

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE ZOOTECNIA



**EFFECTO DE DOS DILUTORES Y DOS MÉTODOS DE
CONGELACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES
EPIDIDIMARIOS DE ALPACA (*Vicugna pacos*) OBTENIDOS
POST- MORTEM**

Presentado por
Milagros Raquel Moina Gonzales

TESIS PARA OPTAR EL TITULO DE
INGENIERO ZOOTECNISTA

Lima, Perú

Julio 2014

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

**“EFECTO DE DOS DILUTORES Y DOS MÉTODOS DE
CONGELACIÓN SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES
EPIDIDIMARIOS DE ALPACA (*Vicugna pacos*) OBTENIDOS POST-
MORTEM”**

**Tesis para optar el Título de
INGENIERO ZOOTECNISTA**

MILAGROS RAQUEL MOINA GONZALES

Sustentado y aprobado ante el siguiente jurado

Ing. Edwin Mellisho Salas
Asesor

Ing. Próspero Cabrera Villanueva
Presidente

M.V. Germán Rodríguez Franco
Miembro

Ing. Wilder Trejo Cadillo
Miembro

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía y acompañarme cada día de mi vida.

A mis amados padres, por su inconmensurable amor, apoyo incondicional en cada etapa de mi vida y ser mis mejores ejemplos de fortaleza y valores.

A mi hermano Henry, por su nobleza, comprensión y paciencia infinita conmigo, eres el hermano más maravilloso del mundo.

A mi querido Alessandro, por todo su cariño y saber darme el aliento, la motivación y la confianza que necesitaba para poder culminar esta etapa.

A mi papá grande Ismael y mi mamita Rosa, por ser mis segundos padres, brindarme todo su amor, alegrarse y estar presentes siempre en cada uno de mis pequeños logros.

A mi buena amiga Natalia por su sincera e invaluable amistad a lo largo de todos estos años, darme aliento de forma incesante y contagiarme su enorme energía y amor por la carrera.

A todas aquellas maravillosas personas de las comunidades alto-andinas en las que trabajé y que llevo en el corazón, quienes con su ejemplo de vida sencilla, trabajo y bondad me dieron las experiencias más enriquecedoras y aleccionadoras de mi vida y que han contribuido a hacer de mí una mejor persona.

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Edwin Mellisho Salas, por brindarme la oportunidad de realizar la investigación en una especie que me apasiona, brindarme su conocimiento, comprensión y apoyo invaluable antes, durante y después del trabajo de investigación, a usted mi agradecimiento y reconocimiento infinito.

A mi amigo y compañero de tesis Martín Ramos Hidalgo, por todo el apoyo brindado durante la realización de la parte pre-experimental y experimental de la investigación.

Al Ing. Jaime Ruíz Béjar y su equipo de trabajo del laboratorio de Biotecnología de la facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional de Huancavelica, por brindarnos las instalaciones y las condiciones necesarias para poder realizar el trabajo.

Al Ing. Walther Terrel por las facilidades brindadas en la SAIS Pachacutec durante la fase pre-experimental del trabajo.

Al Biologo Hugo Gonzales Molfino de la Facultad de Biología de la Universidad Particular Ricardo Palma, por su apoyo e intercambio de experiencias durante la fase pre-experimental y experimental del trabajo

A la Srta. Sonia Lazo, por sus consejos y amistad invaluable así como por facilitarme las prácticas pre-profesionales y gracias a ello poder adquirir los conocimientos necesarios y la motivación para poder realizar el trabajo en esta fantástica especie.

A mi Alma Mater Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina por los conocimientos brindados en sus aulas y por todas las experiencias adquiridas en campo

INDICE GENERAL

	Pag.
RESUMEN	
ABSTRACT	
I INTRODUCCIÓN	1
II REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1 Anatomía reproductiva del macho alpaca	3
2.1.1 Bases anatómicas	3
2.2 Fisiología del espermatozoide	7
2.2.1 Estructura espermática	7
2.2.2 Procesos metabólicos del espermatozoide	8
2.2.3 Procesos fisiológicos del espermatozoide	11
2.3 Características seminales de la alpaca macho	14
2.3.1 Macroscópicas	14
2.3.2 Microscópicas	16
2.4 Capacidad reproductiva del macho alpaca	17
2.4.1 Monta natural	17
2.4.2 Inseminación artificial	19
2.5 Colección de semen y obtención de espermatozoides	19
2.5.1 Colección de semen con vagina artificial (VA)	19
2.5.2 Colección de semen con electroeyaculador	20
2.5.3 Obtención de espermatozoides del conducto deferente y epidídimo	21
2.5.4 Obtención de espermatozoides por absorción vaginal post-cópula	21
2.6 Criopreservación de espermatozoides	22
2.6.1 Dilutores	23
2.6.2 Crioprotectores	24
2.6.3 Curvas de congelamiento	25
2.6.4 Factores que afectan la viabilidad espermática	26
III MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1 Lugar	30
3.2 Recuperación de espermatozoides epididimarios	31
3.3 Dilución y congelación	35
3.3.1 Dilución	35
3.3.2 Congelamiento	36
3.4 Descongelamiento de espermatozoides	38
3.5 Evaluación de la viabilidad espermática	39
3.6 Diseño experimental	41
3.7 Análisis estadístico	42

IV	RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
4.1	Caracteres biométricos testiculares	43
4.2	Características de los espermatozoides recuperados	43
4.3	Viabilidad de los espermatozoides epididimarios al post-descongelamiento	44
4.3.1	Efecto del tipo de dilutor sobre la viabilidad de los espermatozoides post-descongelamiento	44
4.3.2	Efecto del método de congelación sobre la viabilidad de los espermatozoides post-descongelamiento	46
V	CONCLUSIONES	49
VI	RECOMENDACIONES	50
VII	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	51
VIII	ANEXOS	63

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la universidad Nacional de Huancavelica ubicada a 3660 msnm, y localizado en la parte centro-sur del país, en los meses de Mayo-Julio, con el propósito de evaluar el efecto de dos dilutores y dos métodos de congelación sobre la viabilidad de espermatozoides epididimarios de alpaca. Diecinueve pares de testículos provenientes de alpacas macho mayores de 3 años y alimentados al pastoreo fueron utilizados para la obtención de espermatozoides mediante técnica de desmenuzamiento del epidídimo, diluidos indistintamente con dilutores Tris-yema-glicerol y Bioxcell® y congelados mediante un método de congelación lenta- pajillas y un método de congelación rápida- pellets evaluando la viabilidad de las muestras mediante los parámetros porcentaje de motilidad, porcentaje de vivos y porcentaje de integridad de membrana después de la obtención de los espermatozoides epididimarios y al post-descongelamiento. No se encontraron diferencias significativas de la interacción de los factores tipo de dilutor y método de congelación sobre la viabilidad de los espermatozoides epididimarios, por lo que se analizó el efecto de los factores de forma individual sobre los parámetros de medición encontrándose que el dilutor Bioxcell® mantenía un porcentaje de motilidad y porcentaje de vivos post-descongelamiento (33.34% y 38%) superior en comparación al dilutor Tris-yema-glicerol (24.53% y 32.02%). Del mismo modo se evaluaron los métodos de congelación encontrándose diferencias significativas ($P < 0,05$) en los parámetros porcentaje de motilidad y vivos entre los métodos de congelación rápida-pellets (36.18% y 39.65%) y el método de congelación lenta-pajillas (21.68% 30.38%). Se concluye que de acuerdo a los parámetros de viabilidad al post-descongelamiento, el uso de dilutor Bioxcell® y el método de congelación rápida-pellet constituyen una buena alternativa para la criopreservación de espermatozoides epididimarios.

Palabras claves: Alpaca, criopreservación, espermatozoides epididimarios, dilutores, pellets, pajillas.

ABSTRACT

This present study was carried at the National University of Huancavelica located 3660 m above sea level and located in the south-central part of the country in the months of May to July. The main objective was to evaluate the effect of two semen extenders and two methods of freezing on the viability of epididymal alpaca sperm. Nineteen pairs of testicles from male alpacas over 3 years old and fed with natural grass were used to obtain sperm from the epididymis through shredding technique, each sample was diluted and cooled with Tris-yolk-glycerol or Bioxcell® and frozen by a slow freezing – straws method and a freezing fast- pellets method. Viability was assessed using the motility percentage, percentage of live spermatozoa and percentage of the integrity of the sperm membrane parameters after obtaining the epididymal sperm and post-thawing. There wasn't a significant difference between the interaction of extenders type factors and the method of freezing on the viability of epididymal sperm. We found individual effects of factors on the parameters analyzed. In relation to the extender used we found that most percentage motility and percentage of live sperm post-thaw were higher using Bioxcell® (33.34% and 38%) compared to Tris-yolk-glycerol (24.53% and 32.02%). Similarly, there were significant differences ($P < 0.05$) on freezing methods in the percentage motility parameters and percentage of live sperm among the methods of quick-freezing pellets (36.18% and 39.65%) and the slow-freezing method as straws (21.68% 30.38%). In conclusion, the research allows to indicate that according to the parameters of viability post-thawing, using Bioxcell® extender and freezing as pellets are a good alternative for cryopreservation of epididymal sperm.

Keywords: Alpaca, cryopreservation, epididymal sperm, extenders, methods freezing, straws, pellets.

I. INTRODUCCION

La crianza de alpacas es una de las actividades de mayor importancia económica para alrededor de 150 mil familias campesinas consideradas en situación de pobreza y pobreza extrema que dependen directamente de esta actividad (MINAG, 2013).

El uso de biotecnologías reproductivas como la criopreservación de semen ha permitido lograr grandes avances en el mejoramiento genético de especies domésticas de alto valor productivo como ovinos y bovinos mediante la conservación indefinida de espermatozoides viables, pero en el caso de camélidos sudamericanos los resultados han sido desalentadores debido a que su fisiología reproductiva es considerablemente diferente impidiendo obtener muestras de semen fresco de buena calidad (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Estas diferencias radican en la capacidad reproductiva del macho y sus características seminales (bajo volumen, baja concentración de espermatozoides en el eyaculado y una alta viscosidad) que dificultan la manipulación, dilución y criopreservación de las muestras de semen., limitaciones que sumado a la escasa información sobre dilutores apropiados, imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación con resultados óptimos de calidad espermática, determinando que la inseminación artificial en camélidos sudamericanos quede restringida al uso de semen fresco.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la viabilidad de los espermatozoides epididimarios al post-descongelamiento empleando dos dilutores (ris-yema-glicerol y Bioxcell®) y dos métodos de congelación (pajillas- lento y pellets -rápido) mediante los parámetros: porcentaje de motilidad progresiva, vivos y prueba de integridad de membrana (HOST); como una alternativa para trabajar con espermatozoides libres del plasma seminal

considerando que la viabilidad y capacidad de fecundación de espermatozoides del eyaculado y los espermatozoides obtenidos del epidídimo son similares, permitiendo conservar el germoplasma y creando bancos de genes para la vicuña, guanaco, y alpaca macho con alto valor genético que hayan muerto repentinamente, sirviendo además como precedente para posteriores estudios en criopreservación de semen.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 ANATOMIA REPRODUCTIVA DE LA ALPACA MACHO

2.1.1 Bases anatómicas

Testículos

En alpaca adulto los testículos normalmente son del mismo tamaño y se encuentran en la región perineal, en un escroto no penduloso sin cuello definido, formando una protuberancia sub-anal tal como sucede en el cerdo. Al nacimiento, los testículos pueden no descender al escroto, pero descenderán en el transcurso de los 6 primeros meses de edad (Fernandez- Baca, 1991).

Según Bravo *et al.* (2000a) en la adultez los testículos de alpaca pesan aproximadamente 18 gr, pudiendo alcanzar un largo de 4.8 cm y un ancho de 3.5 cm en promedio. Existe una variación considerable respecto al tamaño del testículo y el peso vivo en llamas y alpacas; el peso de cada testículo variará entre 0.02% y 0.03% del peso corporal (Hafez y Hafez, 2002).

Histológicamente el testículo de alpaca es similar a otras especies domésticas (Delhon *et al.*, 1983; Delhon y Von Lawzewitsch, 1987). Según Tibary y Vaughan (2006), existe una correlación entre el tamaño testicular y la producción espermática, más no con las estaciones, ya que no parecen afectar el tamaño de los testículos y escroto en llamas y alpaca como en el caso de las vicuñas cuyo tamaño testicular es mayor en verano que en invierno sin embargo Nuñez *et al.* (2007) reportan que existe un grado importante de la estacionalidad en la estructura microscópica del testículo de alpaca.

Schwalm *et al.* (2007), evaluaron la correlación entre un aumento de temperatura medioambiental (29°C) sobre los parámetros espermáticos e histológicos encontrando una disminución en la producción y la motilidad de espermatozoides y un aumento de espermatozoides morfológicamente anormales.

Las alteraciones testiculares en las alpacas han sido poco estudiadas en comparación a otras especies domésticas (Barrios *et al.*, 2011). Sumar (1983), en base a siete años de observaciones encontró que el 18% de una población de más de 3000 machos adultos presentaban defectos testiculares como hipoplasia (9.9%), criptorquidismo (5.7%) y ectopia (2.5%). Asimismo encontró que de 800 machos sacrificados en camal el 30.5% de los testículos presentaban dichas patologías. Estos estudios coinciden con Barrios *et al.* (2011) quienes reportan un 13.7% de alteraciones histopatológicas señalando que el problema más frecuente fue la presencia de quistes de cuyo tamaño dependerá su repercusión sobre la función testicular

Epidídimo y conducto deferente

El epidídimo de alpaca es una estructura alargada dispuesta a lo largo del borde medial del testículo, en el que los espermatozoides experimentan cambios metabólicos y estructurales para adquirir motilidad y capacidad fecundante (García, 2006). Este transporte dura entre 10 y 15 días aproximadamente dependiendo de la especie, en el caso del toro es de 10 días, en carnero y verraco 15 días, en el caballo de 8 a 11 días. En camélidos sudamericanos aún no se ha podido determinar con exactitud (Canorio, 2008).

Al igual que en otras especies animales, el epidídimo se encuentra dividido macroscópicamente en tres regiones anatómicas: cabeza, cuerpo y cola (Bravo *et al.*, 2000a). La cola del epidídimo y el conducto deferente constituyen puntos de almacenamiento de espermatozoides maduros con capacidad fecundante que se conocen como reservas extragonadales de esperma. El tiempo de almacenamiento variará de acuerdo a la especie y actividad sexual (Cunningham, 2003).

Delhon y Lawzewitsch (1987), siguiendo criterios histológicos e histoquímicos clasificaron el epidídimo de llama en 6 segmentos diferenciados con números romanos. El segmento I es corto y es el lugar donde los conductos eferentes se unen con el epidídimo. Los segmentos II y III tienen una mayor actividad mitótica y presencia de lactato deshidrogenasa. Las células epiteliales en el segmento IV contienen amilasa, y neuramidasa, el segmento V muestra una fuerte actividad ácido fosfatasa y lactosa deshidrogenasa, segmento VI presenta una moderada actividad ácido fosfatasa y alta actividad lactato deshidrogenasa así como el máximo almacenamiento de espermático.

Existen pocos informes sobre anomalías del epidídimo en camélidos. En alpacas se encontraron estructuras quísticas de 1 a 5 mm de diámetro en un 14,5% de los animales beneficiados principalmente en la cara anterior de la cabeza del epidídimo y cerca del borde ventral del testículo (Tibary y Vaughan, 2006).

El conducto deferente mide aproximadamente 40 cm en llamas y 45-50 cm en camellos, presenta dos porciones; una anterior en su inicio (2 mm), y se engrosa (4mm) cuando llega a la cavidad abdominal y termina cerca de la vejiga para formar lo que en otras especies son las ampollas o glándulas ampulares (Sumar, 1985; Bravo *et al.*, 2000a; Brown, 2000). Estas ampollas constituyen la porción glandular de los conductos deferentes y se puede considerar la presencia de un segmento ampular y de un segmento prostático o terminal (Mendoza *et al.*, 2012).

Histológicamente presenta una capa muscular dividida en dos estratos a diferencia de la mayoría de especies domésticas que presentan tres (Fernández-Baca 1991). Observaciones realizadas por Bravo *et al.* (2000a), en alpacas adultas, no revelaron un gran número de espermatozoides en la ampolla, indicando que no constituye un lugar de almacenamiento de espermatozoides como ocurre en el toro y el carnero.

Glándulas Sexuales accesoria

Las glándulas accesorias en camélidos sudamericanos están constituidas por la próstata y las glándulas bulbouretrales, no poseen glándulas vesiculares o vesículas seminales (umar, 1983). Mendoza *et al.* (2012), encontraron que en la dilatación de los conductos deferentes se observan conductos glandulares pero que no son consideradas como glándulas sexuales accesorias como sucede en otras especies domésticas.

La próstata en la alpaca tiene forma de 'H' con un diámetro transversal de 4 cm y de 1 cm de grosor, se encuentra en posición dorso lateral al cuello de la vejiga. Está formada por el cuerpo prostático que comprende dos lóbulos unidos entre sí, situados en el primer segmento de la uretra y por la porción diseminada de la próstata que penetra a lo largo de la uretra pélvica bajo el músculo uretral (Fernández-Baca, 1991; Bravo, 1995).

Las glándulas bulbouretrales o de Cowper son ovoides, pequeñas y compactas de un diámetro aproximado de 1 cm, cubiertas por una capa muscular y localizadas en la parte terminal de la uretra pélvica, a unos 7.5 cm de la próstata pudiendo ser palpadas digitalmente vía rectal. Los camélidos no presentan vesícula seminal (Bravo *et al.*, 1994).

Pene y prepucio

El pene de alpaca es fibroelástico y mide entre 35 a 40 cm en erección y la flexura sigmoidea es preescrotal (Hafez y Hafez, 2002). La punta del glande tiene forma de gancho cartilaginoso curvado (proceso peneano) ligeramente a la derecha tipo espiral y que podría ser una adaptación para facilitar la penetración del pene al cuello uterino (Fowler, 1989). Esta estructura sobrepasa a una proyección rígida llamado proceso uretral de aproximadamente 1 cm de longitud y por donde sale el eyaculado (Sato y Montoya, 1990).

El prepucio es pequeño, y cubre la porción libre del pene cuando éste no está erecto (Illera, 1994). Se encuentra en la región inguinal, 15 cm caudal al ombligo, es aplanada y vista lateralmente es de forma triangular. Al nacimiento el prepucio se encuentra adherido al

glande hasta los 2- 3 años de edad (Sumar, 1983; Tibary y Vaughan, 2006), a diferencia de otras especies donde la separación del glande del área prepucial se realiza a medida que los tejidos se van diferenciando para formar un epitelio escamoso estratificado (Sorensen, 1991).

2.2 FISILOGIA DEL ESPERMATOZOIDE

2.2.1 Estructura espermática

El espermatozoide de alpaca tiene una longitud de cabeza promedio de $6.12 \pm 0.006 \mu\text{m}$, un ancho de cabeza promedio de $3.68 \pm 0.005 \mu\text{m}$, y una longitud promedio total de $47.29 \pm 0.095 \mu\text{m}$ respectivamente. Estas dimensiones muestran que el espermatozoide de alpaca es corto y tiene la cabeza grande en proporción a su tamaño total (Palomino, 1962).

Está compuesto por 2 partes principales:

La cabeza es de forma elíptica y de acuerdo a los estudios de caracterización en la morfología de la cabeza del espermatozoide de alpaca realizados por Buendía *et al* (2002) indican que es más grande en longitud y ancho en comparación a otras especies realizando una comparación directa con el camélido dromedario, teniéndose como medidas $6.10 \mu\text{m}$ versus $5.62 \mu\text{m}$ y $3.62 \mu\text{m}$ versus $2.92 \mu\text{m}$ de longitud y ancho respectivamente, las mismas que coinciden con Ordoñez *et al.*, (2012) quienes encontraron un promedio de largo y ancho de cabeza promedio de $5.89 \mu\text{m}$ y $3.50 \mu\text{m}$ respectivamente.

En la cabeza se diferencian: acrosoma, núcleo y residuos de algunas estructuras citoplasmáticas. El núcleo es haploide y se extiende un tercio de la longitud de la cabeza, conteniendo material genético necesario para la fecundación del óvulo (Steven y Lowe, 2006).

La morfología del núcleo espermático está condicionada por las características de la cromatina altamente condensada, la mitad de AD (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico) en cantidades mucho más reducidas siendo uno de los parámetros que se relacionan con la fertilidad (Giuliano *et al.*, 2007). El capuchón acrosómico cubre entre dos

tercios anteriores de la cabeza, dividiéndose en las porciones: apical, principal y ecuatorial, conteniendo glicopéptidos, y enzimas hidrolíticas como hialuronidasa, proacrosina/acrosina, lipasas que son liberadas en el momento de la reacción acrosómica durante la fertilización (Palma, 2008).

La cola o flagelo que a su vez se divide en el cuello o pieza conectora entre cabeza y cola, la parte intermedia ha sido descrita como el motor del espermatozoide debido a que las mitocondrias se concentran en esta región, estos organelos se alinean extremo con extremo en bandas que se desarrollan en espiral para formar una hélice. Las mitocondrias contienen los sistemas enzimáticos que efectúan el ciclo de krebs, el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa produciendo la energía necesaria en forma de ATP para la movilización de los espermatozoides (Frandsen *et al.*, 2009). En la cola hay dos fibrillas centrales rodeadas de un anillo de nueve pares periféricos de fibrillas, estas son contráctiles y producen el movimiento de la cola del espermatozoide. Tanto el flagelo como la cabeza están cubiertos por la membrana plasmática que contiene un citoplasma escaso (Jiménez y Merchant, 2003).

Bravo *et al.* (1997b) reportaron que el porcentaje de anomalías en cabeza y cola de los espermatozoides de alpaca se incrementaba de acuerdo a la frecuencia de las colecciones de semen en un mismo día, sin embargo la presencia de espermatozoides anormales no varió cuando la colección se realizó con una mayor frecuencia. Según Tibary y Memon (1999), aún se desconoce el efecto de los espermatozoides anormales sobre la fertilidad.

2.2.2. Procesos metabólicos del espermatozoide

Los espermatozoides a diferencia de las células somáticas carecen de muchos de los orgánulos que participan en los procesos metabólicos, pero a pesar de ser células muy simples poseen las enzimas necesarias para realizar las reacciones bioquímicas que constituyen la glucólisis. Además experimentan procesos como los del ácido tricarbónico, la oxidación de los ácidos grasos y el transporte de electrones (Hammerstedt *et al.*, 1988).

Existen cambios significativos entre el metabolismo de los espermatozoides dependiendo de su origen, como ocurre con los espermatozoides de la cola del epidídimo que metabolizan de forma más rápida la glucosa que aquellos espermatozoides que provienen de la cabeza o del cuerpo del epidídimo, como en el morueco donde el consumo de glucosa de los espermatozoides testiculares es 7 veces menor al de los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo. También dependerá de la especie, como es el caso de los espermatozoides equinos que metabolizan rápidamente los monosacáridos como la glucosa, pero tienen capacidad muy limitada para utilizar otros azúcares o carbohidratos más complejos. (Ortiz, 2000).

La necesidad energética de los espermatozoides es suplida en 90% por los sustratos exógenos, siendo los carbohidratos la principal fuente de energía disponible y 10% restante por fuentes intracelulares como los fosfolípidos, manteniendo una producción endógena de ATP relativamente constante, sin poseer un almacenamiento de glucosa en las células espermáticas (Palma, 2008).

Para obtener energía y mantener tasas adecuadas de generación de ATP el espermatozoide dispone de dos mecanismos que van a depender del medio en que se encuentre (pH extracelular, presión de CO₂, composición del medio) así como de la actividad que esté desarrollando la célula espermática en el momento que se analiza su estatus metabólico (Allen y Slater, 1957).

Estos mecanismos son:

Glucólisis Anaerobia

La glucólisis anaerobia juega un rol fundamental en el metabolismo de los espermatozoides durante su tránsito en el epidídimo (Allen y Slater, 1957). En ausencia de oxígeno los espermatozoides eyaculados degradan principalmente carbohidratos provenientes del sustrato exógeno a través de la glucólisis en compuestos capaces de atravesar la membrana como son: glucosa, fructosa y manosa a ácido láctico y ATP (Mann, 1975).

Delhon y Lawzewitsch, (1994) detectaron actividad de la lactato deshidrogenasa a lo largo de todo el epidídimo de llama, sin embargo, la actividad más alta fue detectada en los segmentos V y VI que sería equivalente a la cola del epidídimo y que estaría directamente relacionada con el almacenaje de espermatozoides.

La glucólisis anaerobia también se realiza cuando el oxígeno presente en el plasma seminal del eyaculado sea consumido, produciendo ácido láctico. El aumento de la concentración de ácido láctico en el medio extracelular conduce a la disminución de pH la cual conduce a una reducción del metabolismo con una reducción de ATP y consecuente disminución de la motilidad (Amann y Graham, 1993)

Respiración

En presencia de oxígeno los espermatozoides pueden utilizar una variedad de sustratos resultantes de la glicólisis para producir energía, empleándose el lactato o el piruvato resultante del desdoblamiento de la fructosa para la generación de CO₂ ó H₂O como productos de desecho (Hafez y Hafez, 2002). Esta vía oxidativa que se produce en las mitocondrias, es mucho más eficiente para producir energía que la fructólisis en producir energía (Sandoval, 2005). Por medio de estos procesos catabólicos, los espermatozoides convierten la mayor fracción de su energía en ATP permitiendo el movimiento del flagelo mediante el deslizamiento de microtúbulos propuesto por Afzelius (1959). Otra parte de la energía generada se destina a mantener la integridad de los procesos de transporte activo de la membrana del espermatozoide manteniendo la concentración de los componentes iónicos vitales para la célula espermática (White, 1980).

Los espermatozoides dependen principalmente del metabolismo aerobio de la producción de ATP. Este metabolismo produce cantidades significativas de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias, que tiene un efecto adverso sobre las membranas por causar la peroxidación de los lípidos comprometiendo la integridad estructural, la motilidad y la viabilidad espermáticas,

sustancias antioxidantes presentes en el plasma seminal reducen este efecto (Santiani, 2003; Ruiz *et al.*, 2007)

La utilización de cualquiera de las dos vías para la obtención de energía por parte del espermatozoide va depender de las condiciones del medio en que se encuentre, así como de la actividad que esté desarrollando la célula espermática en el momento que se analiza su estatus metabólico (Rodríguez -Gil, 2006).

2.2.3 Procesos fisiológicos del espermatozoide

Espermatogénesis

La espermatogénesis en camélidos ocurre todo el año (Tibary y Vaughan, 2006). Es un proceso largo que se inicia con la pubertad entre los 16 y 26 meses de edad en el caso de la alpaca macho y que comprende la formación, almacenamiento y posterior expulsión de los espermatozoides (Montalvo *et al.*, 1977; Vaughan *et al.*, 2003). Nuñez *et al.* (2007) sugirieron la existencia de factores locales que determinan una baja eficiencia en la producción de espermatozoides del parénquima testicular incluso en plena estación reproducción.

La espermatogénesis se divide en 2 procesos principales: espermatocitogénesis y la espermiogénesis (Bearden y Fuquay, 1982). Dhelon y Lawzewitsch, (1987) dividen el ciclo del epitelio seminífero de la llama en 8 etapas celulares teniendo como criterio la apariencia y distribución de las células germinales.

a) Espermiocitogenesis

La espermatocitogénesis tiene dos etapas importantes:

Primera etapa, las divisiones mitóticas de las espermatogonias tipo A, que producen otras espermatogonias que no entran en el ciclo productivo del espermatozoide y que por lo tanto

mantiene la población de células indiferenciadas. Estas divisiones de las células madre son las responsables de la capacidad del macho para producir de forma continua espermatozoides durante toda su vida.

Segunda etapa, las espermatogonias tipo B, que más tarde se dividen por meiosis para producir espermatocitos primarios (Cunningham, 2003), tras una división de meiosis reduccional se producen dos espermatocitos secundarios (haploides) y luego de una meiosis ecuacional se producen dos espermatidas (haploides). Así pues el espermatozoide que eventualmente fecunda al óvulo femenino proporcionará la mitad del material genético mientras que la otra mitad será suministrada por el propio óvulo (García, 1996).

b) Espermiogénesis

La espermiogénesis es la transformación morfológica de las espermatidas esféricas en espermatidas maduras (Illera, 1994). Esto ocurre justo antes de que las espermatidas maduras se liberen a la superficie luminal como espermatozoides (Cunningham, 2003).

En la fase de Golgi, la organela del mismo nombre se acerca al núcleo, desprende vesículas que se le superponen y poco a poco se unen para convertirse en la vesícula acrosomal adhiriéndose a la envoltura nuclear. (Muñoz- Martínez *et al.*, 1997). El centriolo proximal se sitúa en la parte basal del núcleo y a partir del centriolo distal crece el axonema conformado por dos microtúbulos centrales y 9 pares de microtúbulos periféricos (Olivera *et al.*, 2006).

En la fase de capuchón, la vesícula acrosomal se aplana y se extiende sobre la mitad anterior del núcleo (Ross, 2007). El núcleo se compacta mucho más al cambiar las histonas por protaminas, de tal forma que no puede haber ni replicación ni transcripción (Fase G0 del ciclo celular). La inactividad transcripcional del núcleo hace que el espermatozoide sea dependiente de modificaciones post- transcripcionales como la fosforilación de proteínas necesarias para adaptar su función de acuerdo a las necesidades. Las fosforilaciones ocurren desde las células germinales, casi siempre en los residuos de tirosina, distinto a otras células eucarióticas en las

que la mayoría de las fosforilaciones ocurren en residuos de serina y treonina (Olivera *et al.*, 2006).

En la fase acrosomal, la espermátide se reorienta de modo que la cabeza se enclava profundamente en la célula de Sertoli y apunta hacia la lámina basal. Se depositan gránulos en el acrosoma, el citoplasma se desplaza hacia la base de la cabeza y se localiza por debajo de la unión núcleo axonema; las mitocondrias se agrupan alrededor de este último en su parte cercana núcleo, formando la pieza media. En esta fase el espermatozoide adquiere su morfología definitiva (Ross, 2007).

Maduración del espermatozoide

Está determinada por los cambios morfológicos, bioquímicos, metabólicos, y de motilidad que experimentan los espermatozoides durante su paso por el largo del epidídimo adquiriendo la capacidad de penetrar y fecundar el ovocito durante la capacitación (Jones, 1998). Estos cambios son producidos por la acción de productos segregados por el epidídimo, aquí se observan las características finales de los espermatozoides: forma de la cabeza característica de cada especie (oval y plana), cubierta en sus dos terceras partes por el acrosoma; y la cola compuesta por las piezas media, principal y terminal (Olivera *et al.*, 2006).

Delhon y Lawzewitsh (1994), observaron que los espermatozoides encontrados en la parte proximal del epidídimo de llama poseían gotas citoplasmáticas proximales las cuales migrarían a la parte terminal de la pieza media en su transcurso hacia el segmento final del epidídimo pero que aún permanecerían presentes en más del 60% de los espermatozoides perdiéndolos cuando estos ingresen a los conductos deferentes. Fábrega *et al.* (2011) sustentaron que la maduración está asociada a la desfosforilación de la cabeza de los espermatozoides y la desaparición de fosfotirocina.

Los espermatozoides de la mayoría de las especies adquieren la capacidad de movimiento durante su etapa de maduración a lo largo del epidídimo. Una vez que la maduración epididimal se ha completado los espermatozoides entran en un estado de quiescencia durante

algunos días en la cola del epidídimo. Las células epiteliales que revisten el epidídimo del toro secretan un factor de quiescencia que mantiene al espermatozoide inmóvil. En otras especies como en el verraco y la rata el estado de quiescencia es debido al efecto de una glucoproteína de elevado peso molecular llamada inmovilina la cual determina un incremento de la viscosidad del medio que impide la movilidad espermática (Garner y Hafez, 2000). El movimiento empezará después de la eyaculación en un proceso llamado activación de los espermatozoides (Olivera *et al.*, 2006). Los espermatozoides de la cabeza, en la mayoría de los mamíferos, presentan un batido vibratorio que origina movimientos circulares. En contraste, los espermatozoides de la cola del epidídimo tienen un movimiento vigoroso que determina una progresión rápida (Berford, 1975).

El epidídimo tiene la capacidad de proteger los espermatozoides de un ataque oxidativo durante su almacenamiento gracias a los antioxidantes existentes (Potts *et al.*, 1999). La mayor parte de los espermatozoides almacenados y no eyaculados se eliminan gradualmente por excreción en la orina. Aquellos que no se eliminan en la orina experimentan un envejecimiento gradual, primero pierden su capacidad fecundante luego su motilidad y por último degeneran y mueren (Muñoz *et al.*, 2006).

2.3. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE LA ALPACA MACHO

2.3.1. Macroscópicas

Viscosidad

La viscosidad es atribuida a la presencia de mucopolisacáridos segregados por las glándulas bulbouretrales y la próstata (Gárnica *et al.*, 1993), y se determina midiendo la altura (cm) del hilo viscoso encontrándose una altura promedio de 1.5 cm de un rango de 0.4 - 5 cm (Bravo *et al.*, 2000b; Quispe y Delgado, 2012).

El semen de alpaca es altamente viscoso y conforme pasan los minutos tiende a gelatinizarse atrapando los espermatozoides y disminuyendo su motilidad. Esto es una limitación para la

obtención de semen fresco debido a que durante la copula la eyaculación es continua pudiendo durar hasta 45 minutos, dificultando su manipulación tanto para la evaluación como para la dilución, limitando el contacto entre la membrana espermática y los componentes crioprotectores (Kershaw-Young y Maxwell, 2012).

Se han estudiado diferentes métodos para degelificar el semen como la adición de enzimas tales como bromelina, ficina, papaína, peptidasa, y proteasa obteniendo hasta un 95% de viabilidad y un 95% de espermatozoides in daño acrosomal (Mardonez y Delgado, 2004); en contraste con la tripsina, colagenasa, fibrinolisisina y hialurodinasa, que dañaron la parte anterior del acrosoma de los espermatozoides (Bravo *et al.*, 2000b, Giuliano *et al.*, 2007).

Por otro lado se ha probado degelificar el semen de manera mecánica absorbiendo repetidas veces el semen a través de una jeringa y la remoción de plasma, centrifugando el colectado (100 x g - 1000 x g) por 5 a 30 minutos reduciendo así en gran medida el problema de la viscosidad. (Santiani *et al.*, 2005; Mellisho, 2007).

Volumen

El volumen del eyaculado en alpacas varía en un rango de 0.8- 3.1ml (Bravo *et al.*, 2000a); siendo muy variable y dependiendo directamente de método de colección, y tiempo de descanso entre cópulas (Bravo *et al.*, 1997b).

El volumen de semen obtenido por electroeyaculación es usualmente más bajo con un promedio de 1.36 ml en comparación al volumen de semen obtenido con fundas vaginales con un promedio de 1.98 ml, (Tibary y Memon, 1999; Fernandez –Baca, 2001)

Color

El color del semen de alpaca es descrito como blanco lechoso (Fernandez-Baca y Calderón, 1966); y blanco cremoso (Gárnica *et al.*, 1993), el cual dependerá directamente de la

concentración espermática y de la proporción de secreciones de las glándulas accesorias (Bravo *et al.*, 1997a).

Motilidad

Es el parámetro más utilizado para valorar la calidad del eyaculado o dosis seminal. Bravo *et al.* (2012), encontraron valores superiores al 80% en eyaculados de alpacas mientras que Raymundo *et al.* (2006), evaluaron muestras de semen con un promedio de $54.0 \pm 8.0\%$.

En la alpaca no existe motilidad masal pero sí una motilidad individual estacionaria y oscilante debido a la alta viscosidad del semen, por lo que el movimiento de los espermatozoides es lento en comparación al del ovino o bovino. (Fernandez- Baca, 1991). Los espermatozoides aumentan su motilidad cuando el eyaculado se vuelve más líquido (Tibary *et al.*, 2005).

2.3.2. Microscópicas

pH

El pH del semen de alpaca es ligeramente alcalino, oscilando en un rango de 7.2 - 8.6, y no se ve afectado por la frecuencia de uso de los machos (Bravo *et al.*, 1997a). Medina *et al.* (2004), evaluaron machos entre 3 y 6 años reportando un pH promedio de 7.8, perteneciendo los valores más alcalinos a los animales de 3 años.

Integridad de membrana

El análisis de la funcionalidad y la integridad de la membrana espermática son cruciales para la viabilidad y capacidad fertilizante del espermatozoide (Vásquez *et al.*, 1996).

El proceso de congelación y descongelación seminal afecta considerablemente su integridad estructural y funcional modificando los parámetros de viabilidad post-descongelamiento;

debido a que un espermatozoide con la membrana plasmática afectada no es capaz de mantener las concentraciones citoplasmáticas de iones y de co-factores esenciales tales como el nucleótido adenina, imprescindible para el movimiento flagelar. (De Leeuw *et al.*, 1991; Madrid- Bury, 2004).

Existen pruebas que permiten evaluar la capacidad de la membrana plasmática a los cambios osmóticos como la prueba hipoosmótica o H₂O T (Hypoosmotic welling Test) y el test de resistencia osmótica (OR), siendo la primera más sencilla y práctica ,empleándose en la evaluación de semen de hombre, toro, perro, caballo y cerdo.(Rubio-Guillén *et al.*, 2009).

Concentración

La concentración espermática es estimada usualmente con un hemocitómetro. En alpacas varía de 30,000 hasta 150 millones/ mL (Bravo *et al.*, 1997a) encontrándose un reporte de hasta 300 millones/ mL (Gauly y Leidinger, 1996) ; tales variaciones son atribuidas a las características particulares de cada animal, método de colección de semen y número de eyaculaciones (Bravo *et al.*, 1997b; Tibary y Memon,,1999)

Giuliano *et al.* (2007) afirmaron que la estacionalidad influye en la concentración de espermatozoides, encontrándose que en verano hay un aumento de espermatozoides anormales y una disminución en la concentración total de espermatozoides de llama; señalando además que la concentración total de espermatozoides no se ve afectado por el método de colección a diferencia de lo señalado por Bravo *et al.* (1997b).

2.4. CAPACIDAD REPRODUCTIVA DEL MACHO

2.4.1 Monta natural

La duración de la cópula está determinada por el macho que está influenciado por la forma de crianza, edad, estación y frecuencia de uso (Vaughan *et al.*, 2003)

En el sistema de crianza de los Andes, hembras y macho permanecen juntos continuamente, siendo el intervalo reproductivo los meses de noviembre hasta comienzos de mayo, condicionando la parición en el intervalo de diciembre a marzo, por ello se dice que tienen una estacionalidad estival, ya que este período se caracteriza por ser lluvioso y tener mejores condiciones térmicas lo que propicia una mayor disponibilidad de pastos (San Martín *et al.*, 1968; Sumar, 1985). No obstante la estacionalidad antes mencionada, al mantener alpacas machos y hembras separadas entre sí y permitiendo un único servicio por mes, se demostró una continua actividad reproductiva durante todo el año (Fernández-Baca, 1970).

Los patrones de conducta con relación a la monta o apareamiento han sido definidos en dos fases características, el cortejo por parte del macho y la cópula que dependerán mucho de la presencia de celo por parte de la hembra, el cual no manifiesta signo físico externo, pero sí un patrón de comportamiento en presencia del macho (Vaughan *et al.*, 2003). Durante el cortejo el macho persigue aparentemente al azar a cualquiera de las hembras, intentando montarlas, protuyendo el pene y exhibiendo la rotación del glande (Tibary, 2003). Las hembras que no son receptivas rechazan los requerimientos del macho escapando y escupiendo, mientras que las hembras en celo responderán esperando el cortejo del macho y manteniéndose cerca de este o de la pareja en cópula, adoptando la posición de recumbencia esternal o de cópula (Bravo *et al.*, 2002). Al aceptar la hembra al macho se da inicio a la cópula; durante de la penetración el pene realiza movimientos rotacionales con el glande y es introducido alternadamente a ambos cuernos uterinos en intervalos irregulares (Vaughan *et al.*, 2003; Tibary y Vaughan, 2006).

Según Sumar (1983), la eyaculación es constante y de calidad uniforme desde el inicio hasta el final de la cópula sin embargo otros trabajos sostienen que la concentración, el porcentaje de espermatozoides vivos y movimiento oscilatorio aumentan conforme aumenta el tiempo de cópula (Lichtenwalner *et al.*, 1996, Bravo *et al.*, 2002).

La duración de la cópula es variable y aproximadamente de 20-25 minutos con un rango de 5 a 65 minutos no existiendo correlación entre tiempo de cópula y tasa de concepción (Fernández-Baca *et al.*, 1970; Vaughan *et al.*, 2003).

2.4.2 Inseminación Artificial (IA)

Las primeras experiencias de inseminación artificial en el Perú en camélidos sudamericanos, reportan bajas tasas de preñez de 2.4% a 38% (Calderón *et al.*, 1968; Fernández-Baca y Novoa, 1968). Investigaciones recientes de inseminación con semen fresco en alpacas han llegado a obtener un 45 % de gestación (Bravo *et al.*, 1997a) y un 55% de preñez inseminando laparoscópicamente con semen diluido en Tris tamponado (Alarcón *et al.*, 2012). Estos autores no informaron ni el volumen, ni la concentración espermática utilizada por dosis para IA. El diagnóstico de gestación fue realizado por medio de ultrasonografía 15 días después de la IA.

Los reportes de inseminación artificial con semen criopreservado obtenido por vagina artificial muestran resultados entre 25% y 15% de fertilidad en alpacas inseminadas 30 y 36 horas post-inducción de la ovulación, respectivamente (Pacheco *et al.*, 2009). Asimismo, se obtuvo una mayor tasa de preñez, cuando el depósito de semen es en el cuerno ipsilateral versus depósito en el cuerpo del útero (Apaza *et al.*, 1999).

Pérez *et al.* (2004) reportaron tasas de preñez de 36.6% en alpacas inseminadas con espermatozoides frescos obtenido de conducto deferente (vía plastía de conducto deferente), sin embargo, la tasa de preñez se reduce a 25% al ser inseminadas con semen congelado obtenido de conducto deferente. Siendo el control alpacas servidas naturalmente, que mostraron 50% de preñez. Estas investigaciones demuestran que los espermatozoides criopreservados provenientes de los conductos deferentes libres de secreciones de las glándulas accesorias, tienen capacidad fértil muy similar a los espermatozoide obtenidos por vagina artificial (Pérez *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2009).

2.5 COLECCIÓN DE SEMEN Y OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES

2.5.1. Colección de semen con vagina artificial (VA)

No existe una vagina artificial específica para colectar semen en camélidos pero si investigaciones que han adaptado la vagina artificial de vacuno y de ovino insertando una

funda de látex con mecanismos que ejercen presión en la parte distal de la vagina con la finalidad de simular la presión de la cervix así como una fuente calor mediante una manta eléctrica (Bravo *et al.*, 1997).

El volumen obtenido por VA varía en un rango de 0.2 y 7.9 ml y una concentración espermática promedio de 80.48 ± 69.35 millones/MI (Lichtenwalner *et al.*, 1996; Huanca *et al.*; 2012; Alarcón *et al.*, 2012)

Von Baer y Hellemann (1998) y Giuliano *et al.* (2007) reportaron un 80.8%, 57% y 85% de colecciones exitosas en llamas respectivamente mediante el direccionamiento del pene dentro de la vagina artificial en combinación con hembras receptoras. Aller *et al.* (2003) señalaron que la recolección de semen con VA dependerá en gran medida del alto libido de los machos, suficiente para vencer la inhibición del comportamiento sexual asociado a la presencia del hombre. Giuliano *et al.* (2007) concluyeron que los parámetros de medición varían de acuerdo a la estacionalidad y el método de colección

Bravo *et al.*, (1997a), Santiani *et al.* (2005) y Raymundo *et al.* (2006) reportaron el uso de vagina artificial envuelto con una manta eléctrica dentro de un maniquí de alpaca en posición de cópula. Bravo *et al.* (2000a) sostienen que el uso de la VA con maniquí es un método más natural y seguro en comparación a otros y que la única dificultad radica en el entrenamiento de los machos pero cuando estos aceptan el maniquí, el tiempo de cópula es similar al de un macho que deposita semen en el tracto reproductor de una hembra.

2.5.2 Colección de semen con electroeyaculador

Fernandez Baca y Novoa (1968) han realizado estudios utilizando el electroeyaculador de carnero con varios niveles de tranquilizante y anestesia en llamas, alpacas y vicuñas. La respuesta al estímulo eléctrico variará de acuerdo al animal, en la llama la erección durante la electroeyaculación es posible. Según Fernandez- Baca (1991), este método ofrece ventajas sobre las fundas y esponjas al obviar el uso de hembras en celo, acortar el tiempo de colección y ser aplicable en cualquier época del año sin embargo en muchos casos el volumen del

eyaculado es excesivamente diluido y de mala calidad contaminado con orina y restos celulares (Tibary y Vaughan, 2006; Gonzales, 2008).

2.5.3 Colección de semen por aspiración vaginal post- cópula

Este método consiste en utilizar alpacas hembras vacías, sin infecciones uterinas y sexualmente receptivas para posteriormente ser empadradas por un macho entero y proceder a colectar el semen con ayuda de un espéculo, permitiendo obtener semen con una concentración y volumen promedio de 72.5 millones/ ML y 3,6 ml respectivamente siendo este de mejor calidad y menor viscosidad en comparación al semen colectado por VA (Alarcón *et al.*, 2012).

2.5.4. Obtención de espermatozoides del conducto deferente y epidídimo

Los espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo tienen la capacidad de fertilizar poco tiempo después de la muerte del animal, pudiendo ser congelados para su posterior uso en inseminación artificial (Barrios, 2002).

Algunas técnicas de obtención de espermatozoides epididimarios son la del lavado con flujo retrógrado, el cual consiste en inyectar una solución a través de los conductos deferentes por medio de una aguja fina para una mayor obtención de espermatozoides vivos de epidídimo (Gonzales, 2008). Obtención de espermatozoides directamente de la cola del epidídimo descrito por Morton *et al.* (2007), mediante la técnica del desmenuzamiento que consiste en realizar secciones pequeñas para posteriormente dejarlos en una suspensión de 1 ml de PBS a 37°C; y el método descrito por Santiani (2012), quien procesó espermatozoides epididimarios separando los epidídimos de los testículos, diseccionándolos y manteniéndolos en suspensión en PBS para posteriormente prensarlos suavemente y lograr la expulsión de los espermatozoides de los conductos epididimarios.

2.6. Criopreservación de espermatozoides

La criopreservación es una técnica que consiste en congelar tejidos y células a muy bajas temperaturas manteniendo a las células en animación suspendida pudiendo retener su viabilidad y procesos metabólicos indefinidamente (Canorio, 2008).

Uno de los mayores inconvenientes que se presenta al trabajar el eyaculado de alpaca es la consistencia viscosa del semen que dificulta la dilución (Mellisho, 2007); existiendo un solo reporte de criopreservación de semen en alpacas alcanzando alrededor de 20% de motilidad y espermatozoides con acrosoma intactos (Santiani *et al.*, 2005), mientras que en llamas se encuentran las investigaciones realizadas por McEvoy *et al.* (1992) con un 10% de motilidad, Aller *et al.* (2003) alrededor del 20% y Von Baer y Hellemann (1999) con una tasa de motilidad espermática post-descongelamiento alrededor del 28.2% respectivamente (ver anexo 1).

Se han realizado estudios en criopreservación de espermatozoides epididimarios reportados por Morton *et al.* (2010); Rodríguez (2009); Banda *et al.* (2010), Terreros *et al.* (2012), Choez *et al.* (2013) que alcanzan parámetros de motilidad e integridad de membrana de alrededor del 30% y 80%. (Ver anexo 2).

También se ha probado congelar semen en forma de pellet Canorio y Valdivia (2007) congelaron espermatozoides epididimarios diluyendo medio citrato- yema utilizando DMSO, DMA, glicerol y propilen glicol en diferentes concentraciones obteniendo un mejor resultado al utilizar DMA con resultados de 34.42% de motilidad espermática y 55% de vitalidad mientras que Morton *et al.* (2007), congelaron espermatozoides epididimarios diluyendo en Tris, citrato y lactosa utilizando glicerol como crioprotector permeante. A pesar de estos resultados a la fecha no se ha reportado estudios que nos permitan señalar la factibilidad de congelar semen de camélidos.

2.6.1 Dilutores

Los dilutores de semen para criopreservación están compuestos por diferentes sustancias cuyas funciones son: a) proveer nutrientes como fuente de energía b) proteger los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento, c) mantener un adecuado equilibrio del pH, d) mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico, e) inhibir el crecimiento bacteriano, f) incrementar el volumen de semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones y g) proteger a los espermatozoides durante el congelamiento (Hafez y Hafez 2002).

Tris

Contiene tris- [hidroximetil] aminometano ($C_4H_{11}NO_3$), conocido como tris se emplea en la criopreservación de semen de diferentes especies como toro, cerdo, ovinos, caprinos entre otros. Es una sustancia orgánica, de aspecto cristalino, su peso molecular es de 121.14 g/L., que posee la particularidad de formar soluciones acuosas y sistemas reguladores de la concentración de iones de hidrógeno. Posee una constante de disociación básica, tal que en una solución de 50 mM de Tris corresponde a un pH de 10.4, el cual protege a los espermatozoides de cambios de pH por este motivo para ser utilizado en la criopreservación de semen requiere estar asociado con el ácido cítrico (Anduaga, 1980; Sandoval, 2005).

Bioxcell® (IMV, France)

Bioxcell® es un dilutor, cuya fórmula sin proteína (de derivado animal), elimina el riesgo sanitario asociado al uso de leche o yema de huevo, para la dilución final del semen de bóvidos, contiene una mezcla de antibióticos como Lincomycin, Spectinomycin, Gentamycin y Tylosin. Debido a la ausencia de proteínas de origen animal, Bioxcell® es muy claro después de la dilución. Esto facilita la evaluación del semen al microscopio.

2.6.2. Crioprotectores

Los crioprotectores son compuestos químicos incorporados a los dilutores que ayudan a la célula a sobrevivir durante el proceso de criopreservación reduciendo los daños ocasionados por los cambios osmóticos en la membrana celular producto de la entrada y salida del agua, permitiendo mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrólitos, ocasionando un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides (Holt, 2000; Stornelli *et al.*, 2005).

Los mecanismos por los que estas moléculas ejercen una acción crioprotectora no son bien conocidos. Por un lado tienen un efecto osmótico, aumentando la osmolaridad intracelular al penetrar en la célula y disminuyendo el punto de congelación y la probabilidad de hielo intracelular. Además al entrar en disolución la concentración de electrolitos intracelulares, es proporcionalmente menor reduciéndose el riesgo de lisis celular. También disminuye la formación de hielo intra y extracelular ya que al encontrarse en disolución dificulta la agregación de moléculas de agua que además bajan proporcionalmente su concentración y aumentan la viscosidad del medio extracelular reduciendo la movilidad molecular y disminuyendo así la formación de cristales de hielo (Muiño, 2007)

En la actualidad se conocen diferentes compuestos que contienen moléculas crioprotectoras que se diferencian unos de otros por la capacidad de penetrar en los tejidos y por su grado de toxicidad sobre células vivas; a los permeables o intracelulares, que son compuestos de molécula pequeña capaces de penetrar la membrana plasmática y evitar la formación de cristales de hielo producidas por la congelación lenta, pertenecen el DMSO, metanol, etilenglicol, 1,2 propanodiol, butanodiol, acetamidas, glicerol. A los crioprotectores extracelulares o no penetrantes que son moléculas de alto peso molecular y de mayor tamaño que no transpan la membrana plasmática pertenecen proteínas y lipoproteínas como la yema de huevo, leche y suero sanguíneo además de azúcares como fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa, rafínosa, metilcelulosa y ficoll (Sandoval, 2005; Holt, 2000).

El glicerol es considerado el crioprotector con mejores resultados en diferentes especies animales sobretodo en toro (Holt, 2000), siendo utilizado rutinariamente en combinación con rafinosa para congelar semen de camello (Zhao, 2000). En alpacas, Santiani *et al.* (2005) y Aller *et al.* (2003), obtuvieron un 12.7%, y 32.4% de viabilidad post-descongelamiento al utilizar glicerol en combinación con un dilutor en base a leche descremada y dilutor citrato respectivamente. También se ha reportado el uso de etilenglicol como agente crioprotector, permitiendo una tasa de motilidad post-descongelamiento del 20% (Santiani *et al.*, 2005).

2.6.3 Curvas de congelamiento

Las curvas de congelamiento se pueden clasificar de acuerdo a la velocidad de congelación y descongelación.

Curva de congelamiento lento, requieren un congelador programable mediante un programa informático, capaz de realizar un descenso lento y muy controlado de la temperatura, hasta alcanzar la deseada de acuerdo al protocolo de ejecución. Existen los protocolos de congelación lenta– descongelación rápida y congelación lenta con descongelación lenta (Boiso, 2001).

Curva de congelamiento rápido, incluyen la congelación ultrarrápida y vitrificación, la técnica de vitrificación consiste básicamente en la utilización de una solución altamente viscosa que, al ser enfriada, aumenta su viscosidad hasta alcanzar la consistencia de un vidrio; posee la gran ventaja de que no se producen daños celulares causados por la formación de cristales de hielo extracelular. Los métodos que utilizan bajas concentraciones de crioprotectores son los denominados “ultra-rápidos“ y normalmente las pajuelas ó containers, son sumergidas directamente en Nitrógeno líquido partiendo de 0 grados centígrados en un primera fase en la que se vaporizan con Nitrógeno líquido antes de la inmersión (Trounson, 1986).

2.6.4 Factores que afectan la viabilidad espermática

Diversos factores están implicados en la reducción de la viabilidad de los espermatozoides logrados mediante el uso de semen congelado en comparación del semen fresco tales como:

Efectos deletéreos de los agentes crioprotectores

Se ha demostrado que la presencia de agentes crioprotectores pueden provocar toxicidad en la membrana plasmática y en el metabolismo del espermatozoide (Hammadeh *et al.*, 2001). La toxicidad de los crioprotectores permeantes va estar influenciada por el origen de los gametos habiéndose demostrado diferentes grados de toxicidad entre espermatozoides epididimarios y eyaculados en ungulados salvajes, afectando la movilidad y viabilidad más no la tasa de espermatozoides con acrosoma intacto (Ortíz, 2000).

Los procesos de criopreservación inducen la formación de especies reactivas de oxígeno las cuales poseen efectos tóxicos sobre las células sometiéndolas a estrés durante todo el proceso de congelación y comprometiendo su funcionabilidad (Stornelli *et al.*, 2005).

La tolerancia a determinados crioprotectores como el glicerol varía entre especies. Para congelar espermatozoides de toro, morueco y caballo, se utilizan concentraciones comprendidas entre el 4 y el 9% (Watson, 1990), pero para el espermatozoides de marsupiales es necesario emplear cerca de un 20%, en otros, en casos como el verraco, no es recomendable incluir más de un 3% (Holt, 2000). En el caso de alpaca, Morton *et al.* (2010) probaron el dilutor lactato con diferentes porcentajes de glicerol obteniendo un mejor resultado al adicionar 4% de glicerol.

Tasa de congelación y descongelación

La velocidad del enfriamiento puede determinar un mayor o menor efecto de la congelación sobre la viabilidad espermática. A medida que la tasa de congelamiento aumenta, la probabilidad de que el hielo intracelular pueda formarse también aumenta. Para cada célula

hay una óptima tasa de enfriamiento y descongelamiento la cual depende de varios factores particularmente del volumen celular y la composición de membrana (Holt, 2000).

Existe el daño por enfriamiento lento donde la tasa de enfriamiento óptima depende del tipo de célula y la tasa de calentamiento para descongelar la célula. Los estudios indican que el factor más influyente en la tasa óptima de enfriamiento es la permeabilidad de la membrana celular, que es una medida de cómo el agua puede moverse rápidamente dentro y fuera de la célula a través de la membrana celular (Fowler y Toner, 2005)

Durante el congelamiento la formación de hielo extracelular causa un incremento en la osmolaridad extracelular tan pronto como se forme fuera de la célula, en la solución, esta comienza a deshidratarse, si la célula de la membrana es altamente permeable al agua la solución intracelular mantendrá un equilibrio osmótico con la solución extracelular a medida que la temperatura siga cayendo y mas hielo se forma progresivamente (Muiño, 2007).

El daño por enfriamiento rápido ocurre cuando el semen es enfriado entre 30 y 0 °C induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Este hecho se relacionaría con un cambio de fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana evidenciando que el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de crioinjuria observadas durante el calentamiento celular luego de la descongelación (Holt, 2000; Stornelli *et al.*, 2005)

El proceso de congelación y descongelación induce ciertos daños en el acrosoma, concretamente en la actividad de la enzima amilasa, traduciéndose en alteraciones de la permeabilidad de los acrosomas no detectadas por estudio microscópico (De Las Heras *et al.*, 1996).

Estrés osmótico

El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios de presión osmótica de la fracción no congelada (Stornelli *et al.*, 2005). Cuando las células son congeladas y descongeladas son sujetas a estrés producto de la deshidratación e hidratación produciendo cambio de volumen, estos cambios de volumen están asociados a cambios de concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extracelulares (Holt, 2000; Stornelli *et al.*, 2005).

Según Gao *et al.* (1993) el daño osmótico resulta de una pérdida en la integridad de membrana como consecuencia de la contracción severa de la célula espermática expuesta a una solución hiperosmótica

El estrés osmótico se produce a consecuencia de la penetración del crioprotector en la célula, lo que depende del grado de permeabilidad de la membrana a dicha sustancia. La severidad de este efecto osmótico, parece estar relacionada con la temperatura a la que se añade. En ciertas ocasiones, para reducir el daño del mismo, se recomienda la adición del crioprotector por etapas (Watson, 1995).

Daños espermáticos

La reducción de la capacidad fecundante está relacionada a dos razones puntuales, una baja viabilidad post-descongelamiento y un trastorno subletal en una proporción de espermatozoides sobrevivientes (Watson, 2000).

Se ha comprobado que la motilidad espermática disminuye luego de la criopreservación. En tanto que una pequeña parte de la población celular exhibe un movimiento progresivo vigoroso, la mayoría de las células muestran un variable grado de alteración de la motilidad en comparación con la motilidad del semen fresco que posiblemente pueda estar íntimamente

relacionado con la pobre capacidad fecundante del semen congelado (Canorio y Valdivia, 2007).

Los cambios de temperatura inducen a que los espermatozoides se comporten como si se capacitaran. Los espermatozoides enfriados muestran un aumento del calcio libre intracelular así como coloración con clortetraciclina, cambios típicos de la capacitación, sin embargo los patrones de fosforilación de tirosina son diferentes en espermatozoides enfriados y recalentados. (Stornelli *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que los procesos de criopreservación inducen a la formación de especies reactivas de oxígeno las cuales poseen efectos tóxicos sobre las células y comprometen su funcionalidad (Aitken y Clarkson, 1987). Diferentes antioxidantes han sido usados como parte de variados diluyentes en distintas especies y se ha verificado el efecto benéfico de los mismos. Sin embargo no debe olvidarse que el daño oxidativo es solo uno de los diferentes factores de estrés al que es sometido el espermatozoide (Holt, 2000).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar

El presente estudio se realizó en el laboratorio de biotecnología reproductiva ubicado en la ciudad universitaria Paturtampa de la Universidad Nacional de Huancavelica situado en el distrito de Huancavelica, provincia y departamento de Huancavelica ubicada a 3660 msnm y localizado en la parte centro-sur del país, entre las coordenadas 10°58' y 14°08' de latitud Sur; 74°16' y 75°47' de longitud Oeste durante los meses Mayo-Julio del 2008 (Ver figura 1 y 2).



Figura 1. Vista panorámica del campus universitario de la Universidad Nacional de Huancavelica. Provincia y departamento de Huancavelica



Figura 2. Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Nacional de Huancavelica, Provincia de Huancavelica.

3.2 Recuperación de espermatozoides epididimarios

Se realizó un experimento previo con la finalidad de determinar el método de obtención de espermatozoides epididimarios más idóneo a emplearse en el presente estudio que consistió en evaluar la concentración espermática de 5 pares de testículos provenientes de alpacas macho adultos mayores a 3 años de edad, mediante dos técnicas de obtención: a) Desmenuzamiento del epidídimo y b) Lavado con flujo retrógrado.

El procedimiento para la obtención de espermatozoides por desmenuzamiento del epidídimo consistió en suspender de forma excluyente cada epidídimo en 3 ml de dilutor (Tris- yema) temperado a 37 °C, seccionándolos varias veces con un bisturí № 10 y ejerciendo presión con las pinzas planas con la finalidad de obtener espermatozoides de los conductos (Morton *et al.*, 2007; Canorio, 2008; Banda *et al.*, 2010). Mientras que el procedimiento de obtención de espermatozoides epididimarios por medio de flujo retrógrado consistió en colocar el conducto deferente en posición vertical e inyectar por la luz del conducto (jeringa de

tuberculina y aguja N° 0.50 x 16 mm.) 1 ml de dilutor (Tris- yema o dilutor Bioxcel®) temperado a 37 ° realizándose la remoción de los espermatozoides por presión (Gonzales, 2008).

Siendo el procedimiento en detalle la que se muestra en las figuras 3, 4 y 5

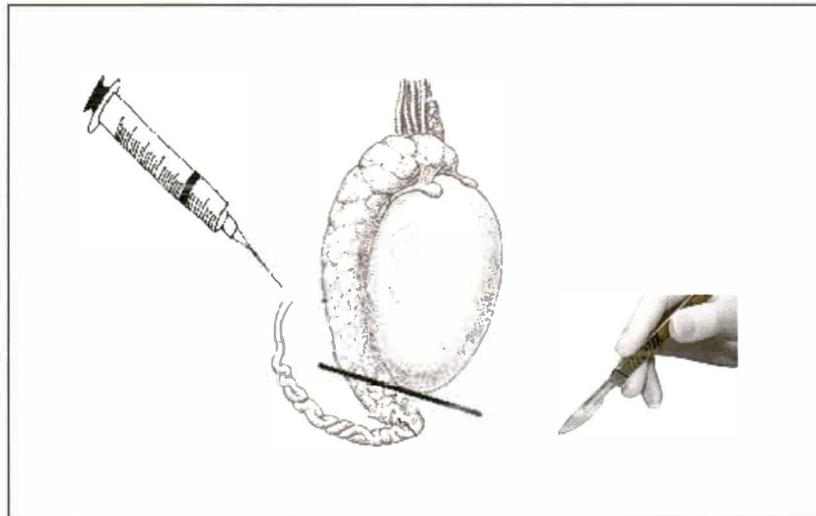


Figura 3. Gráfica de corte a nivel de la cola del epidídimo

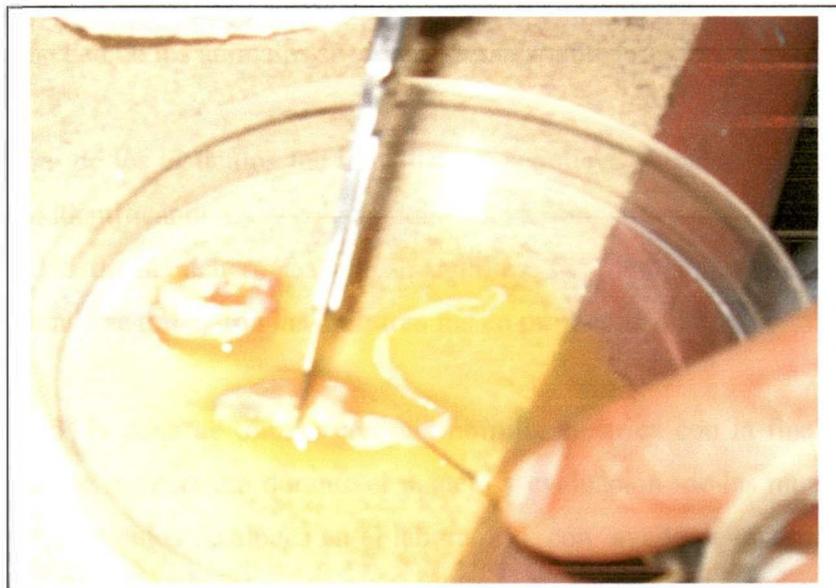


Figura 4. Obtención de espermatozoides mediante desmenuzamiento de epidídimo

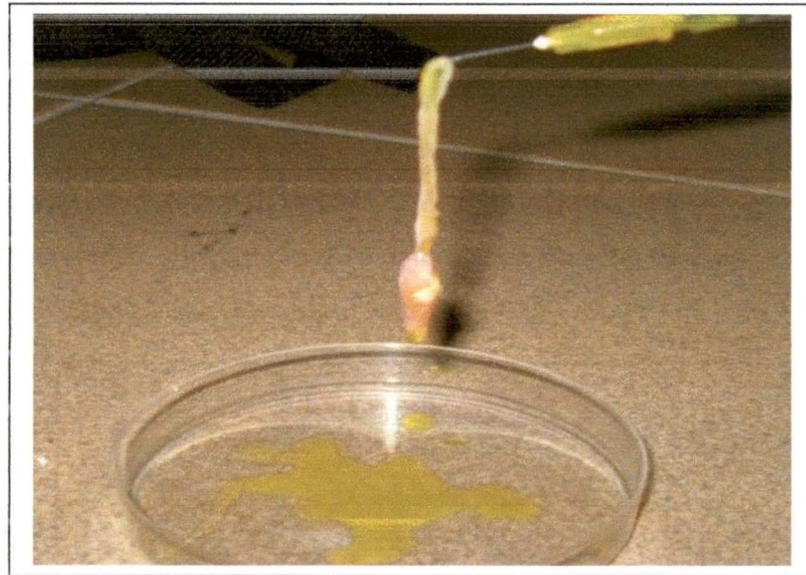


Figura 5. Obtención de espermatozoides mediante método de flujo retrógrado

Una vez determinado el método de obtención de espermatozoides a emplearse se inició la fase experimental del estudio, en donde los espermatozoides utilizados provinieron de la cola del epidídimo de 19 alpacas macho mayores de 3 años alimentados al pastoreo y beneficiados en el camal municipal de la ciudad de Huancavelica, Provincia Huancavelica (Figura 6). La edad de los animales se determinó mediante erupción dentaria.

La recolección de los testículos fue inmediata al beneficio, separando cada par en bolsas de polipropileno, identificándolos y colocándolos posteriormente dentro de un termo hermético con la finalidad de mantener las muestras tibias. El tiempo transcurrido del camal al laboratorio donde se trabajaron las muestras fue en promedio 3 horas.

Se acondicionó la zona de trabajo con una hornilla eléctrica con la finalidad de evitar un cambio brusco de temperatura durante el manejo y evaluación de las muestras. Una vez que se tuvieron los testículos de alpaca en el laboratorio, con ayuda de una pinza plana, y bisturí N°10 se procedió a separar la cola del epidídimo de sus respectivos testículos colocándolos sobre una placa Petri estéril pre-calentada previamente a 37°C para luego proceder a la obtención de los espermatozoides por método de desmenuzamiento.

Una vez obtenida la suspensión conteniendo los espermatozoides epididimarios, se colocó en un tubo de vidrio seco y estéril, dejándose reposar en baño maría a 37° C por un espacio de 30 minutos con la finalidad de activar el movimiento espermático, para posteriormente realizar las evaluaciones respectivas de porcentajes de motilidad progresiva, espermatozoides vivos, e integridad de membrana plasmática mediante la prueba de HOST (Hypoosmotic Swelling Test) (Jeyendran *et al.*, 1984) (Ver figuras 6,7 y 8).



Figura 6. Centro beneficio de alpacas, Provincia y departamento de Huancavelica

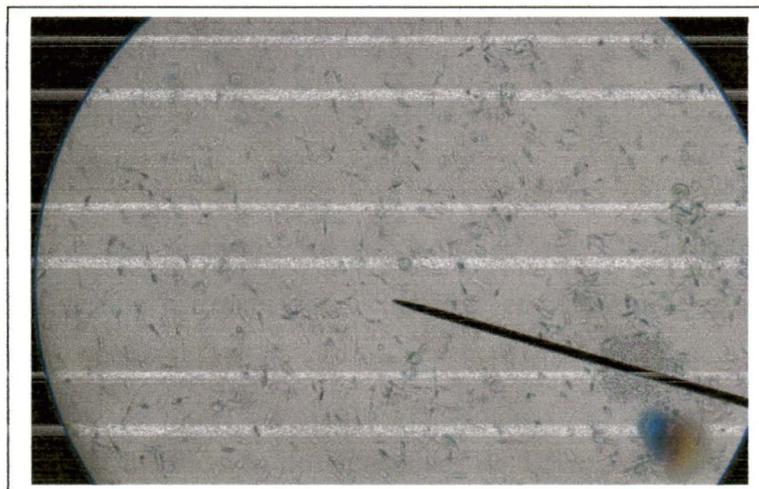


Figura 7. Evaluación del porcentaje de motilidad espermática



Figura 8. Evaluación inicial de porcentaje de vivos mediante frotis de tinción eosina y nigrosina

3.3 Dilución y Congelación

3.3.1 Dilución

La criopreservación de los espermatozoides epididimarios se realizó con dos tipos de dilutores: Tris- yema- glicerol y Bioxcell ®

a) Tris- yema- glicerol

El contenido del dilutor Tris-yema-glicerol fue: 3.634 gr Tris, 1.99 gr ácido cítrico, 0.50 gr glucosa, 20% yema de huevo fresco, 6% de glicerol en 100 ml de agua bidestilada csp. modificado de Evans y Maxwell (1987).

El dilutor Tris-yema fue dividido en dos fracciones de 1.5 ml cada una. Una sin glicerol (fracción A) llevada a baño maría a 37 °C y con la que se obtendrán los espermatozoides epididimarios y otra a la que se adiciona el agente crioprotector glicerol (fracción B).

La suspensión que contiene los espermatozoides epididimarios se coloca en un tubo de vidrio estéril sumergido en un beacker con agua temperada a 37°C, llevándose a refrigeración por un espacio de 2 horas para que inicie el descenso gradual de la temperatura hasta llegar a 5 °C, descendiendo en promedio 0.5 °C por minuto, luego del cual se procedió a adicionar lentamente un tercio de la solución B (0.5 ml) cada 10 minutos, dejando reposar finalmente otros 10 minutos más para equilibrar la dilución y proceder a la congelación.

b) Bioxcell ®

Para la preparación de Bioxcell® (IMV, Francia) se requiere utilizar una dilución en proporción 1:4 (20 ml de Bioxcell® concentrado: 80 ml de agua bidestilada) para posteriormente llevarlo a baño maría con una temperatura de 37°C.

Los espermatozoides que fueron colectados con 1 ml de Bioxcell y temperados a 37°C fueron diluidos adicionalmente con 2 ml de Bioxcell temperado (37°C), procediéndose a descender la temperatura gradualmente dentro de un Beaker de 200 ml con agua temperada a 37°C. y llevándolo a refrigeración por espacio de dos horas hasta llegar a 5°C adicionando 30 minutos más como tiempo de equilibrio, para luego proceder a realizar la congelación.

3.3.2 Congelamiento

La congelación se realizó usando dos métodos de congelación uno rápido (Pellets) y otro lento (Pajillas).

a) Congelado rápido- pellets

El congelamiento en pellets fue realizado con un bloque de hielo seco sólido (-79°C) de superficie lisa, en el cual se moldearon agujeros en su superficie con cabezas de clavos de acero inoxidable adheridos a una plancha de madera y luego lavados con Tris o Bioxcell.

Con ayuda de una micropipeta se colocaron alícuotas de solución en volúmenes de 0,25 cc de forma rápida y sucesiva en los agujeros del bloque de hielo seco, tratando de que el tiempo transcurrido entre el goteo de la primera pastilla y la última no supere el minuto.

La dilución permaneció en los agujeros de hielo seco hasta que la superficie de los pellets se opaque por un espacio de 2 a 3 minutos, tiempo aproximado entre el vaciado de la primera alícuota y el congelado de la última, para luego ser sumergidos en nitrógeno líquido (-196°C) siendo finalmente almacenados dentro de un tubo Falcom, el cual se identificó y colocó dentro de una canastilla para finalmente ser almacenado en el tanque criogénico. (Figura 9).



Figura 9. Congelamiento de espermatozoides epididimarios en pellets de 0.25 ml.

b) Congelado lento- pajillas

Los espermatozoides diluidos y equilibrados (5°C) fueron envasados en pajillas de plástico de 0,25 ml (Cassou - IMV, France) y selladas con alcohol polivinílico.

El proceso de congelamiento consistió en colocar una rejilla metálica dentro de una caja de tecnopor de 25 x 20 x 15cm. de largo x ancho x alto, vertiendo nitrógeno líquido dentro de la

caja de manera que la altura entre el nivel de nitrógeno líquido ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) y la superficie de la rejilla metálica sea de 6 cm, Luego de esto se procedió a colocar las pajillas sobre la superficie de la rejilla metálica exponiéndolas al vapor del nitrógeno líquido y tapando herméticamente la caja por espacio de 10 minutos para que se congelen. Después de este tiempo las pajillas fueron sumergidas dentro del nitrógeno líquido, para luego ser identificadas y almacenadas en las canastillas del tanque criogénico. (Ver figura 10).



Figura 10. Congelamiento de espermatozoides epididimarios en pajillas de 0.25 MI.

3.4. Descongelamiento de espermatozoides

Cada pellet fue retirado del tanque de nitrógeno para colocarlo posteriormente en un tubo Falcom a 37°C en baño maría entre 1-2 minutos, hasta su completa descongelación.

Las pajillas fueron extraídas del tanque de nitrógeno para ser sumergidas en baño maría a 37°C por 30 segundos sujetándolas firmemente por el extremo donde se encuentra el alcohol polivinílico, para luego vaciar el contenido en un tubo Falcom sumergido en baño maría a 37°C . (Gonzales, 2008)

Se descongelaron a una temperatura de 37°C debido a que el descongelamiento lento con una temperatura más baja produce la revitrificación de cristales de hielo disminuyendo la viabilidad espermática, en bovinos se descongela con temperaturas menores a 37°C para prevenir el shock térmico (Correa *et al.*, 1996)

3.5. Evaluación de la viabilidad espermática

Las variables estudiadas fueron la motilidad progresiva, porcentaje de espermatozoides vivos, e integridad de membrana. Realizándose inmediatamente después del descongelando de las muestras.

a. Porcentaje de Motilidad

La motilidad individual se evaluó colocando 10 µl de muestra espermática sobre un portaobjeto seco y temperado a 37°C y cubierto con una lámina cubreobjetos para después ser observada al microscopio óptico a 100X calculándose el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva de 0 a 100% (Sorensen, 1991).

b. Porcentaje de Vivos

El porcentaje de espermatozoides vivos, se basa en el principio de que los espermatozoides muertos dejan ingresar colorantes como eosina. El proceso se inició colocando sobre un portaobjeto 10 µl de dilución, 10 µl de eosina y 10µl de nigrosina, con ayuda de una micropipeta, y mezclando posteriormente. La mezcla se dispersó usando otro portaobjetos y realizando un frotís a lo largo del porta objetos. Se dejó secar y luego se observó en el microscopio a 400X, diferenciando cabezas de espermatozoides claros o teñidos de rosado. Se deberá examinar un total de 200 espermatozoides y determinar la cantidad de espermatozoides claros como vivos (Colas, 1980).

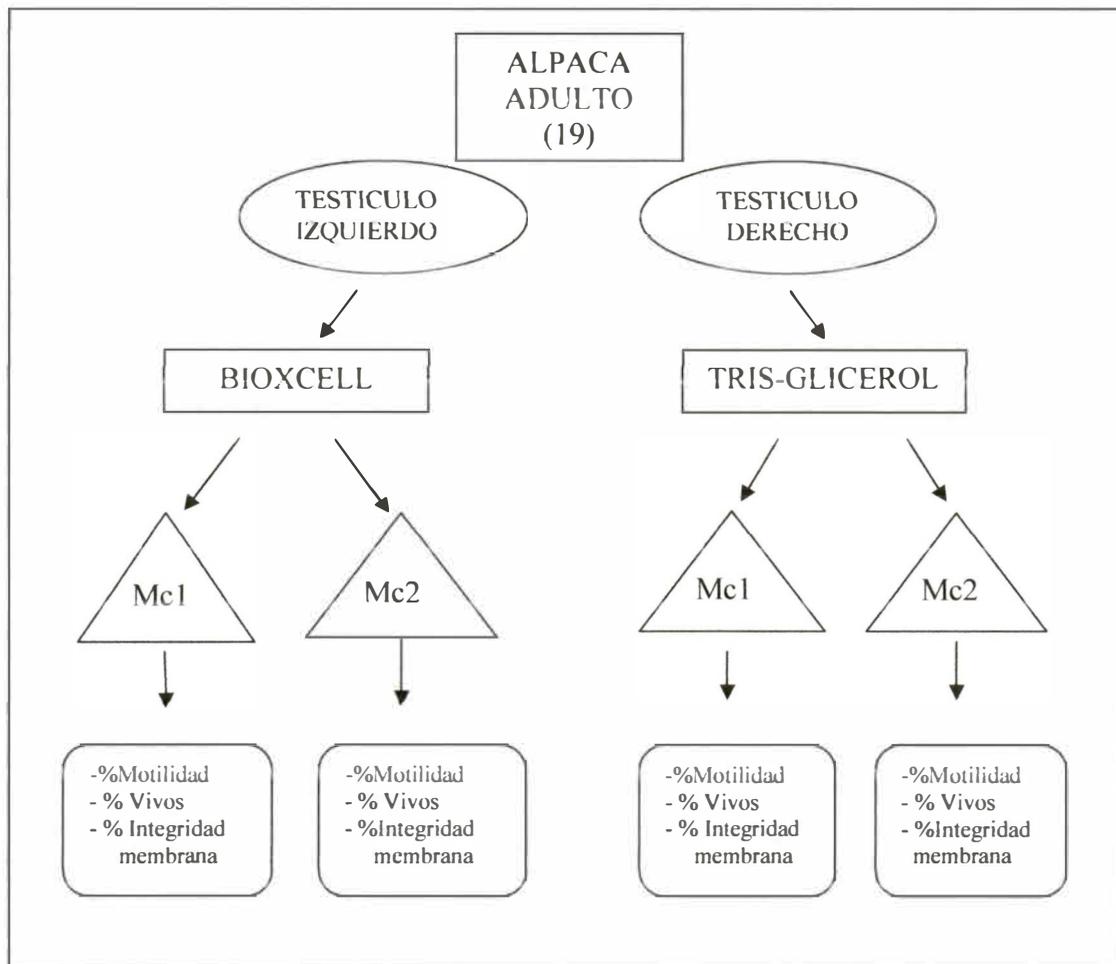
c. Porcentaje de Integridad de membrana

La integridad de membrana se evaluó antes y después del proceso de criopreservación, incubando en un tubo de vidrio esteril, 20ul de muestra (espermatozoides diluidos) en 80ul de solución hipoosmótica o HOST (hypoosmotic swelling test) (1.35 gr Fructosa, 0.7 gr citrato, 100 ml agua destilada) con osmolaridad 150 mOsm/L (Jeyendran *et al.*, 1984); durante 30 minutos para que respondan a dicho estrés mediante alteraciones morfológicas (incremento de tamaño y flagelos flectados) como consecuencia del desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer difundiendo agua al comportamiento intracelular aumentando su volumen (Sanchez *et al.*, 2002).

Para la evaluación de la integridad de membrana, se utilizó un microscopio óptico con aumento 400X. hallando el porcentaje de espermatozoides con alteraciones de un total de 200 espermatozoides por lámina. Para determinar la concentración espermática del semen, se realizó una dilución de 1/100 mezclando 20 μ l de muestra descongelada con 2 ml de agua destilada dentro de un tubo estéril. Se retiró una muestra de 10 μ l de esta mezcla y se colocó en cada lado de la cámara de Neubauer o hemocitómetro, dispersando los espermatozoides y realizando el conteo de espermatozoides.

3.6. Diseño experimental

3.6.1. Efecto de dos tipos de dilutor y dos métodos de congelación en los parámetros de medición al post- descongelamiento



Donde:

Mc1: Método de congelación lento- pajillas

Mc2: Método de congelación rápido- pellets

3.7 Análisis estadístico

Los datos de motilidad, vivos e integridad de membrana para cada uno de los dilutores fueron expresados en forma de promedios ($\bar{x} \pm DS$) de manera porcentual y analizados estadísticamente utilizando el programa estadístico SAS 8.0 (Statistic Analisis System. SAS Institue Inc) haciendo uso del diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con arreglo factorial 2x2 jerárquico desbalanceado. La prueba de análisis de varianza (ANVA) fue utilizada para analizar las diferencias significativas entre los factores: tipos de dilutor y métodos de congelación, bloqueándose las muestras a un nivel de significancia $P < 0,05$ con la finalidad de aislar las fuentes de variabilidad.

Modelo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + D_j + M_k + (D * M)_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable respuesta entre el i-ésimo bloque, el j-ésimo tipo de dilutor, el k-ésimo método de congelación.

μ = Efecto de la media general.

β_i = Efecto de bloque método de obtención

D_j = Efecto de j-ésimo tipo de dilutor.

M_k = Efecto del k-ésimo tipo de método de congelación.

$(D * M)_{jk}$ = Efecto de la interacción entre el j-ésimo tipo de dilutor y el k-ésimo método de congelación

E_{ijk} = Error experimental del i-ésimo bloque, con el j-ésimo tipo de dilutor y el k-ésimo método de congelación.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Carácteres biométricos testiculares

Los testículos (n=38) de los cuales se obtuvieron los espermatozoides epididimarios tuvieron las siguientes características promedio: peso: 12.31 ± 3.71 gr, largo testicular: 3.53 ± 0.4 cm, circunferencia testicular: 7.22 ± 0.8 cm, valores mayores a los hallados por Gonzales, (2008) pero dentro de los rangos señalados por Tibary y Vaughan, (2006).

4.2. Características de los espermatozoides recuperados

La fase pre-experimental permitió determinar que el método de desmenuzamiento del epidídimo es el método más sencillo, repetible y eficiente para obtener la concentración más alta de espermatozoides epididimarios recuperando una concentración espermática de 37×10^6 /ml en promedio en comparación a 24.33×10^6 /ml de espermatozoides recuperados mediante flujo retrógrado, tomando además un tiempo de obtención aproximado de 4 minutos.

Los valores de calidad de los espermatozoides epididimarios luego de su obtención fueron: 70 ± 11.17 % motilidad, 73.44 ± 10.71 % vivos, 36.82 ± 14.68 % integridad de membrana. El porcentaje de motilidad hallado fue mucho mayor a los reportados por Banda *et al.* (2010) quienes obtuvieron una motilidad alrededor del 30% a las 0 horas post- beneficio, Morton *et al.* (2007) reportaron un porcentaje de motilidad inicial promedio de 46.9%, Choez *et al.* (2013) reportaron porcentajes mayores o iguales del 60% de motilidad para la mitad de sus muestras de estudio.

La diferencia entre los valores porcentaje de motilidad progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos a diferencia del porcentaje de integridad de membrana, probablemente se deba al lapso transcurrido entre la recolección de los testículos y la obtención de espermatozoides en el laboratorio que fue un promedio de 3 horas mientras que Morton *et al.* (2007) y Choez *et al.* (2013) esperaron alrededor de 20 horas para procesar las muestras, así como el método y dilutor empleado para la recuperación de los espermatozoides sumado a que la valoración del porcentaje de motilidad se realiza en forma subjetiva y puede verse afectada por la concentración de espermatozoides en el campo de observación del microscopio (Salisbury *et al.*, 1978).

La concentración de espermatozoides obtenidos de cada epidídimo en 3 ml de dilutor fue un promedio de $50.92 \times 10^6/\text{ml}$.

4.3 Viabilidad de los espermatozoides epididimarios al post-descongelamiento

No se hallaron diferencias significativas de la interacción de los factores tipo de dilutor y método de congelación sobre la viabilidad de los espermatozoides epididimarios, como se observa en el análisis de varianza (ANVA). (Ver Anexo 4). Por lo que se procedió a analizar el efecto de los factores de forma individual sobre los parámetros de medición: porcentaje de motilidad, vivos e integridad de membrana.

4.3.1 Efecto del tipo de dilutor sobre la viabilidad de los espermatozoides epididimarios post-descongelamiento.

En el experimento se encontraron diferencias significativas de forma individual respecto al tipo de dilutor sobre los parámetros de viabilidad espermática al post-descongelamiento. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Efecto del tipo de dilutor sobre la viabilidad de los espermatozoides epididimarios post- descongelamiento

Tipo de Dilutor	n	Motilidad (%)	Vivos (%)	Integridad membrana (%)
Tris-yema-glicerol	19	24.53± 14.61 b	32.02 ± 14.85 a	20.65 ± 7.95 a
Bioxcell®	19	33.34 ± 17.28 a	38.00 ± 14.01 a	19.95 ± 10.45 a

Letras diferentes (a, b) indican diferencias significas ($p < 0.05$) en columnas

Se observó que el porcentaje de espermatozoides con motilidad superior corresponde al dilutor Bioxcell® con un promedio de 33.34 % en comparación al dilutor Tris-yema-glicerol con 24.53 %. No existen reportes previos del uso del dilutor Bioxcell® en la criopreservación de espermatozoides de alpaca pero sí en otras especies como el carnero y búfalo con motilidades progresivas alrededor del 50% (Akther *et al.*, 2010;) y toro con resultados que superan el 70% (Jannet *et al.*, 2005).

El uso de dilutor Tris ha sido reportado en la criopreservación de semen de alpacas en combinación con glicerol (Santiani *et al.*, 2005), obteniendo un 4.0 % de motilidad y 5.7% de de acrosomas intactos. Sin embargo, Morton *et al.* (2007), Terreros *et al.* (2012), Choez *et al.*, (2013), obtuvieron motilidades de 18.2%, 31.1% y 36% respectivamente congelando espermatozoides epididimarios de alpaca a partir de motilidades iniciales superiores de 50%. Otros diluyentes empleados en la congelación de espermatozoides de alpaca y llama tienen bajos resultados en cuanto a motilidad, 21.3% Biladyl® (Vaughan *et al.*, 2003), 17.4% Green Buffer® (Vaughan *et al.*, 2003), 15-20% leche deslactosada (Santiani *et al.*, 2005).

El uso de una concentración de 6% de glicerol para congelar espermatozoides de alpaca en el experimento, ha sido adaptado de protocolos para congelar semen de carnero (Evans y Maxwell, 1987), lo que quizás no haya sido lo adecuado debido a que la tasa de

concentración de crioprotector óptima para una especie no necesariamente lo sea para otra (Holt, 2000)

4.3.2 Efecto del método de congelación sobre la viabilidad de los espermatozoides epididimarios post-descongelamiento

Los resultados del Cuadro 2 demuestran que existen diferencias significativas entre los métodos de congelación: pellets y pajillas para los parámetros porcentaje de motilidad 36.18% y 21.68% y porcentaje de vivos con 39.65% y 30.38% respectivamente, más no en los valores de porcentaje de integridad de membrana.

Cuadro 2. Efecto del Método de congelación sobre la viabilidad de los espermatozoides epididimarios post- descongelamiento

Método de congelación	n	Motilidad (%)	Vivos (%)	Integridad membrana (%)
Método de congelación rápida- Pellet	19	36.18 ± 16.47 a	39.65 ± 13.59 a	19.01 ± 9.63 a
Método de congelación lenta- Pajilla	19	21.68 ± 12.27 b	30.38 ± 13.82 b	21.59 ± 9.30 a

Letras diferentes (a, b) indican diferencias significas ($p < 0.05$) en columnas

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando el método de congelación lenta- pellets mostrando mayor porcentaje de motilidad post-descongelamiento de 36.18% en comparación a las muestras congeladas como pajillas con 21.68 %, estos valores fueron similares a los encontrados en investigaciones anteriores congelando espermatozoides epididimarios de alpacas en pellets con valores de motilidad al post-descongelamiento de 34% (Canorio y Valdivia, 2007) y 27% (Morton *et al.*, 2007). En otras especies como

verracos se encontraron valores de motilidad de 40.1% (Carpio *et al.*, 2008) y 45.8% en carneros (Brito *et al.*, 2004).

El bajo porcentaje de motilidad al post-descongelamiento pudo haber sido afectado por el valor de la motilidad inicial que presentaron las muestras fluctuando entre 40-80%, debido a diferencias individuales entre animales (Morton *et al.*, 2007). Choez *et al.* (2013) sostienen que las muestras que tienen una motilidad inicial mayor a 60% logran mejores porcentajes de motilidad al post descongelamiento en comparación con las muestras que inician con motilidades iguales o menores a 60%.

La diferencia entre motilidad inicial y motilidad post-descongelamiento pudo haber sido directamente influenciada por la alta mortalidad espermática y daños de la membrana plasmática que ocasionan el shock térmico durante el proceso de congelamiento de las muestras, por lo que el método empleado en la criopreservación influye de una forma directa en los parámetros post-descongelamiento (Holt, 2000).

De la misma manera existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al porcentaje de espermatozoides vivos entre ambos métodos de congelamiento al post-descongelamiento, este parámetro pudo verse influenciado debido a que los espermatozoides criopreservados sufren cambios parecidos a la capacitación dependiendo del agente crioprotector del dilutor (Holt, 2000); por lo que no tendrían la necesidad de ser capacitados previamente cuando se realicen trabajos *in vitro* ya que los espermatozoides criopreservados poseen una gran capacidad de unión a la zona pelúcida. (Canorio, 2008).

Otra posible influencia en los parámetros de viabilidad respecto al método de congelación lenta podría deberse al volumen de pajilla congelada ya que Burgel *et al.*, (2000); Vaughan *et al.*, (2003); Morton *et al.*, (2007) encontraron mejores resultados congelando espermatozoides en pajillas de volúmenes mayores a 0.25 ml debido a que tienen una mayor área de exposición al enfriamiento en comparación al volumen que poseen pajillas más grandes. En el caso de camellos, especie similar a los camélidos sudamericanos, requiere un volumen mayor debido a que necesita mayor plasma seminal para inducir la ovulación (Bravo *et al.*, 2000a). Siendo el

éxito en la inseminación artificial influenciada directamente por el método de congelación (Holt, 2000)

El parámetro porcentaje de integridad de membrana utilizando IIOST es similar al reportado por Banda *et al.* (2010) en espermatozoides epididimarios criopreservados de alpaca con dilutores Tris, Tes y leche descremada, no existiendo otros reportes de esta prueba en camélidos sudamericanos, siendo mayormente utilizados los métodos que miden la integridad acrosomal, tales como el método de Fluorescencia Morton *et al.* (2007) y la técnica de doble tinción modificada por Santiani *et al.* (2005) para espermatozoides de alpaca.

No se consideró el número de espermatozoides por dosis debido a que no existen reportes sobre concentraciones óptimas que sirvan para comparar y producir exitosamente la preñez con espermatozoides criopreservados. Algunos reportes indican haber logrado obtener preñeces de 7.9% (Aller *et al.*, 2003) usando concentraciones espermáticas de 50 millones de espermatozoides/ml depositados vía transcervical en llamas. Existen algunos factores que influyen en la fertilidad post servicio como concentración de las dosis, técnica de inseminación entre otros.

V. CONCLUSIONES

- Mayor población de espermatozoides se encontraron en muestras de obtenidas por desmenuzamiento de epidídimo
- El dilutor Bioxcell tuvo un mejor desempeño en la criopreservación de espermatozoides epididimarios.
- El método de congelación rápida -pellets demostró ser el método más eficaz para criopreservar espermatozoides epididimarios de alpaca.
- Por lo tanto de acuerdo al parámetro de motilidad al post-descongelamiento, el uso de dilutor Bioxcell y método de congelación rápida-pellet constituyen una buena alternativa para la criopreservación de espermatozoides epididimarios.

VI. RECOMENDACIONES

- Se sugiere estudiar y evaluar niveles de crioprotectores para hallar una tasa óptima de concentración.
- Se recomienda realizar estudios sobre fertilización in vitro con espermatozoides criopreservados provenientes del epidídimo debido a que aún no existen reportes.
- Se recomienda el uso de inseminación artificial intrauterina laparoscópica teniendo en consideración el tiempo post-inducción debido a que al ser espermatozoides sometidos a un proceso similar a la criocapacitación fisiológica necesitan situarse más cerca al ovocito.

VII. REVISION BIBLIOGRAFICA

- AITKEN, R.; CLARKSON, J. 1987. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert.* 81:459-469.
- AFZELIUS, A. 1959. Electron microscopy of the sperm tail. Results obtained with a new fixative. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5:269
- AMANN, RP.; GRAHAM, JK. 1993. Spermatozoal function. *Equine reproduction* Edit McKinnon AO. 715-745 pp
- ANDUAGA, J. 1980. Estudio comparativo de la congelación de semen bovino con el dilutor Tris (hidroximetil- aminometano). Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.
- AKE-LOPEZ, R.; SANCHEZ- ENCALADA. 1997. Efecto de la remoción parcial del plasma seminal sobre la congelabilidad del semen de bovino. *Rev. Biomed.* 8: 21-26
- ALARCÓN, V. ;GARCÍA W.; BRAVO, W. 2012. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev Inv Vet Perú.* 23(1): 58-64
- ALLEN, J.; SLATER, J. 1957. A chemical and histochemical study of alkaline phosphatase and alisterase in the epididimis of normal and castrated mice. *Anat Rec.* 129: 255-273
- ALLER, J.; REBUFFI, G.; CANCINO A.; ALBERIO, R. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (lama glama). *Arch. Zootec.* 52 (197): 15 -23
- APAZA, N.; ALARCÓN, V.; HUANCA, T.; CÁRDENAS, O. 1999. Avances sobre inseminación artificial son semen congelado en alpacas. En: Libro de resúmenes del II Congreso mundial sobre camélidos. Cusco Perú. 73 pp.

- AVILA-PORTILLO, L.M.; MADERO, J.; LÓPEZ, C.; LEÓN, M.; ACOSTA, L.; GÓMEZ, C.; DELGADO, L.; LOZANO, J.; REGUERO, M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 57 (4): 291 -300.
- BANDA, J.; EVANGELISTA, S.; RUÍZ, L.; SANDOVAL, R.; RODRIGUEZ C.; VALDIVIA, M.; SANTIANI, A. 2010. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú.* 21(2): 145-153.
- BARRIOS, D. 2002. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post- morten. *Memorias XI congreso venezolano de producción e industria animal, Valera 22 al 28 de Octubre. ULA- Trujillo.* 1-14 pp.
- BARRIOS W.; CHAVERA A.; HUAMAN H.; HUANCA, W. 2011. Alteraciones anatomohistopatológicas testiculares en alpacas (*Vicugna pacos*) beneficiadas en Nuñoa, Puno. *Rev Inv Vet Perú.* 22(3): 223-232.
- BEARDEN, J.; FUQUAY, J. 1982. *Reproduccion animal aplicada.* Ed. El manual moderno, SA . Mexico DF. 358 pp.
- BEDFORD, J.M. 1975. Maturation, transport and fate of spermatozoa in the epididymis. *Handbook of Physiology.* Edi DW Hamilton and RO Greep. Washinton DC. 317 pp.
- BOISO, I. 2001. Principios básicos criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad.* 18: 127 – 131.
- BRAVO, PW.; JOHNSON, LW. 1994. Update on Llama Medicine. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice.* 10: 259-264.
- BRAVO, PW. 1995. Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. *Proceedings of Post- graduate Foundation in Veterinary Science.* 257: 61-66.
- BRAVO, PW.; FLORES, U.; GARNICA, J.; ORDOÑEZ, C.1997a. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology.* 47:619 -626.
- BRAVO, PW.; FLORES, D.; ORDOÑEZ , C. 1997b. Effect of repeated collection of semen characteristics of alpacas. *Biology of reproduction.* 57: 520 -524.

- BRAVO, P.W.; PACHECO, C.; QUISPE, G.; VILCAPAZA, L.; ORDONEZ, C. 1999. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Archives of Andrology*. 43: 239 -426.
- BRAVO, P.W.; SKIDMORE, JA.; ZHAO, XX. 2000a. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science*. 62: 173-193.
- BRAVO, PW.; CCALLO, M.; GARNICA, J. 2000b. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research*. 38: 91-95.
- BRAVO, PW.; MOSCOSO, R.; ALARCON, V.; ORDOÑEZ, C. 2002. Ejaculatory Process and related semen characteristics. *Archives of andrology*. 48: 65- 72.
- BRITO, F.; VALENCIA, M.; BALCÁZAR, S.; ANGULO, M.; MEJÍA, V. 2004. Congelación de semen de carnero en pellets con los diluyentes Tris-glucosa-yema de huevo o Lactosa-yema de huevo. *Revista de investigación y difusión veterinaria*. 1-9.
- BROWN, B. 2000. A review on reproduction in South American camelids. *Animal reproduction Science*. 58: 169-195.
- BUENDÍA P.; SOLER, C.; PAOLICCHI, F.; C. GAGO,; URQUIETA, B.; PEREZ-SANCHEZ, F.; BUSTOS OBREGÓN, E. 2002. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm- Class Analyser Computer - Assisted system. *Theriogenology* 57: 1207-1218.
- BURGEL, H.; ERHARDT, G.; GAULY, M. 2000. Cryopreservation of llama (lama glama). *Semen. Reprod Domest. Anim*. 35-36.
- CALDERON, W.; SUMAR, J.; FRANCO, PW. 1968. Avances en la inseminación artificial de las alpacas (lama pacos). *Revista de la facultad de medicina veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 22: 19- 35.
- CANORIO, M. 2008. Criocapacitación de espermatozoide de alpaca (Lama pacos). Tesis. UNMSM.
- CANORIO, N.; VALDIVIA, M. 2007. Criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca, Vicugna pacos. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada a Camélidos Sudamericanos. 84-92 pp.

- CARPIO, M.; CADILLO, J.; MELLISHO, E. 2008. Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*. 18:1.
- CHOEZ, K.; EVANGELISTA, S.; CASTILLO, R. 2013. Efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Spermova*. 3(1): 83-84.
- COLAS, G. 1980. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France II-étude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Dev.* 20: 1789-1799.
- CORREA, J.; RODRÍGUEZ, M.; PATTERSON D.; ZAVOS, P. 1996. Thawing and processing of cryopreserved bovine spermatozoa at various temperatures and their effects on sperm viability, osmotic shock and sperm membrane functional integrity. *Theriogenology* 46: 413-420.
- CUNNINGHAM, J. 2003. *Fisiología Veterinaria*. 3ra edición .Ed. Elsevier. España. 575 pp.
- DE LAS HERAS, M.A.; VALCARCEL, A.; FURNUS, C.; PÉREZ, L.; MOSES, D.; BALDASSARRE. 1996. Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosomes by freezing/thawing, not detected by light microscopy. *Anim Reprod Sci.* 45: 81-89.
- DE LEEUW, A.M.; DEN DAAS, J.H.; WOELDERS, H. 1991. The fix vital stain methods simultaneous determination of viability and acrosomal status of bovine spermatozoa. *J Androl.* 12:112-118.
- DELHON, G.; VON LAWZEWITSCH, I. 1987. Reproduction in the male llama (*Lama glama*), a South American camelid. I. Spermatogenesis and organization of the intertubular space of the mature testis. *Acta Anat.* 129 (1): 59-66.
- DELHON, G.; VON LAWZEWITSCH, I. 1994. Ductus Epididymidis compartments and morphology of epididymal spermatozoa in llamas. *Anat Histol. Embryol.* 23: 217-225.
- EVANS, G.; W. MAXWELL. 1987. 'Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats.' (Butterworths: Sydney.)

- FÁBREGA, A.; PUIGMULÉ M.; BONET S.; E. PINART. 2012. Epididymal maturation and ejaculation are key events for further in vitro capacitation of boar spermatozoa. *Theriogenology*. 78: 867- 877.
- FERNANDEZ- BACA, S. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. FAO. Chile. 429 pp.
- FERNANDEZ- BACA, S.; NOVOA, C. 1968. Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña (*Vicugna vicugna*). *Rev. Fac. Med. Vet. Lima, Perú*. 22: 9-18.
- FERNANDEZ –BACA, S.; MADENN, D.H.; NOVOA, C. 1970. Effects of different matting stimuli in induction of ovulation in the alpaca. *J. Reprod. Fert.* 22: 261-267.
- FOWLER, M.E. 1989. *Medicine and Surgery in South American Camelids*. Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco. Iowa State University Press. Amess. 549 pp.
- FOWLER, A.; M. TONER. 2005. Cryo-injury and Biopreservation. *Ann NY Acad. Sci.* 1066: 119-135
- FRANDSON, R. 2009. *Anatomía y Fisiología de los Animales de granja*. 7ma Edición. Editorial Willey Blackwell. 391 pp
- GAO, G.Y , ASHWORTH E.; WATSON, PF, KLEINHANS F.; MAZUR, P.; CRISTER, JK. 1993. Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride and sucrose on spermolysis. *Biol Reprod.* 49: 112-123.
- GAULY, M.; LEIDINGER, H. 1996. Semen quality, characteristic volumen distribution and hipoosmotica sensitivy of spermatozoa of *Lama glama* and *Lama guanicoe*. *Proc 2nd European Symposium on South American camelids*. Universita degli study di Camerino. 235-244.
- GARCÍA SANCRISTAN, A. 1996. *Fisiología Veterinaria*. Ed. MC Graw-Hill. Interamericana. Madrid-España. 827-939 pp.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háfèz, E.S.E. ; B. Háfèz. *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Editorial Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, 96-109 pp.
- GARNICA, J.; FLORES, E.; BRAVO, PW. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim. Reprod. Sci.* 23:85-90.

- GIULIANO, S.; DIRECTOR A.; GAMBAROTTA M.; TRASORRAS V.; MIRAGAYA, M. 2007. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science*. 104(2): 359-369.
- GONZALES, H. 2008. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia Año X*. 10:223-233.
- HAFEZ, ESE. Y HAFEZ, B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma Edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. México. 235 pp.
- HAMMADEH, M.E.; GEORG, T.; ROSENBAUM, P.; SCHMIDT, W. 2001. Association between freezing agent and acrosome damage of human spermatozoa from subnormal and normal semen. *Andrologia* 33: 331-336.
- HAMMERSTEDT R.H.; GRAHAM J.K.; NOLAN, J.P. 1988. Motility, head, and lactate production in ejaculated bovine sperm. *Ach. Biochem. Biophys*. 266: 111-123
- HOLT, W. 1999. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53: 47-58
- HOLT, W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*. 62: 3-22.
- HUANCA, T.; MAMANI, R.; NAVEROS, M.; GONZALES, M. 2012. Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca "Vicugna pacos". IV Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Chile. Conferencias, resúmenes y trabajos. 121pp.
- ILLERA, M. 1994. Reproducción de los Animales Domésticos. Ed. M. Illera. Editorial Aedos. Barcelona. España. 390 pp.
- JEYENDRAN, R.; VAN DER VEN, H.; PEREZ-PELAES, M.; CRABO, B.; ZANAVELD, L. 1984. Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert*. 70:219-228.
- JIMENEZ, L.; MERCHANT, H. 2003. *Biología Celular y Molecular*. Primera edición. Editorial Pearson Educación. 912 pp.
- JONES R. 1998. Plasma Membrane Structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertl Sppl*. 53:73-84.

- JANETT F.; KEO S.; BOLLWEIN H.; HASSING M.; THUN, R. 2005. Comparison of AndroMed, Bioxcell and Triladyl extender for cryopreservation of bull semen. *Schweiz Arch. Tierheilk.* 147: 62 .
- KERSHAW-YOUNG, M.S.; STUART ,C.; EVANS G.; MAXWELL, WC. 2013. The effect of Glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Animal Reproduction Science* 138: 261-267.
- L VON BAER ; HELLEMANN, C. 1999. Cryopreservation of llama (*Lama glama*) semen. *Reprod Dom Anim.* 34: 95-96
- LICHTENWALNER , A.; WOODS, G.; WEBER, J. 1996. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology.* 46: 293-305.
- MANN, T. 1975. *Biochemistry of semen and of the male reproductive tract.* London. Methuen.. American Physiological Society. 7(5): 461- 471.
- MARDONEZ, J.; DELGADO, P. 2012. IV Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Chile. Conferencias, resúmenes y trabajos. 146 pp.
- McEVOY, T. G.; KYLE, C. E.; YOUNG, P.; ADAM, C.L.; BOURKE, D. 1992. Aspects of artificial breeding and establishment of pregnancy in South American camelids. *Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod., The Hague .(4):* 1963–1965
- MEDINA, G.; CATACOR, N.; OLIVERA, L. 2004. Niveles hormonales, evaluación de semen y espermatogénesis en alpacas. IV Congreso Mundial sobre Camélidos. Argentina. 16 pp.
- MELLISHO, E. 2007. *Reproducción e inseminación artificial en alpacas (Vicugna pacos).* Primera edición. Editorial Lider imprenta. Lima. 30 pp.
- MENDOZA, T.; CASTRO A.; LUPIDIO M.; DOMINGUEZ M.; GOMEZ S.; GHEZZI, M. 2012. Caracterización macroscópica y microscópica de las glándulas anexas del aparato reproductor masculino de la llama (*Lama Glama*). *Rev Inv Vet Perú* 23(1): 27-42.
- MINAG 2013. Ministerio de Agricultura del Perú. Portal Agrario – Pecuaria <http://www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/pecuaria/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/cam%C3%A9lidos-sudamericanos?start=2> [consulta: 15 de Enero del 2014].

- MONTALVO C., ZEVALLOS E, COPAIRA, M. 1977. Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. In: Proc XI Cong Nac de Ciencias Veterinarias Lima –Perú.
- MORTON, K.; EVANS, G., MAXWELL, W . 2010. Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology: an international journal of animal reproduction*, 74: 311-316
- MORTON, K.; BATHGATE, R. EVANS, G.; MAXWELL, W.2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development*. 19(7): 792–796
- MUIÑO, R. 2007. Evaluación de la motilidad y la viabilidad de semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificaciones de subpoblaciones espermáticas. Tesis. Universidad Santiago de Compostela.
- MUÑOZ- MARTINEZ, J.; GARCÍA. X; POSADA DEL RÍO, F; REYES, J.; VIESCA, L. Fisiología, células, órganos y sistemas. Primera edición 1997. México. 323 pp.
- NIASARI-NASLAJI, A.; MOSAFER, S.; BAHMANI, N.; GERAMI, A.; GHARAHDAĞHI, A.; ABARGHANI, A.; GHANBARI, A. 2007. Semen cryopreservation in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) using SHORTOR diluents: Effects of cooling rates and glycerol concentrations. *Theriogenology*. 68: 618-625
- NUÑEZ, M.; GENOVESE P.; CORDERO, A.; PICABEA, N; CARDENAS O.; HUANCA W.; BIELLI, A. 2007. Desarrollo heterogéneo, alternante y altamente ordenado en los túbulos seminíferos de la alpaca adulta (*Vicugna Pacos*): Estudios preliminares. APPA- ALPA. Cusco-Perú.
- NOVOA, C.; LEYVA, V. 1996. Reproducción en alpacas y llamas. Publicación científica. *IVITA* 26 (30): 3-18.
- OLIVERA, M.; RUIZ, T. TARAZONA, A.; GIRALDO, C. 2006. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec*. 19(4): 426- 436

- ORDOÑEZ, C.; AMPUERO, E.; CUCHO, H.; CHALCO, G. 2012. Caracterización morfológica de los espermatozoides de alpaca usando el integrated sperm analysis system (ISAS). *Spermova*. 2 (1) 67-68.
- ORTIZ, N. 2000. Estudio de las características espermáticas y de la criopreservación en espermatozoides epididimarios del ciervo ibérico obtenidos post-mortem. Tesis. Universidad de Castilla-La Mancha.
- PACHECO, J., PÉREZ, G., CALLE, L.; VERA, W. 2009. Efecto del lugar y la hora de inseminación artificial sobre la fertilidad en alpacas. *Rev. electron. vet.* 10(8).
- PALMA, G. 2008. Biotecnología de la reproducción, Segunda Edición. Editorial Rebiotec. Argentina. 669 pp.
- PALOMINO, H. 1962. Espermiograma y dimensiones de los espermatozoides de la alpaca. Tesis. UNMSM.
- PÉREZ M.G.; GARCIA, W.; CAPCHA, A.; PACHECO, J. 2006. Evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides epididimario (conducto deferente) conservados de alpaca. IV Congreso mundial de camélidos. 27 pp.
- RAYMUNDO, F.; HUANCA, W.; HUANCA, T.; HUERTA, S.; CORDERO, A. 2006. Efecto de tres dilutores en la conservación de semen de alpacas. *Rev. Inv. Vet. Peru.* 17(2): 125-130.
- QUISPE, C.; DELGADO, P. 2012. IV Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Chile. Conferencias, resúmenes y trabajos. 157 pp.
- RODRIGUEZ- GIL, J.E. 2006. Mammalian Sperm Energy Resources Management and survival during conservation in refrigeration. *Reprod. Dom. Anim.* 41(2): 11-20.
- ROSS, P. Histología. 2007. Texto y atlas color con Biología celular y molecular. 5ta edición. Editorial médica panamericana. España. 953 pp.
- RUBIO-GUILLÉN, J.; QUINTERO-MORENO, A.; GONZALES, D. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Rev. Cient. (Maracaibo)* .19 (4): 382-389.

- RUIZ, L.; SANTIANI, A; SANDOVAL, R.; HUANCA, W. 2007. Efecto de dos antioxidantes (Tempo y Tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor a base de Tris. *Rev. Inv. Vet. Perú* 18(2): 99-106.
- SALISBURY, G.; VANDEMARK, N.; LODGE, J. 1978. Extenders and extension of unfrozen semen In: *Physiology of reproduction and artificial insemination in cattle*. San Francisco. Freeman and Co. 442-493 pp.
- SAN MARTÍN, M.; COPAIRA, M.; ZUÑIGA, J.; RODRIGUEZ, R.; BUSTINZA, G.; ACOSTA, L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *Journal of reproduction in the alpaca. Journal of reproduction and fertility*. 16:395- 399.
- SANCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, R. 2002. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen fresco y congelado. *Arch. med. vet.* 34 (1): 1-9
- SANDOVAL, R. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeables y no permeables. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- SANTIANI, A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente: Tesis. Universidad de la Universidad de la Frontera. Temuco- Chile.
- SANTIANI, A. 2012. Uso de dos análogos de superóxido de dismutasa para prevenir la desestabilización espermática prematura durante la criopreservación y vitrificación en espermatozoides de alpaca. Tesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- SANTIANI, A.; HUANCA, W.; SAPANA, R.; HUANCA, T.; NESTOR, S.; R. SANCHEZ. 2005. Effects on the quality of frozen- thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian j Androl.* 7(3): 303- 309
- SATO, A.; MONTOYA, O. 1990. Aparato reproductor del macho. En aparato reproductor de Camélidos Sudamericanos. *Rev. Inv. Pec.* 7: 17-18.
- SCHWALM, A.; GAULY M.; ERHARD G.; BERGMANN M. 2007. Changes in a testicular histology and sperm quality in llamas (*Lama glama*) following exposure to high ambient temperature. *Theriogenology* 67: 1316-1323.

- SORENSEN, A. M. Jr. 1991 Reproducción animal, principios y prácticas. McGraw-Hill. México. 539 pp.
- STORNELLI, MC.; TITTARELLI, C.; SAVIGNONE, C.; STORNELLI, MA. 2005. Efectos de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analáctea Veterinaria* 25(2): 28-35.
- STEVEN, A.; LOWE, J. 2006. *Histología humana*. 3ra edición. El Sevier. Madrid. 431 pp.
- SUMAR, J. 1983. *Studies on reproductive pathology in alpacas*. Thesis. Sweden: Swedish University of Agricultural science. 90 pp.
- SUMAR, J. 1985. *Reproductive physiology in South American Camelids*. In: Land, R.B., Robinson, D.W. Eds., *Genetics of Reproduction in Sheep*. Butterworths, London, 81–95 pp.
- TERREROS, M; ARRIAGA, I.; HUANCA, W. 2012. *Resúmenes y Trabajos*. VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. 71 pp.
- TIBARY, A. 2003. *Male Reproduction*. *The Complete Alpaca Book*. Edit. Bonny Doon. 323–350 pp.
- TIBARY, A.; VAUGHAN, J. 2006. *Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations* *Small Ruminant Research*. 61(2): 283-298.
- TIBARY, A.; MEMON, MA. 1999. *Reproduction in the male South American Camelidae*. *Journal of Camel Practice and Research*. 6:235-248.
- TIBARY, A.; ANOUASSI, A.; KHATIR, H. 2005. *Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids*. *Theriogenology*. 64: 618-638.
- TROUNSON, A. 1986. *Preservation of human eggs and embryos*. *Fertil Steril*. 4: 1-12.
- VASQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; GARCÍA- ARTIGA, C.; ROCA, J. 1996. *Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane*. *Theriogenology*. 47: 913-922

- VAUGHAN, J.; GALLOWAY, D.; HOPKINS, D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*) a report for the rural industries research and development corporation. RIRDC Publication N° 03/104
- VON BAER, A., C, HELLEMAN. 1998. Semen characteristics in the llama (*Lama glama*). *Archivos de medicina veterinaria*. 30: 171-176.
- WATSON, P. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen In Lamming Edit Marshall's Physiology of reproduction. Edimburgh, London. 747- 869 pp.
- WATSON, P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891.
- WATSON, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Repro. Sci.* 60: 481-492.
- ZHAO, X.X. 2000. Semen characteristics and artificial insemination (A.I.) in the Bactrian camel recent advances in camelid reproduction. In: *Recent Advances in Camelid Reproduction*, Skidmore L. and Adams G.P. Edt International veterinary information service. (www.ivis.org). Document N°. A1010.900.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 2. Parámetros post-descongelamiento de semen criopreservado en Camélidos y camellos

Autor	Especie	Colección de semen	Dilutor	Método de congelación	Volumen (ml)	Motilidad (%)	Viabilidad (%)	Integridad de membrana/acrosoma (%)
Niasari-Naslaji <i>et al.</i> (2007)	Bactrian Camel	Vagina artificial	SHORTOR (214.6 mM tris, 64.2 mM ácido cítrico, 66.6 mM glucosa, 49.9 mM fructosa, glicerol 6%)	Pajillas	0.5	29.90		
Santiani <i>et al.</i> (2005)	Vicugna pacos	Vagina artificial	Tris-glucosa- Glicerol	Pajillas	0.25	4.0 ± 1.1	6.2 ± 1.5	5.7 ± 1.5
			Tris - glucosa Etilenglicol	Pajillas	0.25	1.0 ± 1.4	4.3 ± 4.3	4.0 ± 1.0
			Leche descremada-fructosa- glicerol	Pajillas	0.25	15.3 ± 4.1	13.0 ± 6.1	12.7 ± 5.9
			Leche descremada-fructosa- Etilenglicol	Pajillas	0.25	20.0 ± 6.7	21.0 ± 1.0	18.7 ± 2.9
Aller <i>et al.</i> (2003)	Lama glama	Vagina artificial	Citrato - Yema-glicerol-DMSO	Pajillas	0.5	20.4 ± 7.5	32.4 ± 10.5	
Zhao, XX. (2000)	Bactrian Camel	Vagina artificial	SYG-2 Para 100 ml. 73 ml. De glucosa al 12%, 20 ml de yema de huevo, penicilina 1000 IU/ml, 1000 µg/ml. Streptomycina, 7% glicerol	Ampolla		30		
L. von Baer y Hellemann, (1999)	Lama glama	Vagina artificial	Tris - Equex STM	Pajillas	0.5	25.9 ± 7.7		50.8 ± 18.8
			Tris	Pajillas	0.5	28.2 ± 6,8		48.3 ± 21.0
			EDTA-Equex	Pajillas	0.5	21.4 ± 10.7		49.3 ± 12.6
			EDTA	Pajillas	0.5	19.3 ± 8.8		49.6 ± 17
McEvoy <i>et al.</i> (1992)	Lama glama	Electroeyaculador	Tris-Yema-glicerol	Pajillas		10		

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 2

Tabla 1. Motilidad, Viabilidad e Integridad de membrana de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*) post-descongelamiento empleando diferentes crioprotectores

Autor	Especie	Técnica de obtención	Dilutor	Método de congelación	Volumen (ml)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	Integridad de membrana/acrosoma (%)
Choez <i>et al.</i> 2013	<i>Vicugna pacos</i>	Disección de la cola del epidídimo	Leche descremada –fructosa- Glicerol	Pajilla	0.25	25		
Terreros <i>et al.</i> 2012	<i>Vicugna pacos</i>	Disección epidídimo	Leche descremada- fructosa- DMSO	Pajilla	0.5	31.11		
			Leche descremada- fructosa- - Etilenglicol	Pajilla	0.5	8.3		
			Leche descremada- fructosa- Glicerol	Pajilla	0.5	13.89		
Banda <i>et al.</i> 2010	<i>Vicugna pacos</i>	Recuperados mediante desmenuzamiento del epidídimo	Tris	Pajillas	0.25	14.0 ± 7.5	32.6 ± 15.6	24.3 ± 9.6
			Leche descremada	Pajillas	0.25	17.0 ± 4.3	27.2 ± 13.5	17.9 ± 5.5
Morton <i>et al.</i> , 2010	<i>Vicugna pacos</i>	Recuperados mediante desmenuzamiento del epidídimo	Lactosa glicerol 2%	pellet		16.1± 4.6		
			Lactosa glicerol 3%	pellet		20.5± 5.9		
			Lactosa glicerol 4%	pellet		18.5± 6.6		
			Biladil equex	pellet		21.5±3.5		
			Biladil sin equex	pellet		14.4±2.1		
Gonzales, 2008	<i>Vicugna pacos</i>	Recuperados mediante Flujo retrógrado	Citrato-Yema de huevo- glicerol	Pellet	0.5 ml		5	

Morton et al. 2007	Vicugna pacos	Desmenuzamiento del epidídimo	Citrato	Pellet	250 µL	6.9 ± 2.3		79.0% ± 1.0
			Lactosa- yema- glicerol- Equex	Pellet	250 µL	18.2 ± 5.7		80.0% ± 2.2
			Tris	Pellet	250 µL	11.3 ± 3.0		83.4% ± 2.2
			Lactosa- yema- glicerol- Equex	Pellet	250 µL	27.0 ± 5.2		87.5% ± 1.2
				Pajillas sobre hielo seco	0.25	5.5 ± 1.1		88.3% ± 1.1
				Pajillas sobre hielo seco	0.5	5.0 ± 1.6		81.0% ± 2.2
				Pajilla - Vapor nitrógeno líquido	0.25	8.6 ± 1.8		89.8% ± 1.6
			Pajilla- Vapor nitrógeno líquido	0.5	10.0 ± 2.4		89.0% ± 1.5	
Canorio y Valdivia. 2006	Vicugna pacos	Recuperados mediante la disección del epidídimo	Citrato-yema de huevo- DMA 0.375M	Pajillas	0.25	34.42	55	60
			Citrato- yema de huevo-DMSO 0.25M	Pajillas	0.25	33	49	52

Fuente: Elaboración propia

ANEXO 3.

Cuadros ANVA del efecto del método de obtención sobre los parámetros de medición post-descongelamiento

a) Motilidad

FV	GL	SC	CM	FC	Pr> F
Tratamiento	1	4034.08	4038.08	42.41	0.0074 *
Bloque	3	3413.05	1137.68	6.13	0.0009 *
Trat(Bloque)	3	285.37	95.13	0.51	0.68 (ns)
Error	68	12623.5	185.64		
Total	75	20314.94			

b) Viabilidad

FV	GL	SC	CM	FC	Pr> F
Tratamiento	1	1676.91	1676.91	35.31	0 *
Bloque	3	1720.76	573.58	3.23	0.03 *
Trat(Bloque)	3	142.46	47.49	0.27	0.85 (ns)
Error	68	12072.7	177.54		
Total	75	15567.89			

c) Integridad de membrana

FV	GL	SC	CM	FC	Pr> F
Tratamiento	1	148.59	148.59	0.52	0.52 (ns)
Bloque	3	5559.95	1853.32	7.08	0 *
Trat(Bloque)	3	855.24	285.08	1.09	0.36 (ns)
Error	68	17788.25	261.59		
Total	75	24329.46			

ANEXO 4

Cuadros ANVA del efecto de los factores: Tipo de dilutor, método de congelación e interacción dilutor x método de congelación, sobre los parámetros de medición al post-descongelamiento

a) Motilidad

FV	GL	SC	CM	FC	Pr> F
Bloque	1	1779.61	1779.61	9.83	0.0016 *
DL	1	1306.09	1306.09	7.21	0.009 *
MC	1	3993.01	3993.01	22.06	0.0001 *
DL*MC	1	212.62	212.62	1.17	0.2822 (ns)
ERROR	71	12854.1	181.04		
TOTAL	75	20314.94			

b) Viabilidad

FV	GL	SC	CM	FC	Pr > F
Bloque	1	745.09	745.09	4.23	0.0434
DL	1	605.4	605.4	3.44	0.0679
MC	1	1631.98	1631.98	9.26	0.0033
DL*MC	1	1.5	1.5	0.01	0.9267
ERROR	71	12509.26	176.19		
TOTAL	75	15567.89			

c) Integridad de membrana

FV	GL	SC	CM	FC	Pr > F
Bloque	1	552.06	552.06	1.68	0.1992
DL	1	3.20	3.20	0.01	0.9216
MC	1	126.01	126.01	0.38	0.5378
DL*MC	1	302.80	302.80	0.92	0.3404
ERROR	71	23339.40	328.72		
TOTAL	75	24329.46			