32.78	28.93	27.75
III	5	40.92	25.85	23.74
III	6	37.63	29.11	26.05
IV	1	30.28	32.74	27.24
IV	2	32.93	28.23	28.05
IV	3	33.94	31.53	32.55
IV	4	28.71	32.89	29.85
IV	5	29.96	28.33	31.43
IV	6	38.17	32.08	27.8
IV	7	31.11	29.03	29.44
V	1	25.62	31.72	29.83
V	2	32.34	28.57	30.65
V	3	32.77	32.65	32.58
V	4	27.57	34.55	28.08
V	5	30	25.42	31.33
VI	1	29.78	30.9	27.77
VI	2	28.37	29.91	30.85
VI	3	33.19	33	30.39
VI	4	37.39	31.99	29.48
VI	5	31.38	27.36	31.04
VII	1	38.81	31	30.65
VII	2	34.59	30.53	29.64
VII	3	31.08	31.74	29.03
VII	4	37.63	31.53	28.53
VII	5	33.94	29.08	30.75
VII	6	28.71	30.72	29.24
VIII	1	32.17	92.57	30.55
VIII	2	31.11	27.85	31.85
VIII	3	32.34	30.74	30.43



VIII	4	32.77	30.08	21.44
VIII	5	27.57	28.03	32.58
PROMEDIO \pm DS		32.6 \pm 3.66	31.9 \pm 9.28	29.2 \pm 2.62

Tabla 17. Parámetros espermáticos a la post-descongelación 38°C con el dilutor Bioxcell.

DILUTOR BIOXCELL				
COLECTA	REPETICION	MOTILIDAD	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
I	1	13.69	14.47	14.36
I	2	8.7	19.43	8.77
I	3	10.84	17.32	12.83
I	4	11.74	16.67	14.8
I	5	10.49	17	9.77
II	1	12.39	14.98	10.31
II	2	9.29	17.97	10.4
II	3	8.81	15.81	9.68
II	4	7.55	14.56	12.44
II	5	12	10.14	9.95
III	1	11.94	14.73	10
III	2	9.05	14.34	12.9
III	3	11.88	15.42	10.91
III	4	9.23	14.16	10.45
III	5	7.8	15.98	12.69
IV	1	10	30.99	12
IV	2	8.64	12.2	9.91
IV	3	8.87	32.3	9.09
IV	4	8.78	37.38	11.06
IV	5	7.88	16.59	10.3
V	1	7.31	16.45	11.37
V	2	6.73	14.62	9.09
V	3	9.91	16.4	9.32
V	4	9.8	16.28	10.48
V	5	8.69	14.15	11.5
VI	1	9.7	13.47	9.77
VI	2	14.5	15.32	11.83
VI	3	12.81	17.67	12.8
VI	4	11	16.98	11.31
VI	5	12.94	13.97	9.2
VII	1	12.88	16.81	11.59
VII	2	8.23	15.14	9.45
VII	3	9.64	17.42	11.69
VII	4	9.87	16.16	10.06
VII	5	10.31	15.2	9.3
VIII	1	9.73	20.3	12.09
VIII	2	10.8	21.38	9.2
VIII	3	9.78	19.59	9.48



VIII	4	9.88	19.45	8.91
VIII	5	8.8	19.4	11.09
PROMEDIO \pm DS		10.1 \pm 1.83	17.5 \pm 5.29	10.8 \pm 1.5

Tabla 18. Patrones de Motilidad espermática post-descongelación 38°C con el dilutor TRIS-YH.

DILUTOR TRIS-YH; PATRONES DE MOTILIDAD				
COLECT A	REPETICIO N	MOTILIDAD		
		PROGRESIV A	MOTILIDAD OSILATORIA	MOTILIDAD CIRCULAR
I	1	6.14	7.02	3.95
II	1	23.33	14.76	0.48
II	2	6.75	17.72	2.95
II	3	8.89	13.33	8.89
III	1	17.56	18.54	0.49
III	2	12.9	19.35	0
IV	1	7.57	14.74	1.59
IV	2	12.55	11.34	0
IV	3	5.38	12.9	2.15
V	1	12.9	8.06	0.54
V	2	10.95	13.81	0
V	3	13.27	12.83	0
V	4	6.55	16.67	0
V	5	11.34	13.87	0
V	6	10.4	15.2	0.4
VI	1	11.57	10.74	1.59
VI	2	12.34	12.87	0
VI	3	10.34	13.87	1
VI	4	6.14	7.02	3.95
VII	1	16.56	16.54	3.49
VII	2	11.75	11.72	3.95
VII	3	10.27	14.83	1
VII	4	14.89	8.33	7.89
VII	5	13.55	7.67	2
VIII	1	11.38	8.9	0.15
VIII	2	12.9	7.06	1.54
VIII	3	14.9	14.35	3
VIII	4	11.57	9.74	2.59
PROMEDIO \pm DS		11.6 \pm 3.89	12.6 \pm 3.61	1.91 \pm 2.29

Tabla 19. Patrones de Motilidad espermática post-descongelación 38°C con el dilutor AndroMed.

DILUTOR ANDROMED; PATRONES DE MOTILIDAD				
COLECT A	REPETICION N	MOTILIDAD		
		PROGRESIV A	MOTILIDAD OSILATORIA	MOTILIDAD CIRCULAR
I	1	13.82	13.36	3.69
I	2	9.23	16.15	0.77
I	3	10.67	19.11	0
I	4	4.85	25.73	0
I	5	5.58	22.79	0
I	6	6.03	27.16	0
II	1	9.44	24.89	1.29
II	2	14.48	19.91	3.62
II	3	8.26	27.83	1.3
II	4	7.53	23.85	0
II	5	10.23	21.86	0
II	6	4.23	28.64	0
II	7	7.76	28.77	2.28
III	1	11.53	21.06	2
III	2	10.33	25.74	1.99
III	3	9.35	20.94	0.79
III	4	11.83	19.56	1.4
III	5	12.23	25.82	2.87
III	6	15.54	19.24	2.86
IV	1	4.59	24.77	0.92
IV	2	2.44	28.86	1.63
IV	3	5.05	26.71	2.17
IV	4	4.46	23.27	0.99
IV	5	4.05	25.1	0.81
IV	6	9.88	28.29	0
IV	7	5.33	23.11	2.67
V	1	3.45	22.17	0
V	2	4.98	25.87	1.49
V	3	7.98	24.37	0.42
V	4	9.35	18.22	0
V	5	6.73	22.27	1
VI	1	11.67	18.11	0
VI	2	6.58	20.79	1
VI	3	8.03	25.16	0
VI	4	8.26	27.83	1.3
VI	5	7.53	22.85	1
VII	1	7.76	28.77	2.28
VII	2	10.53	22.06	2
VII	3	9.35	20.94	0.79
VII	4	15.54	19.24	2.86
VII	5	8.05	23.71	2.17
VII	6	8.46	19.27	0.99
VIII	1	9.88	22.29	0



VIII	2	6.33	22.11	2.67
VIII	3	7.98	22.87	1.49
VIII	4	7.98	24.37	0.42
VIII	5	8.35	19.22	0
PROMEDIO \pm DS		8.37 \pm 3.09	23.1 \pm 3.61	1.19 \pm 1.08

Tabla 20. Patrones de Motilidad espermática post-descongelación 38°C con el dilutor Bioxcell.

DILUTOR BIOXCELL; PATRONES DE MOTILIDAD				
COLECT A	REPETICIO N	MOTILIDAD		
		PROGRESIV A	MOTILIDAD OSILATORIA	MOTILIDAD CIRCULAR
I	1	2.07	10.37	1.24
I	2	1.93	5.8	0.97
I	3	2.46	7.39	0.99
I	4	3.44	6.39	1.91
I	5	1.58	7.72	1.19
II	1	2.75	8.26	1.38
II	2	2.21	5.75	1.33
II	3	2.07	5.18	1.55
II	4	1.89	4.72	0.94
II	5	1.5	9.5	1
III	1	2.49	8.46	1
III	2	3.02	5.03	1.01
III	3	2.97	7.92	0.99
III	4	2.05	6.67	0.51
III	5	1.95	4.39	1.46
IV	1	1.74	6.96	1.3
IV	2	1.82	5.45	1.36
IV	3	1.97	5.42	1.48
IV	4	1.95	5.85	0.98
IV	5	1.97	4.43	1.48
V	1	1.37	4.57	1.37
V	2	1.44	3.85	1.44
V	3	1.89	6.6	1.42
V	4	2.45	6.37	0.98
V	5	2.4	4.85	1.44
VI	1	2.93	5.8	0.97
VI	2	3.37	9.31	1.83
VI	3	4.07	7.18	1.55
VI	4	0.5	9.5	1
VI	5	2.49	8.46	2
VII	1	2.97	7.92	1.99
VII	2	2.05	5.67	0.51
VII	3	1.82	6.45	1.36
VII	4	1.97	6.42	1.48
VII	5	2.37	6.57	1.37
VIII	1	2.44	4.85	2.44
VIII	2	2.45	6.37	1.98



VIII	3	1.95	5.85	1.98
VIII	4	2.97	4.43	2.48
VIII	5	1.95	4.39	2.46
PROMEDIO \pm DS		2.24 \pm 0.648	6.43 \pm 1.64	1.4 \pm 0.476

Tabla 21. Valores transformados a Arcoseno de raíz de los parámetros espermáticos a la colección 37°C

TRATAMIENTO	MOTILIDAD TOTAL	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
T1	0.901	0.801	0.917
T1	0.926	0.708	0.889
T1	1.017	0.718	0.868
T1	0.886	0.859	0.863
T1	0.858	0.665	0.914
T1	1.006	0.768	0.858
T1	0.921	0.731	0.896
T1	0.919	0.786	0.873
T2	0.906	0.868	0.944
T2	0.921	0.914	0.918
T2	0.986	0.923	0.921
T2	1.010	0.924	0.918
T2	0.901	0.940	1.088
T2	0.877	0.909	1.076
T2	0.894	0.880	0.975
T2	0.899	0.892	0.890
T3	0.652	0.907	0.831
T3	0.673	0.911	0.809
T3	0.687	0.828	0.880
T3	0.645	0.931	0.867
T3	0.655	0.843	0.836
T3	0.687	0.828	0.880
T3	0.652	0.907	0.809
T3	0.655	0.843	0.836



Tabla 22. Valores transformados a Arcoseno de raíz de los parámetros espermáticos en fase de equilibrio 5°C

TRATAMIENTO	MOTILIDAD TOTAL	TEST HIPOOSMOTICO	VITALIDAD
T1	0.715	0.735	0.860
T1	0.812	0.641	0.701
T1	0.959	0.684	0.887
T1	0.761	0.708	0.822
T1	0.794	0.585	0.890
T1	0.948	0.704	0.877
T1	0.805	0.755	0.870
T1	0.814	0.585	0.829
T2	0.840	0.811	0.889
T2	0.862	0.800	0.888
T2	0.845	0.881	0.862
T2	0.861	0.878	0.875
T2	0.815	0.890	1.000
T2	0.832	0.880	1.012
T2	0.878	0.832	0.899
T2	0.872	0.881	0.882
T3	0.591	0.769	0.783
T3	0.612	0.728	0.767
T3	0.647	0.773	0.819
T3	0.617	0.822	0.818
T3	0.603	0.758	0.816
T3	0.678	0.753	0.830
T3	0.580	0.779	0.777
T3	0.582	0.778	0.786

Tabla 23. Análisis de la Varianza para motilidad total a la colección 37°C.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD TOTAL	24	0.9	0.89	5.16

Tabla 24. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para Motilidad total a la colección 37°C.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.37	2	0.19	98.96	<0.0001
TRATAMIENTO	0.37	2	0.19	98.96	<0.0001
Error	0.04	21	1.90E-03		
Total	0.41	23			

Tabla 25. Test: Tukey, para motilidad total a la colección 37°C.

Alfa=0.05, DMS=0.05452				
TRATAMIENTO	Medias	N	E.E.	
T3	0.66	8	0.02	A
T2	0.92	8	0.02	B
T1	0.93	8	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Error: 0.0019 gl: 21

Tabla 26. Análisis de varianza para el Test Hipoosmótico a la colección 37°C.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
TEST HIPOOSMOTICO	24	0.7	0.67	5.38

Tabla 27. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para el Test Hipoosmótico a la colección 37°C.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.1	2	0.05	24.82	<0.0001
TRATAMIENTO	0.1	2	0.05	24.82	<0.0001
Error	0.04	21	2.10E-03		
Total	0.15	23			

Tabla 28. Test: Tukey, para el Test Hipoosmótico a la colección 37°C.

Alfa=0.05, DMS=0.05730				
TRATAMIENTO	Medias	N	E.E.	
A	0.75	8	0.02	A
T3	0.87	8	0.02	B
T2	0.91	8	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Error: 0.0021 gl: 21

Tabla 29. Análisis de la Varianza para vitalidad a la colección 37°C.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VITALIDAD	24	0.56	0.52	5.4

Tabla 30. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para vitalidad a la colección 37°C.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.06	2	0.03	13.25	0.0002
TRATAMIENTO	0.06	2	0.03	13.25	0.0002
Error	0.05	21	2.40E-03		

Total	0.11	23
-------	------	----

Tabla 31. Test: Tukey, para vitalidad a la colección 37°C.

Alfa=0.05, DMS=0.06117

TRATAMIENTO	Medias	N	E.E.	
T3	0.84	8	0.02	A
T1	0.88	8	0.02	A
T2	0.97	8	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Error: 0.0024 gl: 21

Tabla 32. Análisis de la Varianza para Motilidad total en fase de equilibrio 5°C.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD TOTAL	24	0.81	0.8	7.13

Tabla 33. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para Motilidad total en fase de equilibrio 5°C.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.27	2	0.14	45.84	<0.0001
TRATAMIENTO	0.27	2	0.14	45.84	<0.0001
Error	0.06	21	3.00E-03		
Total	0.33	23			

Tabla 34. Test: Tukey, para Motilidad total en fase de equilibrio 5°C.

Alfa=0.05, DMS=0.06856

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
T3	0.61	8	0.02	A
T1	0.83	8	0.02	B
T2	0.85	8	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Error: 0.0030 gl: 21

Tabla 35. Análisis de la Varianza para Test Hipoosmótico en fase de equilibrio 5°C

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
TEST HIPOOSMOTICO	24	0.75	0.73	5.94

Tabla 36. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para Test Hipoosmótico en fase de equilibrio 5°C.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.13	2	0.07	31.92	<0.0001
TRATAMIENTO	0.13	2	0.07	31.92	<0.0001
Error	0.04	21	2.10E-03		
Total	0.18	23			

Tabla 37. Test: Tukey, para Test Hipoosmótico en fase de equilibrio 5°C.

Alfa=0.05, DMS=0.05744

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
T1	0.67	8	0.02	A
T3	0.77	8	0.02	B
T2	0.86	8	0.02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)
Error: 0.0021 gl: 21

Tabla 38. Análisis de la Varianza para vitalidad en fase de equilibrio 5°C

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VITALIDAD	24	0.49	0.44	6

Tabla 39. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para vitalidad en fase de equilibrio 5°C.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.05	2	0.03	10.15	0.0008
TRATAMIENTO	0.05	2	0.03	10.15	0.0008
Error	0.05	21	2.60E-03		
Total	0.11	23			

Tabla 40. Test:Tukey, para vitalidad en fase de equilibrio 5°C.

Alfa=0.05, DMS=0.06439

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
T3	0.8	8	0.02	A
T1	0.84	8	0.02	A
T2	0.91	8	0.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)
Error: 0.0026 gl: 21

Tabla 41. Análisis de la Varianza para Motilidad total post-descongelación.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MOTILIDAD TOTAL	115	0.9	0.9	8.82

Tabla 42. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para Motilidad total post-descongelación.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.84	2	0.92	491.88	<0.0001
TRATAMIENTO	1.84	2	0.92	491.88	<0.0001
Error	0.21	112	1.90E-03		
Total	2.05	114			

Tabla 43. Test: Tukey, para Motilidad total post-descongelación.

Alfa=0.05, DMS=0.02402

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
T3	0.32	40	0.01	A
T1	0.53	28	0.01	B
T2	0.61	47	0.01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Error: 0.0019 gl: 112

Tabla 44. Análisis de la Varianza para el Test Hipoosmótico post-descongelación.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
TEST HIPOOSMOTICO	115	0.34	0.33	20.57

Tabla 45. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para el Test Hipoosmótico post-descongelación.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.66	2	0.33	29.19	<0.0001
TRATAMIENTO	0.66	2	0.33	29.19	<0.0001
Error	1.26	112	0.01		
Total	1.92	114			

Tabla 46. Test: Tukey, para el Test Hipoosmótico post-descongelación.

Alfa=0.05, DMS=0.05889

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
T3	0.43	40	0.02	A
T1	0.5	28	0.02	B
T2	0.6	47	0.02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Error: 0.0112 gl: 112

Tabla 47. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para vitalidad post-descongelación.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VITALIDAD	115	0.94	0.94	6.82

Tabla 48. Análisis de la Varianza (SC tipo III) para vitalidad post-descongelación.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	2.14	2	1.07	873.39	<0.0001
TRATAMIENTO	2.14	2	1.07	873.39	<0.0001
Error	0.14	112	1.20E-03		
Total	2.28	114			

Tabla 49. Test: Tukey, para vitalidad post-descongelación.

Alfa=0.05, DMS=0.01943

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
T3	0.33	40	0.01	A
T2	0.57	47	0.01	B
T1	0.67	28	0.01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)
Error: 0.0012 gl: 112

Tabla 50. MANOVA de un factor para patrones de motilidad.

F.V.	Estadístico	F	gl(num)	gl(den)	p	
TRATAMIENTO	Wilks	0.05	130.15	6	220	<0.0001
	Pillai	1.4	85.44	6	222	<0.0001
	Lawley-Hotelling	10.51	190.93	6	218	<0.0001
	Roy	9.55	353.25	3	111	<0.0001

Tabla 51. MANOVA de un factor para patrones de motilidad Prueba de Hotelling con nivel corregido por Bonferroni

Alfa=0.05

TRATAMIENTO	MOTILIDAD PROGRESIVA	MOTILIDAD OSCILATORIA	MOTILIDAD CIRCULAR	n	Alfa=0.05
T3	0.15	0.25	0.12	40	A
T2	0.29	0.5	0.09	47	B
T1	0.34	0.36	0.11	28	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)
Error: Matriz de covarianzas común gl: 112

ANEXO B: FIGURAS

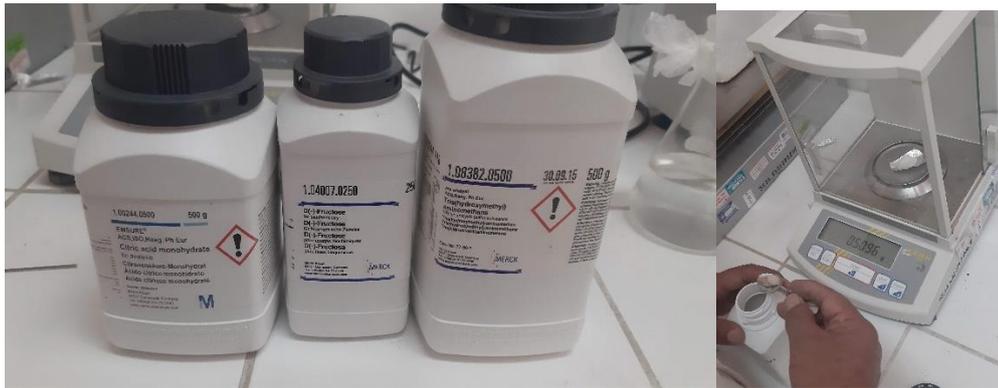


Figura 2. Pesaje de los ingredientes para la preparación del dilutor TRIS-YH



Figura 3. Obtención de la yema de huevo.



Figura 4. Homogenización de dilutor madre tris con yema de huevo



Figura 5. Centrifugado de dilutor madre tris y yema de huevo

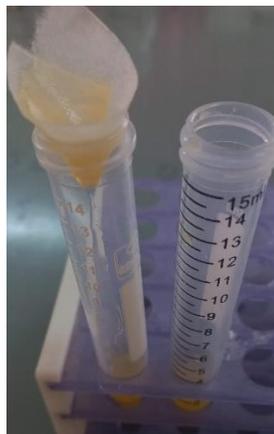


Figura 6. Filtrado del sobre nadante del dilutor madre tris más yema de huevo.



Figura 7. Baño de maría a 37°C, acondicionado en un termo donde se colocaron tubos de ensayo con dilutor y jeringas de colección.



Figura 8. Preparación del dilutor AndroMed



Figura 9. Derribo de la llama



Figura 10. Colección de las gotas de espermatozoides con una jeringa de hipodérmica adosada a un tips.



Figura 11. Enfriamiento y Fase de equilibrio a 4.5°C durante 30 minutos

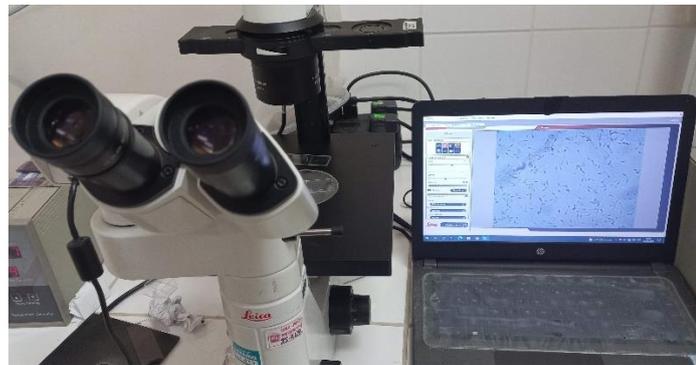


Figura 12. Evaluación de la Motilidad

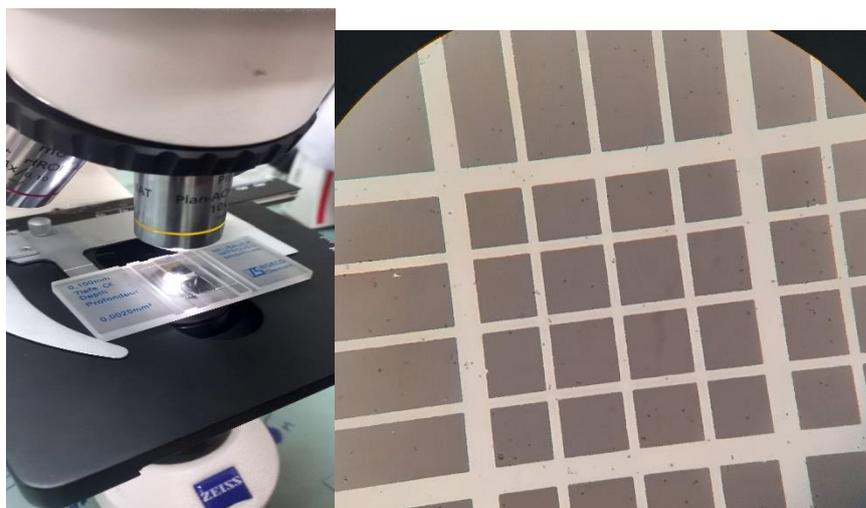


Figura 13. Evaluación de la concentración espermática

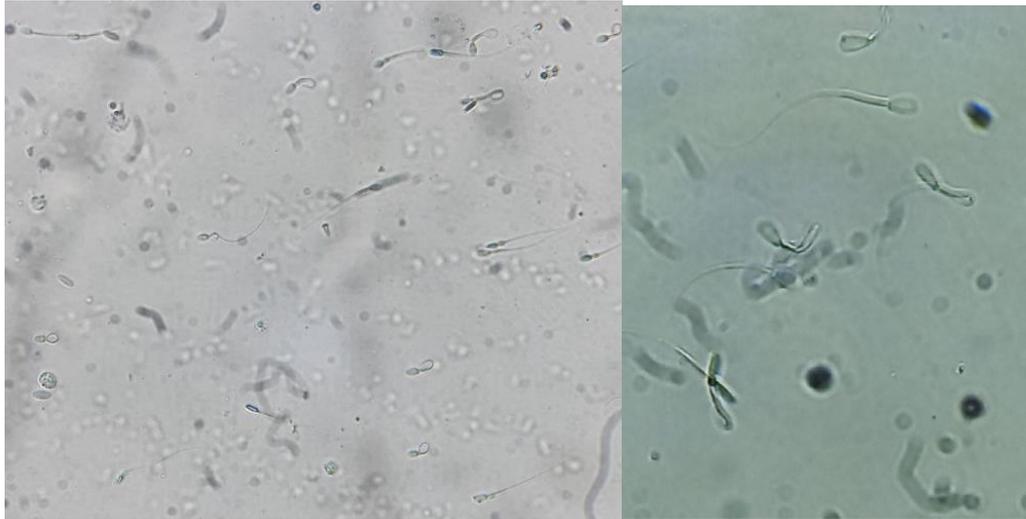


Figura 14. Evaluación de la funcionabilidad de la membrana mediante el test Hipoosmótico.



Figura 15. Evaluación de vitalidad.