

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

LA MOLINA

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL



**“CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE ALPACA UTILIZANDO
METIL- β -CICLODEXTRINA CARGADA CON COLESTEROL”**

Presentada por:

RENE CIPRIAN ACHIRCANA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

Lima – Perú

2018

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**“CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE ALPACA UTILIZANDO
METIL- β -CICLODEXTRINA CARGADA CON COLESTEROL”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

RENE CIPRIAN ACHIRCANA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Javier Ñaupari Vásquez
PRESIDENTE

Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca
PATROCINADOR

Mg.Sc. Wilder Trejo Cadillo
MIEMBRO

Ph.D. Gustavo Gutiérrez Reynoso
MIEMBRO

DEDICATORIA

*A **Dios**, por su gran sabiduría y haberme permitido llegar hasta este momento.*

*A mis queridos padres **Yury y Felipa**, por todo su amor y apoyo incondicional, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y por hacer de mí, la persona que soy.*

*A mis amados hermanos **Rosmery, Nancy, Vilma, Yuri, Carmen, Neptali** por apoyarme siempre, su comprensión, sus buenos consejos y motivarme siempre a seguir adelante.*

*Para **Mariela, Cristian, Noelia, Uriel y Adriana**, por su amor y afecto incondicional y por llenar mis días de felicidad.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis sinceros agradecimientos:

A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Agraria La Molina y un gran reconocimiento a los docentes de la Maestría en Producción Animal, por mi formación profesional y por compartir sus conocimientos.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC).

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), ente que financio esta investigación.

Al Mg.Sc. Enrique Alvarado Malca, patrocinador de la tesis, por su gran enseñanza, apoyo y sus grandes consejos en la realización de esta investigación.

Al Ph.D. (c) Amalia del Pilar Gallegos Cárdenas, por la confianza, su apoyo y brindarme todas las oportunidades para la ejecución de esta investigación.

Al Ph.D. Javier Ñaupari Vásquez, por su gran confianza y sus orientaciones.

Al Mg.Sc. Hernán Cucho Dolmos de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, mi eterno agradecimiento por brindarme su apoyo para la elaboración de este trabajo de investigación.

Al Ph.D. Wilber García Vera del Centro de Investigación IVITA - Maranganí, UNMSM, por su ayuda desinteresada y sus sabios consejos.

A mis compañeros de la maestría: Nathalie, Julio Cesar, Camilo, Junior, Damaso, Tania, Cynthia, Jimmy, Hellem, Victor, David, Luis, Monica y Ruben, por su amistad y contagiarme su alegría.

A mis amigos del Laboratorio de Reproducción Animal y al personal técnico y administrativo que labora en el CICAS - La Raya, UNSAAC; por brindarme su apoyo durante la ejecución de la investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Comportamiento sexual de la alpaca macho	3
2.2 Colección de semen.....	3
2.3 Características del semen de alpaca	5
2.3.1 Características macroscópicas.....	5
2.3.2 Características microscópicas	7
2.4 Procedimiento de congelación de semen de alpaca	15
2.4.1 Dilución.....	15
2.4.2 Enfriamiento - refrigerado	15
2.4.3 Adición de crioprotector y envasado	16
2.4.4 Equilibrado, congelación y almacenamiento	16
2.4.5 Descongelación	17
2.5 Criopreservación de semen	17
2.5.1 Dilutores de semen.....	18
2.5.2 Crioprotectores de semen.....	19
2.6 Ciclodextrina cargada con colesterol	20
2.6.1 Ciclodextrina.....	20
2.6.2 Colesterol	21
2.6.3 Adición de colesterol a las membranas plasmáticas	22
2.6.4 Uso de ciclodextrina cargada con colesterol.....	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
3.1 Lugar de estudio.....	26

3.2	De los animales	26
3.3	Materiales.....	26
3.4	Tratamientos.....	26
3.5	Metodología	27
3.5.1	Preparación de medios y soluciones	27
3.5.2	Colección de semen	29
3.5.3	Evaluación macroscópica de semen de alpaca.....	30
3.5.4	Evaluación microscópica de semen de alpaca	30
3.5.5	Etapas de congelación de semen de alpaca.....	36
3.6	Análisis estadístico.....	39
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1	Evaluación de características microscópicas en semen refrigerado y descongelado	41
4.1.1	Vitalidad espermática.....	41
4.1.2	Funcionalidad de membrana espermática	42
4.1.3	Motilidad espermática.....	44
4.2	Evaluación de integridad de acrosoma espermático	47
V.	CONCLUSIONES	50
VI.	RECOMENDACIONES	51
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
VIII.	ANEXOS	62

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Ventajas y desventajas de métodos de colección de semen ensayados en alpacas.	4
Tabla 2: Volumen y pH de semen de alpaca colectado por vagina artificial.	6
Tabla 3: Concentración, motilidad y vitalidad espermática de semen fresco de alpacas colectadas por vagina artificial.	8
Tabla 4: Concentración de ciclodextrina cargada con colesterol utilizada para tratar los espermatozoides y la calidad del espermatozoide observada en varias especies después que fueron criopreservadas.	24
Tabla 5: Efecto de adición de CLC sobre la vitalidad espermática en semen refrigerado y post-descongelado de alpaca.	41
Tabla 6: Efecto de adición de CLC sobre la funcionalidad de membrana espermática en semen refrigerado y post-descongelado de alpaca.	43
Tabla 7: Efecto de adición de CLC en la motilidad progresiva en semen refrigerado y post-descongelado de alpaca.	44
Tabla 8: Efecto de adición de CLC en la motilidad total en semen refrigerado y post-descongelado de alpaca.	45
Tabla 9: Efecto de adición de CLC sobre la integridad de acrosoma en semen refrigerado y post-descongelado de alpacas.	47
Tabla 10: Tiempo registrado de monta de cada macho sobre el maniquí de colección.	68
Tabla 11: Tonalidades de color blanco observados en semen fresco de alpacas colectado por vagina artificial.	68
Tabla 12: Volumen de semen y espuma obtenido por vagina artificial en alpacas.	68
Tabla 13: Media y DS para la concentración, vitalidad, funcionalidad de membrana e integridad de acrosoma en semen fresco de alpaca obtenido por vagina artificial.	69
Tabla 14: Media y DS de motilidad progresiva, motilidad no progresiva y motilidad total en semen fresco de alpaca obtenido por vagina artificial.	69

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Organización de la cabeza del espermatozoide de mamífero.	13
Figura 2: Representación gráfica de la capacidad de la ciclodextrina para encapsular moléculas orgánicas no polares.	20
Figura 3: Diagrama de distribución de tratamientos.	27
Figura 4: Reactivos para la preparación de ciclodextrina cargado con colesterol (a) y dilutor tris (b).	28
Figura 5: Vagina artificial y frazadilla eléctrica para colección de semen (a) y colección de semen de alpaca en maniquí (b).	29
Figura 6: Evaluación del volumen y color del semen fresco de alpaca.	30
Figura 7: Sistema computarizado de análisis de semen (a) y evaluación microscópica de semen de alpaca (b).	31
Figura 8: Observación microscópica de concentración espermática.	31
Figura 9: Observación microscópica de motilidad espermática.	32
Figura 10: Observación microscópica de vitalidad espermática.	33
Figura 11: Observación microscópica de funcionalidad de membrana espermática.	34
Figura 12: Representación esquemática de típicos cambios morfológicos en espermatozoides humanos sometidos a estrés hipoosmótico.	35
Figura 13: Observación de integridad de acrosoma espermático.	36
Figura 14: Diagrama de congelación de semen de alpaca.	37

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1. Materiales utilizados en la investigación.....	63
ANEXO 2. Preparación de medios utilizados	66
ANEXO 3. Registro de tiempo de copula y resultados de variables macroscópicas y microscópicas en semen fresco de alpaca.....	68
ANEXO 4. Análisis de varianza y test de Tukey de vitalidad espermática en semen refrigerado de alpaca.	70
ANEXO 5. Análisis de varianza y test de Tukey de vitalidad espermática en semen post-descongelado de alpaca.	71
ANEXO 6. Análisis de varianza y test de Tukey de la funcionalidad de membrana espermática en semen refrigerado de alpaca.	72
ANEXO 7. Análisis de varianza y test de Tukey de la funcionalidad de membrana espermática en semen post-descongelado de alpaca.	73
ANEXO 8. Análisis de varianza y test de Tukey de motilidad progresiva espermática en semen refrigerado de alpaca.	74
ANEXO 9. Análisis de varianza y test de Tukey de motilidad progresiva espermática en semen post-descongelado de alpaca.	75
ANEXO 10. Análisis de varianza y test de Tukey de motilidad total en semen refrigerado de alpaca.	76
ANEXO 11. Análisis de varianza y test de Tukey de motilidad total de semen post-descongelado de alpaca.	77
ANEXO 12. Análisis de varianza y test de Tukey de integridad de acrosoma espermático en semen refrigerado de alpaca.	78
ANEXO 13. Análisis de varianza y test de Tukey de los resultados de integridad de acrosoma espermático en semen post-descongelado de alpaca.	79

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol (CLC) en la criopreservación de semen de alpaca. El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos – La Raya, de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. El semen de 5 alpacas macho de 5 a 6 años se colectó con vagina artificial, utilizándose 25 eyaculados con motilidad inicial mayor al 50%. La viscosidad de semen fue tratada con una solución de colagenasa al 0.1%, luego la muestra se dividió en 3 tratamientos para la adición de CLC (T1: 0 mg, T2: 2 mg y T3: 4 mg de CLC) e incubado a 37°C durante 15 minutos. Inmediatamente se realizó una primera dilución (1:1) con dilutor Tris + 20% de yema de huevo (YH) y una disminución gradual de temperatura (de 37°C a 4°C) en 2 horas. Después de una segunda dilución (1:1) con dilutor Tris + 20% YH + 12% de glicerol, el semen fue cargado en pajuelas de 0.5 ml, mantenido en refrigeración (4°C) por una hora, y luego congelado sobre vapores de nitrógeno líquido y almacenado a -196°C. Las pajuelas se descongelaron en agua a 37°C por 30 segundos. Se evaluaron la vitalidad, motilidad, funcionalidad de membrana espermática e integridad acrosomal antes y después de la criopreservación. En semen refrigerado no hubo diferencia significativa ($P>0.05$) en las variables evaluadas. En semen post-descongelado se obtuvo vitalidad de 43.81, 48.23 y 48.14%; funcionalidad de membrana de 46.49, 52.34 y 52.90%; motilidad total de 17.06, 19.60 y 22.40% e integridad acrosomal de 67.90, 71.40 y 70.13% para T1, T2 y T3, respectivamente. Se encontró diferencias altamente significativas ($P<0.01$) para vitalidad, funcionalidad de membrana y motilidad total espermática y diferencia significativa ($P<0.05$) para integridad acrosomal, mostrando mejores resultados en T2 y T3. Se concluye que la utilización de metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol en la criopreservación, mejora las características microscópicas del semen de alpaca.

Palabra clave: ciclodextrina, colesterol, criopreservación, semen, alpaca.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effect of cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin (CLC) addition in the cryopreservation of alpaca semen. The study was carried out in the Animal Reproduction Laboratory of the Research Center of South American Camelids - La Raya, National University San Antonio Abad of Cusco. Semen of five alpacas male 5 to 6 years old were collected by artificial vagina, using 25 ejaculates with initial motility greater than 50%. The semen viscosity was treated with a 0.1% collagenase solution, then the sample was divided into 3 treatments for the addition of CLC (T1: 0 mg, T2: 2 mg and T3: 4 mg of CLC) and incubated at 37°C for 15 minutes. Immediately, a first dilution (1:1) was performed with Tris dilutor + 20% egg yolk (YH) and temperature was gradually decreased (from 37°C to 4°C) in 2 hours. After a second dilution (1:1) with Tris dilutor + 20% YH + 12% glycerol, semen was loaded in straws of 0.5 ml, kept refrigerated (4°C) for one hour, and then frozen on vapors of liquid nitrogen and stored at -196°C. The straws were thawed in water at 37°C for 30 seconds. Vitality, motility, sperm membrane functionality and acrosomal integrity were evaluated before and after cryopreservation. In refrigerated semen no significant difference ($P>0.05$) were found in the variables evaluated. In post-thawed semen vitality was 43.81, 48.23 and 48.14%; membrane functionality 46.49, 52.34 and 52.90%; total motility 17.06, 19.60 and 22.40%; and acrosomal integrity 67.90, 71.40 and 70.13% for T1, T2 and T3, respectively. Highly significant differences ($P<0.01$) were found for vitality, membrane functionality and sperm motility, and significant difference ($P<0.05$) was found for the acrosomal integrity, showing T2 and T3 better results. It is concluded that the use of cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin in cryopreservation improves the microscopic characteristics of alpaca semen.

Keyword: cyclodextrin, cholesterol, cryopreservation, semen, alpaca.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú posee la mayor población de alpacas en el mundo y más del 80 por ciento se encuentra en las regiones andinas en propiedad de comunidades campesinas y pequeños productores de baja disponibilidad de recursos, siendo esta crianza, su principal actividad económica. El manejo en general no presenta innovaciones tecnológicas y el aspecto reproductivo en especial es deficiente (FAO, 2005). La aplicación de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, sería una herramienta valiosa que podría tener un considerable impacto en el proceso de mejoramiento genético de esta especie, permitiendo la difusión de características deseables como aporte del macho.

La criopreservación de semen con fines de inseminación artificial es un reto en la crianza de alpacas, principalmente debido a la baja supervivencia espermática después del proceso de congelado - descongelado. Factores tales como, la particular forma de apareamiento, disponer de un método confiable de colección de semen, así como el largo tiempo de copula y las características propias del semen (bajo volumen, baja concentración de espermatozoides y alta viscosidad del plasma seminal), han limitado el desarrollo de un método viable de conservación de semen para esta especie y hasta el momento las investigaciones han tenido éxito limitado.

Existe poca información disponible sobre el uso de dilutores de semen en los camélidos. La mayoría de los dilutores, así como las técnicas de refrigeración y congelación, utilizadas en los últimos 20 años, se han tratado de adaptar de otras especies como vacunos y ovinos (Adams *et al.*, 2009). Igualmente, los bajos porcentajes de preñez, obtenidos mediante la inseminación artificial con semen congelado (Bravo *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2003; Aller *et al.*, 2003) hace necesario realizar mayores investigaciones sobre el comportamiento de los dilutores que ayuden a conservar el semen de estas especies.

Se han demostrado resultados importantes en el porcentaje de espermatozoides que sobreviven a la criopreservación, cuando son tratados con ciclodextrinas cargadas con colesterol antes de la congelación, tal como se ha observado en caballos (Moore *et al.*, 2005), toros (Purdy y Graham, 2004) y carneros (Mocé *et al.*, 2010). También, Crichton *et al.* (2014) obtuvieron buenos resultados en la criopreservación de semen de dromedarios, adicionando colesterol y evaluando las características de motilidad, integridad acrosomal y capacitación espontánea de los espermatozoides.

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo general evaluar el efecto de la adición de metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol en la criopreservación de semen de alpaca; planteando como objetivos específicos: (1) Determinar el efecto de la adición de metil- β -ciclodextrina cargado con colesterol, en las características microscópicas. (2) Evaluar el efecto de la adición de metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol sobre la integridad acrosomal.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Comportamiento sexual de la alpaca macho

En condiciones de campo la conducta sexual observada de alpacas y llamas machos, muestran un incremento de mayor deseo sexual, a medida que se acerca la estación de lluvias (diciembre a abril), para luego disminuir notablemente en la época de ausencia de lluvias (mayo a noviembre), esto se atribuye a una marcada diferencia de niveles de testosterona circulante (García *et al.*, 2005).

En los camélidos sudamericanos el comportamiento sexual, en general presenta características muy particulares como la posición de monta y su temperamento nervioso, que hacen que la obtención de semen tenga muchas dificultades (Bustinza, 2001). Esto ha ocasionado un retraso en el estudio de las características del semen por la difícil obtención de eyaculados de calidad en forma repetible (Giuliano, 2012).

También, se ha observado que el volumen de semen y la concentración espermática oscila con la estación del año, mostrando los niveles más altos de diciembre a febrero; y los más bajos, en el mes de julio, sin variación estacional en la motilidad espermática, viscosidad, pH y porcentaje de espermatozoides con anormalidades (García *et al.*, 2005).

2.2 Colección de semen

Las técnicas de colección de semen están muy desarrolladas en vacunos, ovinos y caprinos, donde es un procedimiento de rutina; debido a su peculiar característica reproductiva en camélidos sudamericanos la colección se hace muy difícil, y no se tiene una técnica óptima o un protocolo recomendado (Pacheco, 2008).

En cada especie, el método de colección de semen debe guardar relación con el comportamiento sexual de los machos (Giuliano, 2012). La utilización de vagina artificial junto a una hembra receptiva es la técnica óptima para obtener semen de buena calidad para

ser utilizado con fines de inseminación artificial, teniendo en cuenta el uso de una fuente de calor continuo y la característica que imite a la cerviz (Vaughan *et al.*, 2003). Las ventajas y desventajas de los diferentes métodos de colección de semen, utilizados en alpacas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1: Ventajas y desventajas de métodos de colección de semen ensayados en alpacas.

Método	Ventajas	Desventajas
Funda vaginal (FV)	Se colecta semen puro.	<ul style="list-style-type: none"> • Difícil fijar la funda intravaginal. • Interfiere con la cópula
Esponja vaginal (EV)	Solo se verifica presencia de espermatozoides.	<ul style="list-style-type: none"> • El semen se diluye y se contamina con los fluidos de la hembra.
Electroeyacuación (EE)	No requiere hembras en celo.	<ul style="list-style-type: none"> • El semen se contamina con la orina
Fistula uretral (FU)	Acorta el tiempo de colección.	<ul style="list-style-type: none"> • Se diluye con fluidos excesivos de las glándulas accesorias. • La operación es difícil y con bajo porcentaje de éxito.
Vagina artificial (VA)	Puede no requerir hembra en celo.	<ul style="list-style-type: none"> • El agua temperada de la VA se enfría y se debe interrumpir la cópula para cambiarla. • Los machos deben ser entrenados.
VA modificada	No se interrumpe la monta	<ul style="list-style-type: none"> • Los machos deben ser entrenados
Desviación de conductos deferentes (DCD)	No requiere hembra. Corto tiempo de colección. Se colecta solo espermatozoides.	<ul style="list-style-type: none"> • Realización de la operación. • Taponamiento de la salida del conducto deferente.

FUENTE: Narváez (2008).

La obtención de semen con vagina artificial presenta la ventaja de no necesitar un equipo de costo elevado y puede ser llevado a cabo por técnicos especializados y la principal desventaja es necesario contar con cierta cantidad de días dedicados al entrenamiento de los machos (Giuliano, 2012).

2.3 Características del semen de alpaca

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino, la porción líquida de dicha suspensión, se conoce como plasma seminal (Hafez y Hafez, 2002).

La composición bioquímica del plasma seminal de los camélidos ha sido descrita e incluye, entre otras cosas, cloruros, calcio, proteínas, lípidos y glucosa en concentraciones similares a los observados en semen de carnero y de toro, pero la concentración de fructosa y ácido cítrico es mucho menor en el plasma seminal de alpaca y camello, probablemente debido a la ausencia de las glándulas vesiculares, que son la principal fuente de fructosa y ácido cítrico en otras especies (Vaughan *et al.*, 2003). El semen de camélidos es altamente viscoso con una baja concentración de espermatozoides, la viscosidad del plasma seminal es el mayor impedimento sobre la investigación en la criopreservación de semen y otras tecnologías de reproducción asistida (Kershaw - Young y Maxwell, 2011).

2.3.1 Características macroscópicas

a. Color

El color de los eyaculados varía de blanco lechoso a blanco cristalino, según la concentración de espermatozoides y el grado de contaminación con otros fluidos, también el color puede ser modificado por la presencia de elementos anormales (Sumar y Leyva, 1981). Las tonalidades del color crema nos indicarían la presencia de concentraciones altas de espermatozoides en los eyaculados (Parichua, 2001).

b. Volumen

En alpacas, los testículos promedian de 3 a 5 cm de longitud y 15 a 18 gr de peso, lo que equivale a 0.02 a 0.03 por ciento del peso corporal en comparación con el 0.18 y 1.4 por en los toros y carneros, respectivamente (Vaughan *et al.*, 2003). En consecuencia, los camélidos

producen menos espermatozoides al día en comparación con los carneros y toros (Kershaw - Young y Maxwell, 2011). En camélidos aproximadamente el 85 por ciento del eyaculado es plasma seminal y el 15 por ciento restantes, son espermatozoides (Bravo *et al.*, 1997). El volumen colectado de semen de alpaca es variable (Tabla 2).

Tabla 2: Volumen y pH de semen de alpaca colectado por vagina artificial.

Volumen (ml)	pH	Autor
1.24 ± 1.17	7.65 ± 0.66	Huanca <i>et al.</i> (2011)
1.2 ± 0.7	7.74 ± 0.6	Gonzales <i>et al.</i> (2011)
1.5 ± 0.9	-	Alarcón <i>et al.</i> (2012)
1.62 ± 1.82	7.54 ± 0.41	Huanca <i>et al.</i> (2012)
1.17	-	Olaguivel y Naveros (2014)

c. pH

En las alpacas, los valores de pH se acercan mucho a la neutralidad, con cierta tendencia a la alcalinidad ligera y aumenta en el semen contaminado con orina, sobre todo en la colección por electroeyaculación (Sumar, 2002). El pH del semen de alpaca está comprendido entre 7.1 a 8.3 y en llamas entre 7.2 a 8.6 (Hanzen *et al.*, 2014).

d. Viscosidad y filancia

La alta viscosidad es común en semen de los camélidos, esto representa un desafío más para desarrollar la inseminación artificial, esta viscosidad natural es el principal obstáculo que impide el desarrollo de la conservación y la inseminación artificial (Morton *et al.*, 2009). También impide la mezcla homogénea del semen con un dilutor, lo que limita el contacto entre la membrana del espermatozoide y los compuestos crioprotectores utilizados en la congelación (Kershaw-Young y Maxwell, 2011).

La concentración de glicosaminoglicanos (GAG) en el plasma seminal de alpaca es 15 veces mayor que en la del carnero y más del 85 por ciento del contenido total de GAG en el plasma seminal de alpaca es sulfato de queratán, y este se correlaciona con la viscosidad (Kershaw-

Young y Maxwell, 2012). Debido a esta alta viscosidad el movimiento de los espermatozoides es lento (Sumar y Leyva, 1981).

Se han utilizado varios tipos de enzimas con la finalidad de disminuir y/o eliminar esta característica. Bravo *et al.* (1999) demostraron que soluciones con una concentración de 1.25 por ciento de tripsina y 5 mg/ml de colagenasa, facilitan la eliminación de la viscosidad y mejoran el manejo del semen de alpaca. Giuliano *et al.* (2010) reportaron que el tratamiento de semen con 0.1 por ciento de colagenasa mejora las propiedades reológicas del semen de llama y facilita la separación de los espermatozoides del plasma seminal. Kershaw *et al.* (2016) indicaron que el uso de papaína en una concentración de 0.1 mg/ml, elimina la viscosidad del semen de alpaca, mientras mantiene la motilidad, viabilidad, integridad acrosomal e integridad de ADN espermático.

La filancia de semen se define como la capacidad de formación de hilo, por lo tanto, es una característica reológica diferente a la viscosidad (Giuliano, 2012). En un estudio en semen obtenido por vagina artificial de 22 alpacas machos, se encontró una filancia de 22.3 - 25.5 mm (Naveros y Contreras, 2014). El tratamiento enzimático disminuye esta característica, se ha reportado 37.3 ± 12.4 mm de filancia en semen normal y 5.0 ± 2.0 mm para semen tratado con colagenasa (Olaguivel y Naveros, 2014).

2.3.2 Características microscópicas

La evaluación macroscópica y microscópica del semen, tiene por finalidad determinar su calidad y calcular el número de dosis que se pueden obtener de un eyaculado, garantizando su eficiencia (Bustinza, 2001). La evaluación del semen es necesaria para implementar planes de manejo reproductivo y que los métodos tradicionales de estimación de la calidad de los eyaculados de diferentes especies se han basado principalmente en la evaluación de la movilidad individual, la morfología espermática y el número total de espermatozoides (Giuliano, 2012).

a. Concentración espermática

La cantidad de espermatozoides es una característica muy variable (tabla 3), nos expresa el número de células espermáticas por ml, por lo que es importante la determinación precisa

del número de espermatozoides, la concentración se mide usando un hemocitómetro, un colorímetro o un espectrofotómetro (Hafez y Hafez, 2002).

La concentración espermática en alpacas varía de 30 000 a 150 millones de espermatozoides por ml y varía considerablemente entre machos, eyaculados y procedimiento de colección de semen (Vaughan *et al.*, 2003). Depende de la secreción de testosterona por los testículos, aumenta con la edad y tamaño del animal e igualmente puede ser modificado por factores como la alimentación, edad, salud y tamaño testicular (Hafez y Hafez, 2002).

Tabla 3: Concentración, motilidad y vitalidad espermática de semen fresco de alpacas colectadas por vagina artificial.

Concentración (10⁶ spz/ml)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	Autor
80.48 ± 69.35	45.9 ± 26.1	52.32 ± 19.18	Huanca <i>et al.</i> (2011)
141.0 ± 86.0	51.3 ± 22.5	-	Gonzales <i>et al.</i> (2011)
80.3 ± 25.5	69.0 ± 14.4	70.8 ± 12.7	Alarcón <i>et al.</i> (2012)
71.87 ± 97.46	41.4 ± 28.3	-	Huanca <i>et al.</i> (2012)
110.18 - 112.36	58.36 - 62.73	78.27 - 84.45	Naveros y Contreras (2014)

Spz: espermatozoides

b. Vitalidad espermática

Esta evaluación proporciona un control sobre la evaluación de la motilidad, ya que el porcentaje de células muertas no debe exceder el porcentaje de espermatozoides inmóviles, se basa en el principio de que las membranas plasmáticas dañadas, como las que se encuentran en las células no vitales (muertas), permiten la entrada de colorantes impermeables a la membrana (WHO, 2010).

Hay varios métodos para determinar la viabilidad espermática, la más usada es la tinción de eosina – nigrosina (Alarcón *et al.*, 2012; Canorio *et al.*, 2015). La técnica de doble tinción utilizado para evaluar conjuntamente la integridad acrosomal, que emplea el colorante Azul tripán como indicador de vitalidad y Giemsa que se adhiere a la matriz acrosomal (Banda *et*

al., 2010; Choez *et al.*, 2013). En la práctica se debe considerar a los espermatozoides vivos pero anormales como muertos, para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos normales (Giuliano, 2012).

Ordoñez *et al.* (2013) reporta valores de 53 y 39% de espermatozoides vivos en semen de alpaca refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. Zirena (2014) utilizando el dilutor comercial Tryladil obtuvo 62.17% y 34.0% de espermatozoides vivos en muestras de semen refrigeradas y post-descongeladas respectivamente, muestras que fueron sometidos a un tratamiento físico de pasaje con aguja y agitación manual para disminución de la viscosidad del semen. García *et al.* (2017) manteniendo dos tiempos de refrigeración en un dilutor tris - yema de huevo, ha obtenido 64.3 y 58.3% de vitalidad para 15°C por 8 horas y 24°C por 24 horas respectivamente. Ccalta *et al.* (2017) reporta 13.82% de vitalidad espermática después de la descongelación en muestras de semen diluidas con ciclodextrina cargada con colesterol (CLC).

c. Motilidad espermática

La motilidad de los espermatozoides constituye un elemento importante para la valoración de la calidad e indica el grado de energía de estos, la evaluación debe ser inmediata a la colección para apreciar la intensidad del movimiento espermático (Sumar y Leyva, 1981). La motilidad es quizás el parámetro más cercano para medir la viabilidad de los espermatozoides, basados en este supuesto, la observación visual de la motilidad es el criterio más comúnmente utilizado para estimar la viabilidad espermática (Aller *et al.*, 2003).

Choez *et al.* (2013) indicaron que las muestras con motilidad inicial mayor a 60% logran mejores porcentajes de motilidad post-descongelamiento, en comparación con las muestras que inician con motilidades menores a 60%. Bustinza (2001) recomienda usar solamente eyaculados con motilidad igual o mayor a 60% o mínima del 50%, para realizar la criopreservación de semen de alpacas.

En alpacas debido a la alta viscosidad del plasma seminal, no se observa “motilidad masal” (no hay remolinos) y la motilidad progresiva individual es muy lenta comparado al ovino y vacuno (Sumar, 2002). La motilidad es mejorada mediante la utilización de enzimas, es así para semen de alpacas obtenido por vagina artificial, Olaguivel y Naveros (2014) obtuvieron un promedio de 22.38 y 40.60%, para eyaculados sin y con tratamiento de colagenasa

respectivamente; y la motilidad post descongelación tuvo un promedio de 12.50 y 24.57% para el grupo sin y con colagenasa, respectivamente.

La motilidad de semen de alpacas colectado por electroeyaculación fue evaluada por Ordoñez *et al.* (2013) que reportan 5.9 y 1.48% de motilidad progresiva en semen refrigerado y post-descongelado, respectivamente; y de 60.67 y 17.59% de motilidad total en semen refrigerado y descongelado, respectivamente; la refrigeración estaba mantenido a 4°C por 24 horas en un Equitainer, utilizaron dilutor tris y glicerol en el protocolo de congelación. Para el mismo método de colección de semen, Flores *et al.* (2015) haciendo un tratamiento de la viscosidad con colagenasa y utilizando dilutor tris y 4% dimetilformamida ha obtenido 2.9 y 0.7% de motilidad progresiva en semen refrigerado y post-descongelado, respectivamente; también, han obtenido 34.7 y 10.4% de motilidad total en semen refrigerado y post-descongelado, respectivamente.

Por otra parte, Zirena (2014) reporta valores de 47.47 y 18.68% de espermatozoides móviles en muestras de semen refrigerado y descongelado respectivamente. García *et al.* (2017) manteniendo dos tiempos de refrigeración en un dilutor tris - yema de huevo, ha obtenido 55.3 y 48.9% de motilidad. Banda *et al.* (2010) evaluaron el efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca, la motilidad espermática en el grupo de leche descremada (17.0%) fue superior ($P < 0.05$) al del grupo tes (8.6%), pero similar al grupo tris (14.0%).

Ccalta *et al.* (2017) reporta 7.45% de motilidad espermática post-descongelado en muestras obtenidos por el método post copula, el tratamiento de viscosidad fue con papaína y adición de CLC, diluido en tris y usando dimetilformamida como crioprotector. En dromedarios, Crichton *et al.* (2014) obtuvieron valores de motilidad en promedio de 65% antes de la congelación. El pre-tratamiento con 1.5mg de CLC dio como resultado una motilidad espermática más alta (44%, $P < 0.05$) post-descongelación. A diferencia de la criopreservación de espermatozoides de dromedario en ausencia de CLC resultaron en una muy baja motilidad espermática total post-descongelado.

d. Funcionalidad de membrana espermática

Los espermatozoides de los camélidos sudamericanos no presentan movilidad progresiva, por lo que es necesario determinar si en el eyaculado existe una población de espermatozoides inmóviles con las membranas funcionales e íntegras, por esta razón el porcentaje de movilidad espermática no sería un estimador de la calidad del eyaculado y la presencia de espermatozoides inmóviles o con poca movilidad sería una condición inherente o propia de estas especies (Giuliano, 2012).

Un protocolo para evaluar la integridad funcional de la membrana de espermatozoides fue desarrollado por Jeyendran *et al.* (1984), una membrana funcional es fundamental para el metabolismo espermático, adecuada capacitación y reacción acrosómica al momento de la fecundación con el óvulo y por ende para la fertilidad del macho.

La prueba de endosmosis (*Hypo-Osmotic Swelling Test*, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo, para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (Jeyendran *et al.*, 1984). La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo, las células con la membrana funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma del flagelo (Quinteros, 2003).

Pacheco *et al.* (2014) evaluó el efecto de la osmolaridad de soluciones sobre la respuesta al test hipoosmótico en espermatozoides de alpaca, los resultados de reacción endosmótica para espermatozoides colectados por vagina artificial fueron de 73.87, 55.80 y 18.73% para soluciones de 50, 100 y 150 mOsmol respectivamente, obteniendo la mejor respuesta endosmótica en espermatozoides incubados en la solución hipoosmótica de 50 mOsmol. Mientras, Quispe *et al.* (2015) al evaluar la reacción hipoosmótica de espermatozoides de alpacas colectado por desviación del conducto deferente y comparando dos tiempos de exposición para la reacción total al estrés hipoosmótico, no encontró diferencia significativa entre 5 y 15 minutos de incubación.

García *et al.* (2017) utilizando un dilutor tris - yema de huevo, ha obtenido 45.3 y 39.8% de funcionalidad de membrana para muestras mantenidas en dos tiempos de refrigeración a 8

horas y 24 horas, respectivamente, utilizando una solución hipoosmótica de 100 mOsmol, durante 60 min a 37 °C. Evaluaciones en medio hipoosmótico de 50 mOsmol, Zirena (2014) reporta 38.50 y 22.82% de espermatozoides con reacción positiva a HOST en semen refrigerado y descongelado respectivamente y Ccalta *et al.* (2017) reporta valores de 13.46% de espermatozoides con membrana funcional en semen descongelado.

Banda *et al.* (2010) usando los dilutores tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca obtuvieron valores de HOS incubados a 150 mOsmol de 24.3, 19.1 y 17.9%, respectivamente, no se encontró diferencias entre grupos en el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional.

e. Integridad de acrosoma espermático

El acrosoma es un organelo membranoso de doble capa ubicada en la parte apical de la cabeza espermática (Figura 1), que contiene distintas enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina (Ugarelli *et al.*, 2017). La determinación de la integridad acrosomal es uno de los parámetros espermáticos de importancia, debido a su papel en la reacción acrosomal que es un proceso exocitótico, que consiste en la fusión del acrosoma con la membrana plasmática, resultando en la exposición y liberación del contenido acrosomal al medio extracelular (Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Por esta razón es muy importante para la fertilización y el empleo de técnicas para su valoración en camélidos sería de utilidad para evaluar los efectos que puedan tener las diferentes biotecnologías (Giuliano *et al.*, 2012).

Hay varias formas de determinar la integridad del acrosoma espermático de los mamíferos: tinción de Coomassie Blue (Larson y Miller, 1999; Huo *et al.*, 2002; Giuliano *et al.*, 2012; Carretero *et al.*, 2015; Crichton *et al.*, 2014; Ccalta *et al.*, 2017), tinción de Giemsa modificado (Bravo *et al.*, 2000), la doble tinción (azul tripán 2% y Giemsa 20%) también usado para determinar la viabilidad espermática (Santiani *et al.*, 2005; Choez *et al.*, 2014; Banda *et al.*, 2010), la triple tinción (azul tripán, rojo neutro y Giemsa) desarrollado por Carretero *et al.* (2015) y uso de microscopia de fluorescencia con uso de lectinas conjugadas al Isotiocianato de Fluoresceína (FITC): *Pisum sativum* (PSA) y *Arachis hypogaea* (PNA) empleadas en (Carretero *et al.*, 2015; Ugarelli *et al.*, 2015; Ugarelli *et al.*, 2017).

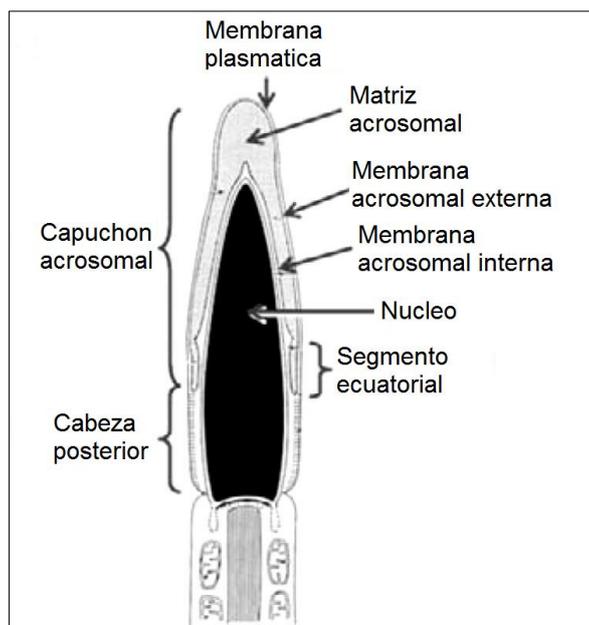


Figura 1: Organización de la cabeza del espermatozoide de mamífero.

FUENTE: Tomado de Rodríguez (2012).

Larson y Miller (1999) demostraron que el estado acrosomal de los espermatozoides de varias especies de mamíferos pueden ser teñidos fácilmente de forma confiable y sin requerir microscopia de fluorescencia usando la tinción de Coomassie Blue (CB). Huo *et al.* (2002) describieron que, mediante la tinción de CB se colorea el capuchón acrosomal en espermatozoides con el acrosoma intacto y no se tiñe la región acrosomal de aquellos espermatozoides que han perdido el acrosoma.

Carretero *et al.* (2015) indican que la evaluación de la integridad acrosómica provee información adicional sobre las funciones espermáticas complementarias a la evaluación seminal de rutina, contribuyendo a un análisis más completo de los eyaculados con el objetivo de mejorar las técnicas de reproducción asistida utilizadas en la especie. Giuliano *et al.* (2012) determinaron que se puede aplicar la tinción de CB para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante una técnica sencilla, utilizando microscopía óptica, y demostró que es posible evidenciar el daño acrosomal producido por la criopreservación de los espermatozoides de llama y mostraron valores de espermatozoides con acrosoma intacto de 74 a 83% para semen refrigerado y de 55 a 68% para semen congelado/descongelado. Ccalta *et al.* (2017) empleando la tinción de CB encontraron 44.97% de integridad acrosomal en muestras de semen congelado con adición de CLC antes de la congelación.

Choez *et al.* (2013) determinaron la viabilidad e integridad acrosomal a través de la técnica de doble tinción, obteniendo los valores máximos usando una concentración de 1.25 M de glicerol y reporta 36% de espermatozoide con acrosoma intacto post-descongelado, partiendo de una muestra con una motilidad mayor al 60%. Por otra parte, Choez *et al.* (2014) encontraron porcentajes más altos de viabilidad/integridad acrosomal post descongelado, utilizando la concentración de 1 M de glicerol y dimetilsulfóxido (DMSO), obteniendo 18.2% y 15.3% respectivamente, en espermatozoides epididimarios de alpaca evaluado a través de la técnica de doble tinción.

Crichton *et al.* (2014) usando una tinción de CB para determinar el daño de la criopreservación sobre la integridad acrosomal en dromedarios, encontraron que hay una significativa disminución (~20-33%) comparado a las muestras refrigeradas (73.5%). Los espermatozoides tratados con CLC antes de la congelación conservaron una alta proporción de acrosoma intacto siguiente al proceso de congelación-descongelación (1.5 CLC, 51.9%; 4.5 CLC, 49.9%) comparado al grupo control (0 CLC, 40%) y no encontraron diferencia ($P>0.05$) en integridad acrosomal entre 1.5 CLC y 4.5 CLC.

Banda *et al.* (2010) evaluaron la vitalidad e integridad acrosomal mediante la técnica de doble tinción espermatozoides de alpaca, obteniendo resultados de vitalidad/integridad acrosomal de 32.6, 26.3 y 27.2% para dilutores tris, tes y Leche descremada, respectivamente, no se encontró diferencias entre grupos en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

Morton *et al.* (2007) evaluaron la integridad del acrosoma de espermatozoides epididimarios de alpacas utilizando la técnica de fluorescencia FITC - PNA, ha obtenido 90.6% en muestras frescas; 86.4, 90.5 y 92.4% de integridad acrosomal en dilutor en base a citrato, lactosa y tris, respectivamente, antes de la congelación y valores de 79.0, 80.0 y 83.4% de integridad acrosomal para dilutor en base a citrato, lactosa y tris, respectivamente, después del descongelado.

f. Morfología y morfometría espermática

La morfología del espermatozoide es un componente esencial de la evaluación seminal, y en muchas especies la disminución del porcentaje de espermatozoides normales esta correlacionado con una disminución de la fertilidad (Ordoñez *et al.*, 2012).

Gonzales (2008) menciona que al evaluar la morfología espermática encontramos diferentes formas de espermatozoides, las formas normales se agrupan en los que tienen cabeza normal y el flagelo completamente entero y no enrollado; también se consideraron espermatozoides normales a los que presentaban una longitud de cabeza promedio de 5.47 μm , un ancho promedio de cabeza de 3.4 μm , una longitud caudal promedio de 40.94 μm y una longitud total promedio de 46.03 μm . Ccalta *et al.* (2017) indican que existe un efecto de la criopreservación sobre el tamaño del área y perímetro de la cabeza del espermatozoide.

2.4 Procedimiento de congelación de semen de alpaca

La congelación de semen tiene varias etapas, que comprende desde la dilución hasta obtener el semen descongelado.

2.4.1 Dilución

Bustinza (2001) menciona que para hacer una adecuada dilución se utiliza la concentración, el volumen del semen, el porcentaje de espermatozoides vivos, muertos y los anormales. La inseminación artificial con semen diluido se puede realizar con un rango de concentración que va de 8 a 16 millones de espermatozoides por ml (Bravo *et al.*, 1999; Cárdenas, 2002; Alarcón *et al.*, 2012; Ordoñez *et al.*, 2013).

2.4.2 Enfriamiento - refrigerado

El proceso de refrigeración también puede utilizarse como método de conservación a corto plazo para lo que necesita diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana en el descenso de temperatura, como la yema de huevo (Choez, 2010).

La refrigeración es la disminución gradual de la temperatura para lograr una baja movilidad, generalmente manteniendo en 4 a 5°C. El tiempo de refrigeración puede ser de una hora (Ordoñez *et al.*, 2013) o de 2 horas (Baca, 1998; Cuba, 2000; Morton *et al.*, 2007).

2.4.3 Adición de crioprotector y envasado

El uso de pajuelas de polivinilo de cloruro (de 0.25 - 0.50 ml) es muy difundido, tiene la ventaja de ocupar menos espacio en el almacenamiento y mejor resultado de congelación, generalmente la muestra de semen es cargada a 4°C por presión negativa y sellado con alcohol polivinilo, las pajuelas de 0.5 ml miden 113 mm de largo por 2.8 mm de diámetro. Morton *et al.* (2007) en un experimento con espermatozoides epididimarios de alpaca, investigaron la congelación de semen en pellets y pajuelas, obteniendo la mejor recuperación de espermatozoides después de la congelación en pellets.

El semen diluido puede ser envasado en forma de pellets (Morton *et al.*, 2007; Ordoñez *et al.*, 2015) y en pajuelas de 0.25 ml (Cuba, 2000; Banda *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2015) y 0.5 ml (Cárdenas, 2002; Aller *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2007; Ordoñez *et al.*, 2013; Zirena, 2014) y sellado con alcohol polivinílico.

2.4.4 Equilibrado, congelación y almacenamiento

El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido (NL), sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas entre los -15 y -60°C que las células experimentan durante la congelación y la descongelación, ya que a -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130°C no existe agua en estado líquido (Choez, 2010).

El tiempo recomendado para el equilibrio es de 45 a 60 minutos y mantenido en refrigeración de 4 - 5°C de temperatura (Baca, 1998; Cuba, 2000; Aller *et al.*, 2013; Ordoñez *et al.*, 2013; Ordoñez *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2015).

La congelación en forma horizontal se hace en un depósito de tecnopor, donde se vierte NL hasta una altura de 4 cm, las pajuelas son colocadas en una gradilla a una altura de 4.5 cm por sobre el NL, y se congela con los vapores por 8 minutos y sumergidas en NL (Cárdenas, 2002), para posteriormente ser transferido a los tanques criogénicos y almacenado a -196°C.

2.4.5 Descongelación

Los procesos de la descongelación se realizaron a 35 - 37°C durante 30 segundos a un minuto (Cuba, 2000; Aller *et al.*, 2003; Cárdenas, 2002; Morton *et al.*, 2007; Ordoñez *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2015), 38°C por 60 segundos (Zirena, 2014), 42°C por 45 segundos (Banda *et al.*, 2010). El éxito final de un procedimiento de congelación está condicionado por el proceso del descongelado, se debe guardar el ritmo de enfriamiento y calentamiento (Choez, 2010).

Cuba (2000) evaluando la motilidad y vitalidad de semen congelado a diferentes tiempos de descongelado: 24 horas, 7, 15 y 30 días; concluye que no hay diferencia entre los diferentes tiempos de almacenamiento.

2.5 Criopreservación de semen

El fin de los protocolos de criopreservación es la de obtener mejores resultados en relación con la supervivencia espermática y la fertilidad del semen al descongelamiento, la criopreservación permite el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas muy bajas, por lo que es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo potencialmente fértil en el tiempo, durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir en la célula espermática, daños letales que comprometen su funcionalidad (Choez, 2010).

Si bien la criopreservación garantiza la supervivencia de los espermatozoides, tiene efectos sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides y es un factor que debe ser considerado en protocolos de tecnologías de reproducción asistida, ya que la fertilidad del semen es el factor más importante para tener en cuenta al implementar nuevas técnicas o procedimientos en programas de IA (Aller *et al.*, 2003). La conservación de espermatozoides y de su capacidad fertilizante exige la reducción o interrupción reversible del metabolismo celular, esto se consigue mediante el uso de dilutores, ya que los procedimientos de refrigeración y congelación deprimen el metabolismo (Choez, 2010).

2.5.1 Dilutores de semen

Los componentes bioquímicos del plasma seminal de camélidos son similares a otras especies de ganado doméstico, por esta razón se sugiere que los diluyentes de semen utilizado para la criopreservación de espermatozoides de carnero y toro serían adecuados para el almacenamiento de semen de camélidos. Sin embargo, a pesar de los intentos de dilución utilizando lactosa, sacarosa, citrato - fructosa y tampones, los dilutores disponibles comercialmente son fabricados para otras especies (Bravo *et al.*, 2000).

Sandoval (2005) menciona que el tris por su capacidad amortiguadora, osmótica y ser de baja toxicidad, aun en altas concentraciones, es empleado en la criopreservación de semen para neutralizar los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides.

Un dilutor debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (albumina sérica de ternero), controlar el pH del medio (bicarbonato, tris, hepes), la presión osmótica (sales NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano mediante la adición de antibióticos (Ávila, 2009).

Para la conservación de semen de alpaca se han probado varios tipos de dilutores, siendo el más usado, el dilutor en base tris + yema de huevo, encontrando motilidad en semen refrigerado de 34 – 60% (Banda *et al.*, 2010; Ordoñez *et al.*, 2013; Zirena, 2014; García *et al.*, 2017) y en semen descongelado de 10 – 35% motilidad (Cárdenas, 2002; Banda *et al.*, 2010; Ordoñez *et al.*, 2013; Zirena, 2014).

Morton *et al.* (2007) en un estudio donde comparan tres tipos de dilutor en base a citrato, lactosa y tris, muestran que la mejor supervivencia espermática post-descongelación se obtuvo para el semen diluido en el medio lactosa (18.2%). Banda *et al.* (2010) evaluando dilutores tris, tes y leche descremada, indica que el grupo leche descremada (17.0%) fue mejor que el grupo tris (14.0%). Santiani *et al.* (2005) evaluaron tipos de dilutores encontrando mejores resultados en el dilutor leche descremada.

2.5.2 Crioprotectores de semen

Los crioprotectores se clasifican en dos grupos: alcoholes (etilenglicol, propilenglicol, glicerol) y amidas (dimetilformamida, dimetilacetamida), un crioprotector ideal debe tener un bajo peso molecular, tener buena solubilidad en el agua y tener mínima toxicidad a los espermatozoides (Zimmermann, 2007). El glicerol, por su bajo peso molecular le permite ingresar a la célula y reemplazar osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento, esto combinado con una velocidad de congelamiento lenta disminuye la formación de cristales de hielo intracelulares (Salamon y Maxwell, 2000).

Los espermatozoides del epidídimo responden mejor a la congelación y descongelación de la misma manera como el semen eyaculado, pero no están atrapados dentro del plasma seminal (Morton y Maxwell, 2006).

Santiani *et al.* (2005) en un estudio para evaluar dos crioprotectores en el congelamiento de semen de alpaca obtenido por VA, licuados por acción mecánica, concluyeron que el crioprotector etilenglicol brindó los mejores resultados. Aller *et al.* (2003) en un estudio en semen de llama, obtuvieron 20.4% de motilidad usando un dilutor con 6% de glicerol y 8% de DMSO. Cárdenas (2002) obtuvo altos valores de motilidad post-descongelado (35.10%), utilizando un dilutor base tris + 30% de yema de huevo y 5% de glicerol.

Choez *et al.* (2014) utilizando un dilutor leche descremada - yema de huevo y fructosa para la recuperación y dilución de los espermatozoides epididimarios de alpaca, los cuales fueron congelados con 8 concentraciones (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 y 1.75 M) de tres tipos de crioprotectores y encontraron que los porcentajes más altos de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal se encontraron en los grupos congelados con glicerol, etilenglicol y DMSO utilizando la concentración de 1 M.

Carretero *et al.* (2013) indican que el semen congelado con dilutor a base de lactosa, yema de huevo y 7% de dimetilformamida presento un porcentaje mayor de movilidad espermática que el obtenido al congelar con el diluyente con 7% de glicerol. Crichton *et al.* (2014) reporta resultados satisfactorios usando metilformamida en la congelación de semen de dromedarios.

Morton *et al.* (2007) en un estudio donde comparan tres tipos de dilutor en base a citrato, lactosa y tris y usando 5, 9 y 3% de glicerol como crioprotector, respectivamente, determinaron los mejores resultados para la congelación de espermatozoides epididimarios de alpaca, en el diluyente en base a lactosa (18.2%). Otros autores usando glicerol como crioprotector encontraron una motilidad post-descongelado de semen de alpaca de ~18% (Ordoñez *et al.*, 2013; Zirena, 2014).

2.6 Ciclodextrina cargada con colesterol

2.6.1 Ciclodextrina

Las ciclodextrinas son una familia de compuestos formados por moléculas de azúcar unidas en forma de anillo (oligosacáridos cíclicos), a veces también son llamadas ciclo amilosas, se obtienen a partir de la degradación enzimática del almidón, el más utilizado como materia prima es la del maíz. Se utilizan en alimentos, productos farmacéuticos, sistemas de administración de fármacos y las industrias químicas, así como la agricultura y la ingeniería ambiental (Crini, 2014).

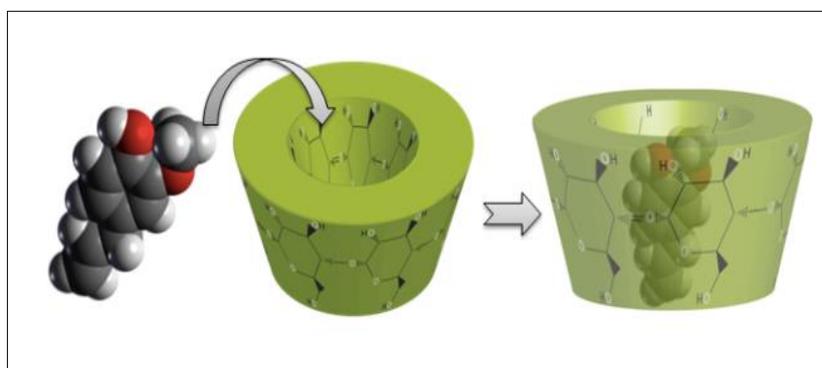


Figura 2: Representación gráfica de la capacidad de la ciclodextrina para encapsular moléculas orgánicas no polares.

FUENTE: Tomado de Kayaci *et al.* (2013).

Típicamente las ciclodextrinas contienen un número de monómeros de glucosa que van de seis a nueve unidades en un anillo, creando una forma de cono, esta molécula presenta una cara exterior hidrofílica que les permite ser solubles en agua y una cavidad interior hidrofóbica que le confiere la capacidad de encapsular compuestos hidrófobos (Figura 2), tales como el colesterol y moléculas orgánicas no polares (Crini, 2014).

Según el número de unidades de glucosa que forman la ciclodextrina esta se nombra con una letra griega diferente: α -Ciclodextrina de 6 moléculas de glucosa, β -Ciclodextrina de 7 moléculas de glucosa, γ -Ciclodextrina de 8 moléculas de glucosa y δ -Ciclodextrina de 9 moléculas de glucosa.

Las ciclodextrinas naturales tienen una solubilidad limitada en agua, por lo que para cambiar sus propiedades físicas y químicas se han desarrollado diversos derivados, uno de los más utilizados son los derivados parcialmente metilados que tienen una solubilidad en agua hasta 150 veces superior, esto se obtiene metilando los grupos hidroxilos libres (Li *et al.*, 2012). En pruebas *in vitro* estas moléculas tienen una alta afinidad por los esteroides y son muy eficientes estimulando la eliminación del colesterol de las membranas de muchos tipos de células (Christian *et al.*, 1997).

2.6.2 Colesterol

Las membranas espermáticas se componen de lípidos y proteínas con los lípidos dispuestos en una bicapa con la cabeza de los grupos de lípidos hidrófilos orientados a la membrana exterior y las cadenas acilo graso hidrófobos en el interior de la membrana. Los lípidos predominantes en la mayoría de las membranas son los fosfolípidos y colesterol (Mocé *et al.*, 2010).

El colesterol es un esteroide que se encuentra en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo de los vertebrados, a pesar de que las cifras elevadas de colesterol en la sangre tienen consecuencias perjudiciales para la salud, es una sustancia esencial para crear la membrana plasmática que regula la entrada y salida de sustancias en la célula.

El colesterol es un compuesto característico de las células animales, su forma incluye un voluminoso núcleo hidrofóbico constituido por cuatro ciclos (hidrocarburo tetracíclico) que llevan una cadena carbónica lateral ramificada de ocho carbonos, que también es de tipo hidrofóbico, en el lado opuesto de esta cadena se observa un grupo alcohol, que es el único grupo hidrofílico de la molécula (Callen, 2000). La solubilidad de colesterol libre en agua es muy baja, al igual que los otros lípidos, pero es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo (CHCl_3).

2.6.3 Adición de colesterol a las membranas plasmáticas

El colesterol es una molécula hidrófoba y no es soluble en diluyentes de semen acuosos. Se han realizado intentos para solubilizar el colesterol mediante su incorporación en liposomas y la adición de estos complejos de colesterol-liposoma a los espermatozoides (Mocé *et al.*, 2010). Recientemente, las ciclodextrinas se han utilizado para insertar o eliminar el colesterol de las membranas celulares. El medio más común de modificar el contenido de colesterol de las membranas celulares es la incubación de células con ciclodextrinas, debido a la presencia de la cavidad relativamente hidrófoba, puede ser utilizado para extraer el colesterol de las membranas celulares (Christian *et al.*, 1997).

Por otra parte, en condiciones de uso común para la extracción de colesterol, las ciclodextrinas pueden eliminar el colesterol de ambos lados de la membrana, así como alterar la distribución del colesterol entre el plasma y las membranas intracelulares. Además, otras moléculas hidrófobas tales como fosfolípidos también pueden ser extraídos de las membranas por las ciclodextrinas (Zidovetzki y Levitan, 2007). Además, son capaces de transferir el colesterol (si han sido pre saturadas con colesterol) o de extraer el colesterol (en caso de que no hayan sido pre saturadas) de las membranas de muchos tipos de células, incluidos los espermatozoides, esta transferencia se cree que se produce mediante gradiente de concentración (Moore *et al.*, 2005).

La membrana plasmática de los espermatozoides juega un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad celular, y constituye una de las estructuras más dañadas durante la congelación (Tomás, 2007). Se ha observado que cuando los espermatozoides comienzan el proceso de cambio de fase líquida a gel su longevidad se ve disminuida y uno de los primeros pasos en el proceso de capacitación es la pérdida de colesterol de sus membranas (Curry, 2000). Por una parte, se sabe que el colesterol estabiliza las membranas y disminuye la temperatura a la cual se produce el cambio de fase líquida a gel, por otra parte, los daños que se producen en las membranas son muy similares al estadio de la capacitación denominado crio-capacitación (Gillan *et al.*, 1997).

En teoría, si se consiguiera incorporar colesterol a las membranas plasmáticas, se podría alcanzar una mayor tasa de colesterol/fosfolípidos y por tanto los espermatozoides descongelados deberían estar menos capacitados y sus membranas deberían ser más estables,

alcanzando una tasa colesterol/fosfolípido similar a las membranas plasmáticas de especies resistentes al shock térmico (conejo y humano con 0,88 y 0,90 respectivamente) (Mocé y Graham, 2006).

2.6.4 Uso de ciclodextrina cargada con colesterol

El tratamiento de espermatozoide con ciclodextrinas cargados con colesterol (CLC) antes de la criopreservación; por lo general, mejora la calidad espermática después de la congelación - descongelación, tal como se determinó en diferentes especies (tabla 4).

En semen de vacuno se observaron diferencias significativas en viabilidad y motilidad entre espermatozoides tratados con ciclodextrinas cargadas con colesterol y sin tratamiento (Purdy y Graham, 2004; Viñan, 2017). En caprinos, Tomás (2007) observó que los espermatozoides tratados con metil- β -ciclodextrina cargado de colesterol incrementaron la calidad de los espermatozoides post-descongelación hasta en 7.9 y 12.8%. Del mismo modo, en carneros se han observado mejoras en la supervivencia a la criopreservación, en los espermatozoides tratados con ciclodextrina cargada con colesterol (Mocé y Graham, 2006; Castillo, 2017).

En caballos, se han observado mayores porcentajes de recuperación de espermatozoides móviles y espermatozoides con membrana íntegra, cuando son tratados con metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol antes de la criopreservación (Moore *et al.*, 2005; Mesa y Henao, 2012). Del mismo modo en burros, Álvarez *et al.* (2006) observaron diferencias significativas en motilidad y vitalidad para espermatozoides tratados con metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol.

En porcinos el tratamiento de espermatozoides con ciclodextrina cargada con colesterol se ha reportado mejoras en el porcentaje de motilidad, integridad de membrana, integridad de acrosoma (Zeng y Terada, 2001), aumento de la viabilidad y una mayor inhibición de la capacitación de espermatozoides (Galantino-Homer *et al.*, 2006). En dromedarios el tratamiento con 1.5 y 4.5 mg de metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol obtuvieron una mayor viabilidad espermática, obteniendo una motilidad de 44% en semen descongelado con una concentración de 1.5 mg de CLC, en comparación con el grupo control (Crichton *et al.*, 2014).

Tabla 4: Concentración de ciclodextrina cargada con colesterol utilizada para tratar los espermatozoides y la calidad del espermatozoide observada en varias especies después que fueron criopreservadas.

Especies	Concentración	Motilidad espermática Total (%)		Integridad de membrana Plasmática (%)		Autores
		Control	+ Col.	Control	+ Col.	
Toro	1.5 mg/120 x10 ⁶ spz	42	60	46	55	Purdy and Graham (2004)
	1.5 mg/120 x10 ⁶ spz			60	76	Purdy et al. (2005)
	2 mg/120 x10 ⁶ spz	58	58	45	62	Mocé and Graham (2006)
	1.5 mg/120 x10 ⁶ spz	40	54	30	= 50	Amorim et al. (2009)
	1.5 mg CLC x10 ⁶ spz	32	56			Moraes et al. (2010)
Garañón	0.125 mmol col/L	43-52	63-67	35.8-39.7	53.2-60.5	Combes et al. (2000)
	0.125 mM	69	67	44	49	Zahn et al. (2002)
	1.5 mg CLC/120 x10 ⁶ spz	62	72	47	56	Moore et al. (2005)
	1.5 mg CLC/120 x10 ⁶ spz	37	51			Spizziri et al. (2010)
	1.5 mg/120 x10 ⁶ spz	Motilidad similar		~20	~34	Oliveira et al. (2010)
Burro	2 mg/120 x10 ⁶ spz	30	45	23 (LAI)	31 (LAI)	Álvarez et al. (2006)
	2.5 mg CLC/120 x10 ⁶ spz	42	52	53	57	Barrera-Compean et al. (2005)
Caprino	1 mg CLC/120 x10 ⁶ spz	42	48	40	49	Tomás et al. (2008)
	2 mg CLC/120 x10 ⁶ spz	28	46-45	24	45-47	Mocé et al. (2010)
Carnero	2 mg CLC/120 x10 ⁶ spz	36	38	41	49	Purdy et al. (2010)
	20 mM HBC + 5 mM col y 500 x10 ⁶ spz/ml	35	52	8	13	Zeng and Terada (2000)
Verraco	20 mM MBC + 10 mM col y 500 x10 ⁶ spz/ml	31	31			Zeng and Terada (2001)
	1.5 mg/120 x10 ⁶ spz	37	46			Torres et al. (2009)
	1 mg/120 x10 ⁶ spz	57	63			Tomás et al. (2009b)
Ratón	1-2 mg CLC sonificado/ml.	29	66-71			Movassaghi et al. (2009)
	2 mg/120 x10 ⁶ spz	9-52	38-55			Loomis and Graham (2008)
Conejo	5 mg/120 x10 ⁶ spz	14	17	33	31	Mocé and Graham (2005)
Trucha arcoiris	0.4 µmol col (5 µmol MBC /10 ⁹ spz)	3-15	3-15			Müller et al. (2008)

+ Col., espermatozoide tratado con CLC antes de la criopreservación; LAI, acrosoma intacto vivo; HBC, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina; col, colesterol; MBC, metil-β-ciclodextrina; spz, espermatozoide.

FUENTE: Mocé et al. (2010).

Mocé et al. (2010) indicaron que el tratamiento de los espermatozoides con CLC antes de la criopreservación mejora las tasas de supervivencia, cuando se evalúa un solo parámetro (porcentaje de motilidad total o membrana plasmática intacta) o ambos la motilidad y la viabilidad. Estas mejoras pueden ser tan bajas como dos puntos porcentuales, o pueden ser tan alta como 24 puntos porcentuales. Sin embargo, la mayoría de los estudios reportan mayores tasas de supervivencia de 10 - 20 puntos porcentuales (tabla 4). No obstante, el beneficio del tratamiento CLC sobre las tasas de crio-supervivencia es diferente para el espermatozoide de diferentes especies, líneas dentro de una especie, diferentes machos y para espermatozoides sexados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos de La Raya (CICAS – La Raya), perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicado en el Distrito de Maranganí, Provincia de Canchis, Departamento de Cusco. La fase experimental del estudio se realizó en los meses de enero a junio del 2017.

3.2 De los animales

Los animales considerados para la colección de semen fueron 05 alpacas machos, seleccionados del plantel de reproductores del Centro Experimental, entre 5 a 6 años, sin problemas reproductivos, aparentemente sanos y con fertilidad comprobada. Los machos fueron seleccionados por su aceptación a la vagina artificial en el maniquí de colección y estuvieron sometidos a las mismas condiciones de manejo, alimentación y de ambiente.

3.3 Materiales

Todos los equipos, materiales de laboratorio, reactivos e insumos utilizados en esta investigación están detalladas en el anexo 1.

3.4 Tratamientos

Se ha planteado tres tratamientos, para lo cual las muestras de semen fueron divididas en tres partes (figura 3).

- T1: 0 mg de CLC o grupo control.
- T2: 2 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides.
- T3: 4 mg de CLC por cada 120 millones de espermatozoides.

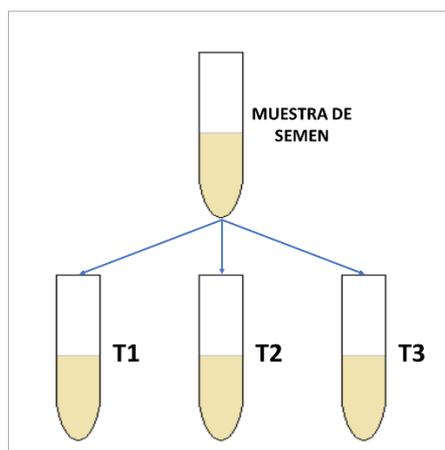


Figura 3: Diagrama de distribución de tratamientos.

3.5 Metodología

3.5.1 Preparación de medios y soluciones

a. Medio Tyrode's Albumina Lactato Piruvato

Se ha utilizado un medio Tyrode's Albumina Lactato Piruvato (TALP) según descrito por Parrish *et al.* (1988), modificado por Crichton *et al.* (2014), ver Anexo 2.

b. Solución de colagenasa tipo I

La preparación de colagenasa tipo I, fue preparado según descrito por Giuliano *et al.* (2010).

- Se pesó 10 mg de colagenasa tipo I, en balanza de precisión protegida del ambiente (debido a la higroscopicidad del producto).
- Luego fue vertido en un vaso de precipitado, que contenía 10 ml de medio TALP y homogenizado lentamente, obteniendo una solución con una concentración final de 0.1% de colagenasa.
- Finalmente fue almacenado en viales de 1 ml y conservado en la refrigeradora hasta su uso.

c. Solución de Ciclodextrina cargado de Colesterol

La solución de CLC fue preparada (figura 4a) según lo descrito por Purdy y Graham (2004).

- En un tubo de ensayo de vidrio se disolvieron 200 mg de colesterol en 1 ml de cloroformo.
- En otro tubo de ensayo se diluyó 1 g de metil- β -ciclodextrina en 2 ml de metanol.

- Una alícuota de 450 μl de la solución de colesterol fue adicionado a la solución de ciclodextrina y fue mezclado hasta que la solución estaba homogénea.
- La solución anterior fue vertida a una placa Petri de vidrio, con la finalidad de remover el líquido mediante secado a 37°C por dos días (Mocé *et al.*, 2014).
- Los cristales resultantes fueron removidos de la placa Petri y almacenados en un tubo de vidrio tapado y almacenados a 22°C hasta su uso.

La solución de trabajo de CLC fue preparada agregando 50 mg de CLC a 1 ml de medio TALP, homogenizado en un Vortex, e incubado en baño maría a 37°C al momento de ser utilizado.



Figura 4: Reactivos para la preparación de ciclodextrina cargado con colesterol (a) y dilutor tris (b).

d. Preparación de dilutor

Para la presente investigación se ha utilizado dos tipos de dilutor: un **dilutor A** (Tris + yema de huevo) y otro **dilutor B** (Tris + yema de huevo + glicerol). Para la preparación de los dilutores ver Anexo 2.

El dilutor A se ha utilizado en la etapa de inicio de la refrigeración y el dilutor B que contenía dos veces la concentración final deseada de glicerol (6%), se ha utilizado para la etapa de equilibrado.

3.5.2 Colección de semen

La colección de semen fue por el método de la vagina artificial, el cual consistía de un tubo rígido de 17 cm, una funda interior de látex enrollado en los extremos y ajustado con bandas de goma (figura 5a), un cono de colección de látex que tiene incorporado un resorte espiral de 2 cm de longitud y media pulgada de diámetro que tenía la función de simular una cerviz, el tubo para la colección era un tubo de centrifuga de 14 ml colocado al extremo del cono de látex, el cual estaba protegido de la luz solar y la temperatura ambiental.

Para mantener constante la temperatura interior de la vagina artificial a 37°C, se ha utilizado agua caliente (52°C) y también aire para mantener la presión de las paredes internas de la vagina artificial. Por el largo tiempo de duración de la copula, la vagina artificial fue envuelta con una frazadilla eléctrica (figura 5a) para mantener una temperatura constante de 36 – 37°C por el tiempo necesario que duró la copula. La vagina artificial fue montada y asegurada por debajo y dentro del maniquí (figura 5b). Se ha registrado el tiempo de monta de cada macho, en cada colecta realizada.



Figura 5: Vagina artificial y frazadilla eléctrica para colección de semen (a) y colección de semen de alpaca en maniquí (b).

La colección de semen ha constado de 2 etapas:

a. Etapa pre-experimental

Período utilizado en la selección de machos y el entrenamiento para la aceptación de estos al maniquí de colección y la vagina artificial. Esta etapa de entrenamiento fue de 3 semanas.

b. Etapa experimental

En esta etapa se realizaron colecciones semanales, hasta completar las 5 colectas requeridas a cada macho. Muestras con bajo volumen, motilidad y concentración fueron descartados.

3.5.3 Evaluación macroscópica de semen de alpaca

La evaluación de las características macroscópicas fue realizada inmediatamente después de cada colecta, por observación directa de cada muestra.

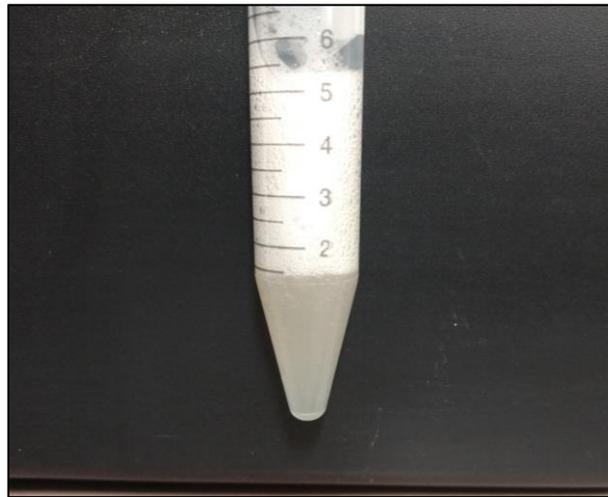


Figura 6: Evaluación del volumen y color del semen fresco de alpaca.

El volumen de semen se determinó comparando con la escala graduada del tubo colector y expresado en ml, también se registró la cantidad de espuma que había formado; el color fue evaluado determinando las tonalidades de blanco que presentaba cada muestra: blanco cremoso, blanco lechoso y blanco lechoso claro (figura 6).

3.5.4 Evaluación microscópica de semen de alpaca

La evaluación de las características microscópicas de semen se realizó en un microscopio de contraste de fases con platina térmica (UOP-UB200i) y videocámara (Proiser ISAS® 782C), conectado a una computadora (ISAS® v. 1.2) (figura 7a).

Las evaluaciones se realizaron en semen fresco, etapa de equilibrio y post-descongelado. Las características evaluadas (figura 7b) fueron la concentración, vitalidad, motilidad, funcionalidad de membrana espermática e integridad de acrosoma.



Figura 7: Sistema computarizado de análisis de semen (a) y evaluación microscópica de semen de alpaca (b).

a. Concentración espermática

Para el análisis de la concentración se ha utilizado un sistema computarizado de análisis de semen (ISAS, *Integrated Semen Analysis System*), para esta evaluación se colocaron dos alícuotas de 5 μ l de la muestra de semen, sobre una lámina portaobjetos, sobre ellos se puso una laminilla cubreobjetos y observado a 100x en microscopio, se tomaron 10 fotogramas de varios campos y analizadas en el módulo ISAS (figura 8).

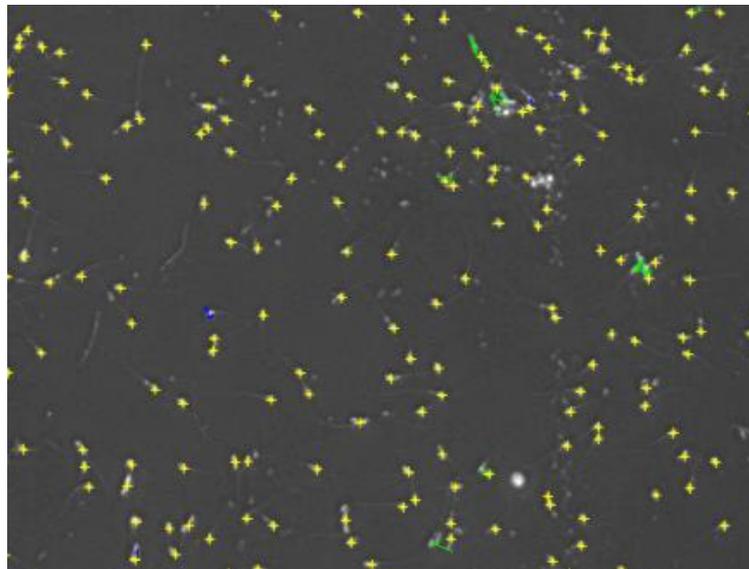


Figura 8: Observación microscópica de concentración espermática.

b. Motilidad espermática

Para la evaluación de motilidad, previamente se calentó una lámina portaobjetos a 37°C (sobre la platina caliente equipada en el microscopio) y con una micropipeta se colocó dos alícuotas de 5 µl de la muestra de semen, seguidamente se puso una laminilla cubreobjetos a la misma temperatura. La muestra fue observada en microscopio a 200x (figura 9) y se observaron varios campos diferentes del portaobjeto, los que fueron registrados en videos (25 cuadros/segundo) en el módulo de motilidad del ISAS.

Los videos fueron observados para clasificar y categorizar el tipo de espermatozoide, de acuerdo con lo establecido por WHO (2010), la motilidad de cada espermatozoide se clasifica de la siguiente manera:

- Motilidad progresiva: los espermatozoides se mueven activamente, ya sea linealmente o en un círculo grande, independientemente de la velocidad.
- Motilidad no progresiva: todos los demás patrones de motilidad con ausencia de progresión, por ejemplo, nada en pequeños círculos, la fuerza flagelar apenas desplaza la cabeza, o cuando solo se puede observar un latido flagelar.
- Sin movimiento o estático.

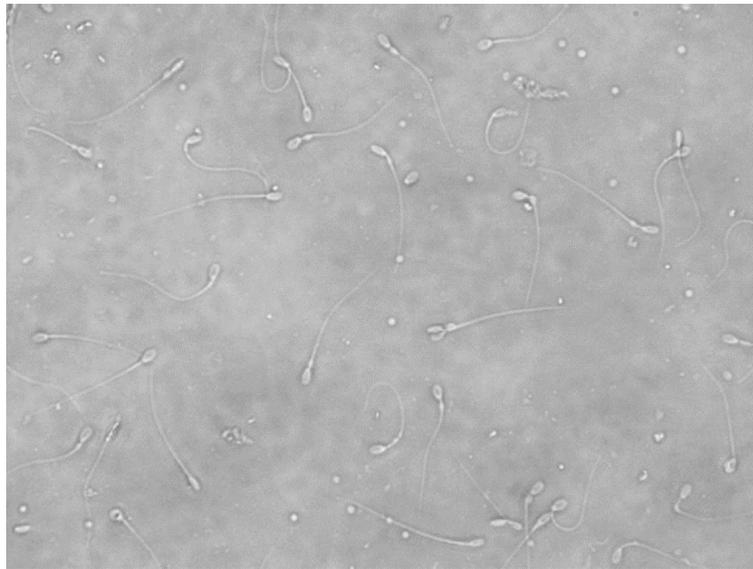


Figura 9: Observación microscópica de motilidad espermática.

El porcentaje de motilidad total se ha calculado por la sumatoria del porcentaje de motilidad progresiva y motilidad no progresiva. Para la congelación de semen se ha considerado una

motilidad total en semen fresco mayor a 50%, muestras con valores menores fueron descartados.

c. Vitalidad espermática

Se utilizó la tinción de Eosina – Nigrosina. La metodología de coloración es la siguiente:

- Al inicio de la tinción, los colorantes estaban mantenidos a 37°C, con el fin de evitar el shock térmico en los espermatozoides.
- Luego, se tomó 10 µl de la muestra de semen y se colocó sobre un portaobjetos templado a 37°C sobre una platina caliente.
- Primero se agregó 10 µl de Eosina G (colorante rojo), se homogenizó la muestra con un tip y luego se agregó 10 µl de Nigrosina (colorante negro) y se homogenizó nuevamente utilizando otro tip; Se dejó reposar un minuto, se hace el frotis y finalmente se dejó secar al aire.
- La muestra se observó en microscopio a 400x (figura 10), contando un mínimo de 200 espermatozoides en diferentes campos del portaobjetos.

Según WHO (2010), los espermatozoides con cabeza roja o rosa oscuro son considerados muertos (membrana dañada), mientras espermatozoides con cabeza blanca o rosa claro son considerados vivos (membrana intacta), ver figura 10. El resultado fue expresado como porcentaje.



Figura 10: Observación microscópica de vitalidad espermática.

d. Funcionalidad de la membrana espermática

Esta evaluación se realizó con la prueba de HOST (*Hipo-Osmotic Swelling Test*), que consiste en la exposición de los espermatozoides en un medio hipoosmótico. Para esta prueba fue necesario la preparación de dos medios. Una **solución hipoosmótica** que fue preparado de acuerdo con el protocolo de Vásquez (2012), para una osmolaridad de 50 mOsmol, compuesto por 0.0245 gr. de citrato de sodio dihidratado y 0.045 gr. de D-fructosa, disueltos en 10 ml de agua bidestilada y una **solución formolada**, que consiste en 1 ml de la propia solución hipoosmótica, más 3 μ l de formaldehído al 40% (Giuliano et al, 2002).

Para esta prueba se usó los siguientes pasos.

- Inicialmente se calentó un vial rotulado que contenía 100 μ l del medio hipoosmótico temperado a 37°C en un baño seco, al cual se añadió 25 μ l de muestra de semen, que fue homogenizado lentamente e incubado por espacio de 15 minutos a 37°C.
- Para detener la reacción se añadió 31 μ l de la solución formolada, luego fue homogenizado y enfriado a temperatura ambiente.
- Finalmente 5 μ l de la muestra incubada fue depositado sobre un portaobjetos y tapado con un cubreobjetos y observado en microscopio a 400x (figura 11), se contaron un mínimo de 200 espermatozoides por muestra.



Figura 11: Observación microscópica de funcionalidad de membrana espermática.

El conteo y clasificación de los espermatozoides (figura 12) fue de acuerdo con lo descrito por WHO (2010), se consideraron espermatozoides con membrana funcional, los que reaccionaron al estrés hipoosmótico mediante la hinchazón de la parte distal de la cola (b - g), mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola (a) fueron considerados como funcionalmente dañados. Los resultados se expresaron en porcentaje de la reacción total de espermatozoides con membrana funcional.

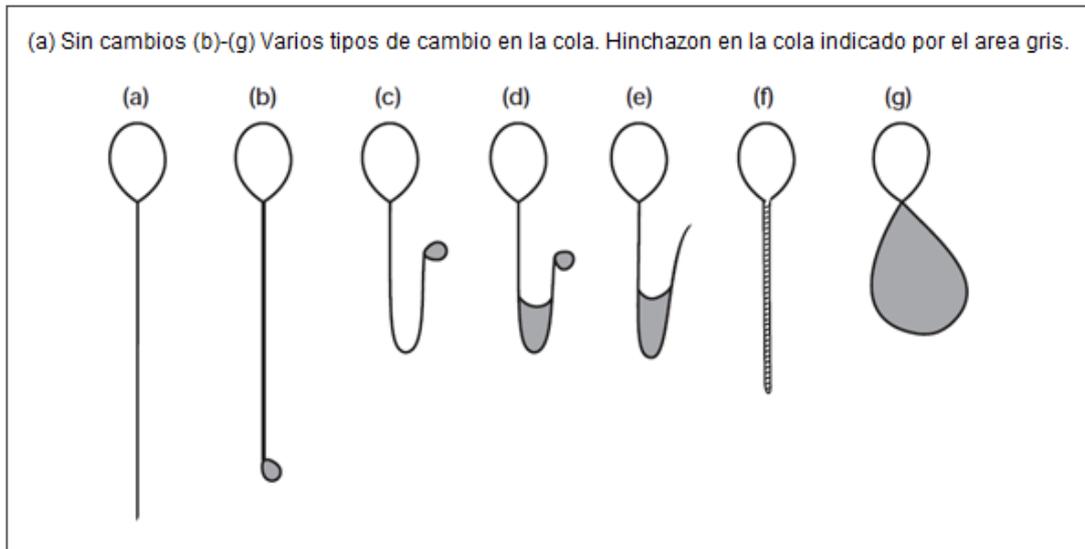


Figura 12: Representación esquemática de típicos cambios morfológicos en espermatozoides humanos sometidos a estrés hipoosmótico.

FUENTE: Jeyendran *et al.* (1984); Adaptado por WHO (2010).

e. Integridad de Acrosoma espermático

La tinción de proteínas acrosomales con coomassie blue, fue mediante la técnica descrita por Fumuso *et al.* (2014). Para ello se ha seguido el siguiente procedimiento:

- Se realizó un frotis, utilizando 10 μ l de muestra de semen y se dejaron secar al ambiente.
- Los frotis se fijaron con paraformaldehído al 4% en medio salino fosfato tamponado (PBS) por 15 minutos, luego fue lavado y/o enjuagado en medio PBS y se dejó secar por 2 minutos.
- Cada placa fue teñida con Coomassie Blue al 0.22% (Anexo 2) por 5 minutos, después se lavaron tres veces con agua destilada para evitar el exceso del colorante y finalmente las placas se dejaron secar a temperatura ambiente.

- La evaluación se hizo en microscopio a 1000x bajo aceite de inmersión (figura 13), se hizo el conteo de un mínimo de 100 espermatozoides y categorizado como intacto o dañado.

Los patrones visualizados fueron células con membrana acrosomal intacto que exhibieron coloración azul uniforme en la región acrosomal suprayacente (teñido) y un espermatozoide dañado o no intacto mostraron un área limpia (no coloreado) o coloración irregular de la región acrosomal suprayacente (no teñido), ver figura 13.



Figura 13: Observación de integridad de acrosoma espermático.

3.5.5 Etapas de congelación de semen de alpaca

La congelación de semen involucra una serie de pasos que inician desde la obtención de la muestra de semen y culmina con la evaluación de semen post-descongelado (figura 14).

a. Adición de colagenasa

Con la finalidad de disminuir la viscosidad presente en el semen de alpaca, se añadió a cada eyaculado una solución de colagenasa al 0.1% en una proporción (semen: colagenasa; 4:1) y fue incubado por 4 minutos a 37°C (Giuliano *et al*, 2010), luego esta muestra fue centrifugado a 3000 rpm durante 5 min., con lo que se obtuvo dos fracciones, una fracción sobrenadante y una fracción sedimentada (pellets); se elimina la fracción sobrenadante (2/5 partes del volumen total). Luego la muestra es homogenizada lentamente utilizando un vortex.

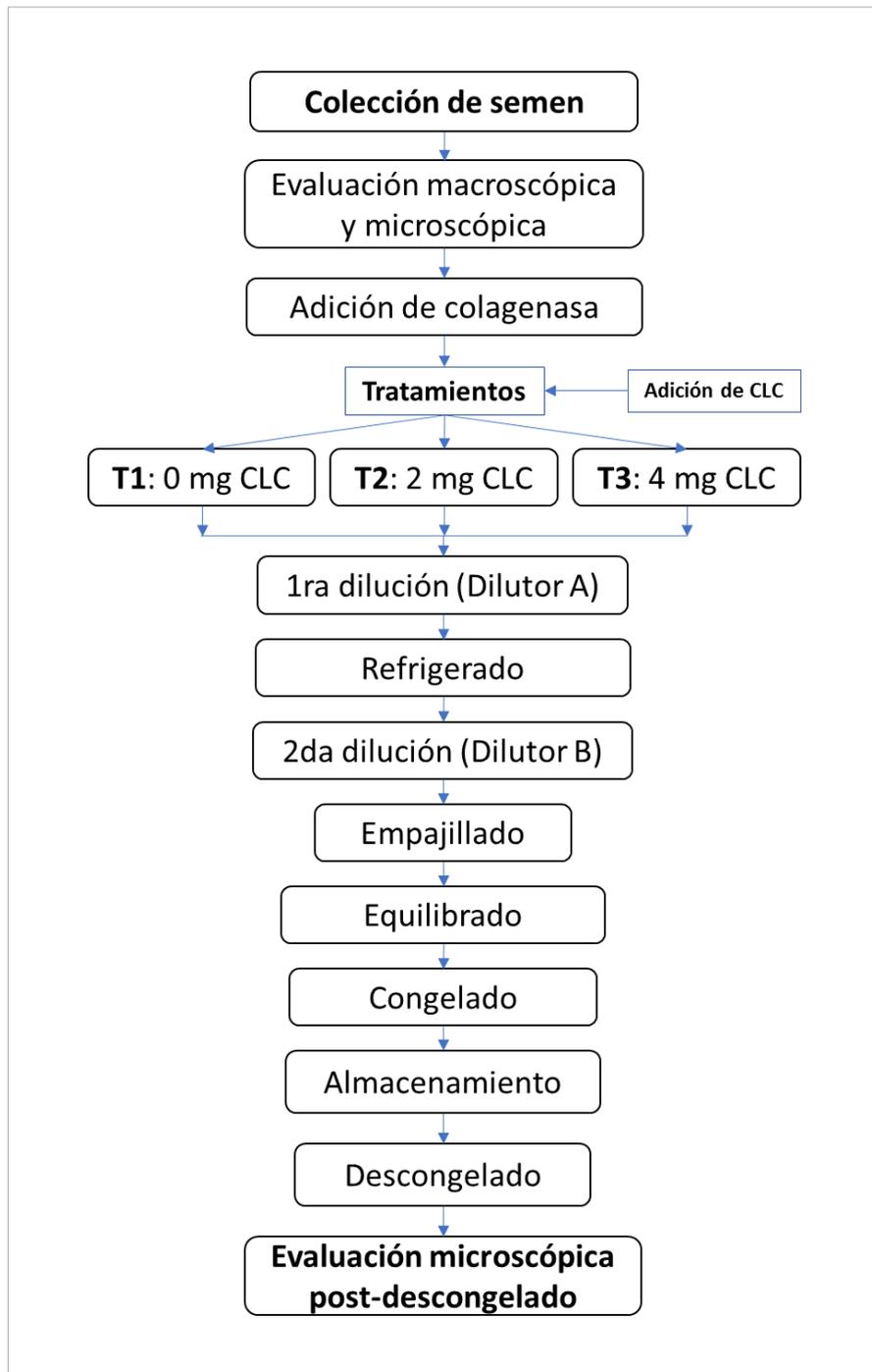


Figura 14: Diagrama de congelación de semen de alpaca.

b. Primera dilución

Después de la adición e incubación con CLC, la muestra de semen fue diluida en una relación de 1:1 con el dilutor A, que fue previamente calentado en baño maría hasta una temperatura de 37°C, para evitar el choque térmico en los espermatozoides; y fue agregado lentamente por las paredes del tubo y homogenizado suavemente.

c. Refrigerado

El enfriamiento se hizo inmediatamente después de la dilución, para ello fue necesario el uso de un recipiente con agua a 37°C, de forma que la muestra de semen quedara rodeada por el agua y de este modo controlar la disminución acelerada de la temperatura. El recipiente fue colocado en la refrigeradora, de tal manera que la temperatura descienda gradualmente desde los 37°C hasta los 4°C en un tiempo de 2 horas.

d. Segunda dilución

Esta etapa consiste en hacer una nueva dilución, con el objetivo de incorporar el crioprotector a la muestra de semen, para ello el dilutor B se mantuvo en refrigeración a 4°C para mantener la misma temperatura que la muestra de semen. El Dilutor se agregó lentamente por las paredes del tubo, se mezcló lenta y suavemente. La dilución se hizo en una relación de 1:1 obteniendo una concentración final de 6% de glicerol.

e. Envasado y equilibrado

Previamente se hizo la identificación de las pajillas, codificadas con el número del macho, la cantidad de CLC y la fecha de colección y fueron mantenidos en refrigeración, junto con la muestra de semen refrigerada. Luego de la segunda dilución, con la ayuda de una jeringa de tuberculina modificada para facilitar el envasado, se procedió a cargar manualmente las pajillas de 0.5 ml., dejando un espacio de aire a un lado de ellas, el sellado de las pajillas se hizo con alcohol polivinílico, inmediatamente después se colocó dentro de una bandeja de agua temperada a 4°C. Todo este procedimiento se hizo dentro de la refrigeradora para evitar los cambios de temperatura. Las pajillas se mantuvieron a 4°C en el refrigerador durante 1 hora más, con la finalidad de que los espermatozoides entren en equilibrio con el crioprotector. Concluido tiempo de equilibrado, hizo una evaluación microscópica de la muestra para observar la calidad espermática antes de la congelación.

f. Congelación y almacenado

El método de congelación de las pajillas fue del tipo horizontal, para esto se utilizó una caja de tecnopor, en donde fue vertido una porción de nitrógeno líquido hasta tener una altura de 2 cm, las pajillas de semen se secaron cuidadosa y rápidamente con papel toalla y luego fueron ubicados en una gradilla, a 5 cm de altura sobre el nitrógeno líquido, donde los vapores congelaron las pajillas por un tiempo de 10 minutos, pasado este tiempo las pajillas

se dejaron caer en el nitrógeno líquido, por espacio de 10 minutos más; las pajillas congeladas fueron ubicados en los globets y porta-globets y posteriormente introducidos y colocados en canastillas dentro del tanque de nitrógeno, para ser almacenados a -196°C .

g. Descongelado

La descongelación se hizo después de 6 días de congelada la muestra, utilizando para esto una pinza de plástico, con la que se procedió a sacar las pajillas del tanque de nitrógeno, rápida y cuidadosamente fue sumergido en el termo que contiene agua temperada a 37°C durante 30 segundos, para luego secar las pajueltas y trasvasar el contenido en viales y hacer la respectiva evaluación microscópica.

3.6 Análisis estadístico

El análisis de las variables macroscópicas y microscópicas en semen fresco se hicieron utilizando la estadística descriptiva. Las variables en evaluación fueron sometidos a un test de normalidad para verificar si se ajustaban a una distribución normal, para lo cual los datos porcentuales fueron transformados a su valor Arcoseno ($y' = \text{Arcoseno } \sqrt{Y}$).

Para la evaluación estadística de motilidad, vitalidad, funcionalidad de membrana espermática e integridad de acrosoma espermático en muestras de semen refrigerado y descongelado se utilizó un Análisis de Variancia con un Diseño Completamente al Azar Jerárquico y para el análisis de la comparación de medias se utilizó el test de Tukey.

El modelo aditivo lineal aplicado a la investigación es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + C(A)_{k(j)} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

i = Tratamientos (3)

j = Animales (5)

k = Colectas (5)

Y_{ijk} = Es la observación de la k-esima colecta de semen dentro del j-esimo macho en el i-esimo nivel de CLC.

μ = Media poblacional

T_i = Es el efecto del i-esimo nivel de CLC (tratamiento).

A_j = Es el efecto del j-esimo animal.

$C(A)_{k(j)}$ = Es el efecto de la k-esima colecta dentro de j-esimo animal.

ε_{ijk} = Error experimental.

Todos los análisis estadísticos se hicieron, empleando un paquete estadístico.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación de características microscópicas en semen refrigerado y descongelado

4.1.1 Vitalidad espermática

Al evaluar la vitalidad espermática en semen refrigerado no se encontró diferencias significativas ($P>0.05$) entre tratamientos. En la tabla 5, se muestra los valores promedios para cada tratamiento y no se observa el efecto de adición de CLC, mostrando que los valores son estadísticamente iguales, esto se relaciona principalmente a que la adición de CLC tiene un efecto positivo después de la criopreservación.

Tabla 5: Efecto de adición de CLC sobre la vitalidad espermática en semen refrigerado y post-descongelado de alpaca.

Momento de observación	Vitalidad espermática (%)		
	T1 0 mg CLC	T2 2 mg CLC	T3 4 mg CLC
Muestras refrigeradas	60.59 ± 6.96 ^a	60.89 ± 7.52 ^a	60.08 ± 7.15 ^a
Muestras post-descongeladas	43.81 ± 6.68 ^b	48.23 ± 7.67 ^a	48.14 ± 6.25 ^a

Medias ± DS con diferente letra en la misma fila muestran diferencia estadística significativa.

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Zirena (2014) que hizo un tratamiento físico de la viscosidad del semen y García *et al.* (2017) que trabajaron con muestras colectadas post-copula, donde la viscosidad del semen es mínima. Por otra parte, los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Ordoñez *et al.* (2013) quienes trabajaron con muestras enteras de semen obtenido por electroeyaculación, donde hay mayor presencia de plasma seminal y por ende mayor viscosidad de semen que impide una mejor acción del dilutor en el espermatozoide, también podría afectar la tinción de las muestras de

semen. Por lo que esta diferencia podría ser al tipo de tratamiento de la viscosidad del semen, ya que en todos los casos se utilizó un dilutor en base tris y un tiempo de refrigeración mayor a 8 h (Ordoñez *et al.*, 2013; García *et al.*, 2017).

Para la vitalidad espermática post-descongelación, se encontró que existe diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre tratamientos, donde el porcentaje de vitalidad de T2 (48.23%) y T3 (48.14%) son estadísticamente superiores al grupo control (T1, 43.81%). Los resultados de T2 y T3 fueron estadísticamente similares.

Los resultados mostrados son superiores a los obtenidos por Ordoñez *et al.* (2013) y Zirena (2014) diferencia que podría ser a los protocolos de congelación, tiempo de equilibrio y la concentración del crioprotector, ya que en ambos casos se ha utilizado el glicerol. También, podría ser un efecto observable de la adicción de CLC, que tiene una acción protectora en la membrana espermática. En muestras de semen tratadas con CLC, Ccalta *et al.* (2017) reporta resultados muy inferiores, esta diferencia es posiblemente al porcentaje de vitalidad inicial de la muestra, el tipo de obtención de semen y tipo de crioprotector.

En la tabla 5 se observa, en todos los tratamientos un descenso importante del porcentaje de espermatozoides vivos post-descongelado con respecto a sus respectivas muestras refrigeradas, posiblemente debido al daño producido por la congelación. Para T1 o grupo control la disminución de espermatozoides vivos fue mayor que los tratamientos donde se ha incluido CLC, mostrando que hay una pérdida de 16.78% de vitalidad por efecto de la congelación, en T2 y T3 se observa que el porcentaje de espermatozoides desciende de 12.66 y 11.94% respectivamente, lo que indica que la adicción de CLC ha tenido efecto positivo para controlar el daño producido por el shock frío, no es un resultado alentador, pero se está demostrando que la adicción de colesterol a la membrana espermática es posible y se traduce en una mayor crio-supervivencia espermática.

4.1.2 Funcionalidad de membrana espermática

En la evaluación de las muestras refrigeradas sobre la funcionalidad de membrana, no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos, observándose que los valores son similares en los tres tratamientos (tabla 6).

Los resultados obtenidos para semen refrigerado, en los tres tratamientos son muy superiores a lo reportado por García *et al.* (2017) y Zirena (2014), diferencia que puede ser debido al tratamiento de la viscosidad del semen ya que el uso de la colagenasa permite eliminar gran parte de la viscosidad de semen, también al tiempo de refrigeración, la temperatura de mantenimiento, siendo el tipo de semen, el dilutor y la osmolaridad de los medios de evaluación, similar en ambos casos.

Tabla 6: Efecto de adición de CLC sobre la funcionalidad de membrana espermática en semen refrigerado y post-descongelado de alpaca.

Momento de observación	Funcionalidad de membrana (%)		
	T1	T2	T3
	0 mg CLC	2 mg CLC	4 mg CLC
Muestras refrigeradas	61.09 ± 8.83 ^a	61.57 ± 7.00 ^a	59.90 ± 8.06 ^a
Muestras post-descongeladas	46.49 ± 7.91 ^b	52.34 ± 9.85 ^a	52.90 ± 10.11 ^a

Medias ± DS con diferente letra en la misma fila muestran diferencia estadística significativa.

Para las muestras de semen post-descongelado, se encontró que existe diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre tratamientos, en la tabla 7 se observa que los resultados del grupo control (T1) es inferior a los tratamientos donde se utilizó CLC (T2 y T3) antes de la criopreservación de semen, indicando que hay mayor porcentaje de espermatozoide con la membrana funcional.

Los resultados obtenidos en los tres tratamientos son muy superiores a lo reportado por Zirena (2014) y Banda *et al.* (2010), diferencia que es posiblemente debido al tipo de semen (entero y/o epididimario), uso de dilutores, el protocolo de congelación, osmolaridad de los medios de evaluación (50 y 150 mOsmol) ya que en espermatozoides epididimarios sin presencia de plasma seminal siempre se obtiene alta reacción a la prueba de HOST. También, al tipo de crioprotector y a la adición de CLC ya que el colesterol tiene una influencia directa en el mantenimiento correcto de la membrana espermática después del proceso de la congelación.

La prueba de HOST nos permite determinar la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide, que es importante para determinar la fertilidad del macho (Jeyendran *et al.*, 1984). En la tabla 6, se observa una considerable pérdida del porcentaje de espermatozoides con membrana funcional post-descongelado, con relación a su respectivo grupo en la refrigeración, esta pérdida es inevitable y se debe al daño causado por la congelación o un efecto del shock-frio, pero en el grupo control se observa mayor porcentaje de daño en la membrana espermática (14.6%); en cambio, en T2 y T3 se observa una menor pérdida de la funcionalidad espermática que es 9.23 y 7.0% respectivamente.

4.1.3 Motilidad espermática

a. Motilidad progresiva

El análisis estadístico de la motilidad progresiva en semen refrigerado, indica que no existe diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos. Los valores de motilidad progresiva encontrada en semen refrigerado son estadísticamente iguales en todos los tratamientos (tabla 7). Y para muestras de semen descongelado, se encontró diferencia altamente significativa entre tratamientos ($P < 0.01$); la tabla 7 nos indica que los valores de T3 (6.58%) tiene mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, en comparación a T2 y T1 (4.82 y 4.27% respectivamente).

Tabla 7: Efecto de adición de CLC en la motilidad progresiva en semen refrigerado y post-descongelado de alpaca.

Momento de observación	Motilidad progresiva (%)		
	T1 0 mg CLC	T2 2 mg CLC	T3 4 mg CLC
Muestras refrigeradas	23.67 ± 12.17 ^a	22.89 ± 13.07 ^a	23.53 ± 11.91 ^a
Muestras post-descongeladas	4.27 ± 3.92 ^b	4.82 ± 3.71 ^b	6.58 ± 4.36 ^a

Medias ± DS con diferente letra en la misma fila muestran diferencia estadística significativa.

Los resultados en semen refrigerado y descongelado son superiores a lo encontrado por Ordoñez *et al.* (2013) y Flores *et al.* (2015), esto se debe posiblemente al método de

colección de semen (electroejaculación), uso de crioprotector y en especial al análisis de la motilidad, ya que la evaluación se realizó en un equipo ISAS, el cual para alpacas no está aún definido. Por otra parte, en dromedarios Crichton *et al.* (2014) observaron que la adición de CLC mejora el estado progresivo del espermatozoide en comparación al grupo control, estos resultados son similares al estudio, obteniendo mayor porcentaje de motilidad progresiva cuando fue usado 4 mg de CLC en el tratamiento de semen antes de la criopreservación.

En la tabla 7, se observa una alta pérdida de la motilidad progresiva luego del post-descongelado, en T3 hay una pérdida de motilidad progresiva de 16.95% y para T1 y T2 la pérdida es mayor, lo que nos indica que la adicción de CLC antes de la congelación mejora el porcentaje de supervivencia espermática frente al shock-frio.

b. Motilidad total

El análisis de variancia de los resultados de motilidad total en muestras refrigeradas indica que no existe diferencia significativa ($P>0.05$) entre tratamientos, en la tabla 8 se observa resultados similares de motilidad total en los tres tratamientos.

Los resultados encontrados son superiores a lo reportados por Flores *et al.* (2015), similares a los obtenidos por Zirena (2014) y son inferiores a lo reportado por Ordoñez *et al.* (2013), García *et al.* (2017), diferencia que podría ser al tratamiento de la viscosidad de semen, la variación del tiempo en el proceso de refrigeración y el método de obtención de semen.

Tabla 8: Efecto de adición de CLC en la motilidad total en semen refrigerado y post-descongelado de alpaca.

Momento de observación	Motilidad total (%)		
	T1	T2	T3
	0 mg CLC	2 mg CLC	4 mg CLC
Muestras refrigeradas	46.80 ± 9.64 ^a	47.41 ± 10.61 ^a	47.24 ± 9.79 ^a
Muestras post-descongeladas	17.06 ± 7.21 ^b	19.60 ± 6.01 ^b	22.40 ± 7.19 ^a

Medias ± DS con diferente letra en la misma fila muestran diferencia estadística significativa.

Con respecto a la motilidad total de las muestras de semen descongelado, se encontró diferencias estadísticas altamente significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos, siendo el resultado de T3 (22.40%) superior a los resultados de T2 (19.60%) y T1 (17.06%); así mismo se determinó que los resultados de T2 y T1 son estadísticamente similares entre sí, al encontrarse en el mismo grupo estadístico.

Los resultados obtenidos son mejores a lo obtenido por Zirena (2014), Ordoñez *et al.* (2013), Flores *et al.* (2015), Banda *et al.* (2010) esta diferencia podría ser debido a la adición de CLC, ya que los valores en donde se usó CLC han mostrado mejores resultados, teniendo valores similares de motilidad con respecto al grupo control (T1), también se ha observado que hay motilidad mayor cuando se usó glicerol como crioprotector. En muestras de semen tratadas con CLC antes de la congelación, Ccalta *et al.* (2017) obtuvieron resultados inferiores, esta diferencia es posiblemente debido al método de obtención de semen (post-copula) y a la motilidad inicial que fue baja.

Por otra parte, los resultados son inferiores a lo reportado por Olaguivel y Naveros (2014), obteniendo mejores resultados cuando han usado colagenasa para la eliminación de la viscosidad del semen, variación que podría ser al tipo y proporción de crioprotector, tipo de dilutor, calidad inicial del eyaculado y tasas de refrigeración. También, hay que indicar que, Crichton *et al.* (2014) obtuvieron mayores valores de motilidad en los tratamientos donde se hizo una adición de CLC antes de la congelación, en comparación al grupo control y se ha observado que muestras tratadas con colesterol, mantienen la motilidad aun después de tres horas de incubación *in vitro*. Esto nos muestra que la adición de CLC influye de manera positiva en mantener la calidad espermática de la alpaca después de la congelación.

En la tabla 8, se muestra el comportamiento de la motilidad total en las etapas de refrigeración y post-descongelación, donde podemos observar que la motilidad disminuye notablemente en 29.74, 27.81 y 24.84% en T1, T2 y T3 respectivamente, luego del proceso de congelación, observando que hay una mayor pérdida de la motilidad cuando no hubo tratamiento de semen con CLC. Choez *et al.* (2013) indica que existe una gran variabilidad en los valores de motilidad de semen fresco y descongelado.

4.2 Evaluación de integridad de acrosoma espermático

El análisis de variancia de la integridad de acrosoma en muestras de semen refrigerado, indica que no existe diferencia estadística significativa ($P>0.05$) entre tratamientos. En la tabla 9 se observan los resultados de los tres tratamientos siendo estadísticamente similares para espermatozoides con membrana acrosomal intacta.

Los resultados obtenidos en pruebas realizadas con CB son similares a lo mencionado por Giuliano *et al.* (2012) para semen de llama, y superior a lo reportado por Crichton *et al.* (2014) en semen de dromedarios. Lo que indica que la tinción de CB en alpacas es aplicable.

Tabla 9: Efecto de adición de CLC sobre la integridad de acrosoma en semen refrigerado y post-descongelado de alpacas.

Momento de observación	Integridad de acrosoma (%)		
	T1 0 mg CLC	T2 2 mg CLC	T3 4 mg CLC
Muestras refrigeradas	76.44 ± 8.67 ^a	80.13 ± 5.08 ^a	79.44 ± 3.74 ^a
Muestras post-descongeladas	67.90 ± 6.06 ^b	71.40 ± 5.73 ^a	70.13 ± 5.97 ^{ab}

Medias ± DS con diferente letra en la misma fila muestran diferencia estadística significativa.

Para la evaluación de espermatozoides con membrana acrosomal intacto en muestras de semen post-descongelado, se observó que existe diferencia estadística significativa ($P<0.05$) entre tratamientos. En la tabla 9, se indica que en T2 y T3 se ha reportaron mayores valores de espermatozoides con membrana acrosomal intacta que en T1; Por lo tanto, se asume que esta variación se debe a un efecto de la adición de CLC antes de la congelación.

Los resultados encontrados son similares a lo reportado por Giuliano *et al.* (2012) para semen de llama, y superiores a lo reportado por Ccalta *et al.* (2017) en semen de alpacas y Crichton *et al.* (2014) en semen de dromedarios, los mismos que se determinaron mediante el uso de CB; en dromedarios se ha observado que hay mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, cuando se hizo un pretratamiento con CLC antes de la congelación. Por otra parte, Banda *et al.* (2010), Choez *et al.* (2013) y Choez *et al.* (2014) usando

espermatozoides epididimarios de alpaca indican resultados inferiores, diferencia posiblemente debido al tipo de muestras de semen, dilutores y crioprotectores usados y al tipo de tinción utilizada para observar la integridad del acrosoma. Morton *et al.* (2007) ha encontrado altos valores de integridad acrosomal, siendo superiores a los resultados reportados. Las diferencias encontradas de nuestros resultados y de los demás autores es muy variable, debido a que se han utilizado varios métodos de tinción y evaluación de esta variable, también a la obtención de muestras (semen entero y de lavado del epidídimo).

En la tabla 9, se observa que los valores de integridad acrosomal en semen refrigerado, disminuyen en 8.54, 8.73 y 9.13% para T1, T2 y T3 respectivamente, después del proceso de congelación, esta disminución se observa en todas las variables evaluadas, y es principalmente al efecto del shock frío que sufren los espermatozoides al pasar por el proceso de congelación, que tiene efecto principal sobre la pérdida de colesterol de la membrana y la crio-capacitación espermática traduciéndose en daño acrosomal.

Para alpacas, aún no hay referencias de la tasa de concentración de colesterol/fosfolípido presente en la membrana espermática, como se observa en el cerdo, caballo, carnero y toro (0.26, 0.36, 0.45 y 0.59; respectivamente) donde a mayor concentración de colesterol en la membrana plasmática se requieren una menor concentración de CLC para alcanzar niveles óptimos de colesterol (Tómas, 2007). Posiblemente la tasa de colesterol/fosfolípidos en alpacas sea bajo, similar a la del cerdo y caballo, especies que tienen baja supervivencia espermática a la congelación y la adición de CLC mejora la calidad espermática de estas especies.

La mayoría de los trabajos donde se hace uso de CLC en los protocolos de congelación de semen se ha observado mejoras tanto en el porcentaje de motilidad total como la vitalidad entre los espermatozoides tratados con CLC antes de la criopreservación y los no tratados. En general, la diferencia de resultados en T3 (con adición de 4 mg de CLC) con respecto al grupo control, fue de 5.64 y 4.9% de vitalidad y motilidad, respectivamente. Estos resultados están en el rango de valores reportados con utilización de CLC antes de la congelación en otras especies (2 a 24%) y por debajo de los valores obtenidos en la mayoría de los estudios (10 a 20%), este beneficio del tratamiento de CLC sobre las tasas de supervivencia es variable para el espermatozoide de diferentes especies, líneas dentro de una especie, diferentes machos y para espermatozoides sexados (Mocé *et al.*, 2010).

Otro problema, podría ser el tipo de crioprotector; ya que en dromedarios se ha demostrado que el uso de 6% de glicerol en la congelación de semen causa mayor daño que 3% de glicerol, resultando en una aceptable motilidad post-descongelado, aunque con significativo daño acrosomal (El-Bahrawy, 2010), esto podría ser a que el glicerol penetra lentamente en la célula espermática y puede causar un gran cambio de volumen al espermatozoide cuando es agregado y removido, y también resulta tóxico para el espermatozoide de algunas especies (Hammerstedt y Graham, 1992).

La criopreservación produce un daño irreversible en un alto porcentaje de espermatozoides tras la descongelación y los que sobreviven presentan características completamente distintas a los espermatozoides frescos, debido a que estos son sometidos a condiciones de estrés por el descenso de temperatura, lo cual influye en una serie de cambios a nivel estructural y funcional del espermatozoide, resultando en una baja calidad al post-descongelado. Por lo que la inclusión de CLC busca minimizar el daño del espermatozoide modificando su membrana plasmática.

V. CONCLUSIONES

1. El uso de metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol en los protocolos de criopreservación de semen de alpaca, mejora los porcentajes de vitalidad, funcionalidad de membrana, motilidad progresiva y motilidad total al post-descongelado.
2. El tratamiento de espermatozoides de alpaca con metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol induce a un menor daño celular, obteniendo un mayor porcentaje de espermatozoides con integridad acrosomal.

VI. RECOMENDACIONES

1. Incluir la metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol en los protocolos de criopreservación semen de alpaca, utilizando diferentes concentraciones de CLC, varios tipos de dilutor y crioprotector con la finalidad de evaluar y mejorar las características seminales post-descongelación.
2. Realizar pruebas de fertilización *in vitro* e inseminación artificial en alpacas en semen congelado y tratado con metil- β -ciclodextrina cargado de colesterol antes de la congelación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, GP; Ratto, MH; Collins, CW; Bergfelt, DR. 2009. Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology* 71(1):166-175.

Alarcón, V; García, W; Bravo, PW. 2012. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 23(1):58-64.

Aller, JF; Rebuffi, GE; Cancino, AK; Alberio, RH. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Archivos de Zootecnia* 52:15-23.

Álvarez, AL; Serres, C; Torres, P; Crespo, F; Mateos, E; Gomez-Cuetera, C. 2006. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 94(1-4):89-91.

Ávila, R. 2009. Efecto de la congelación y descongelación de semen equino, en dos diluyentes comerciales (en línea). Tesis Med. Vet. Michoacan, Mexico, UMSNH. 34 p. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en <http://s46f966bb7fb51ef5.jimcontent.com/download/version/1409667639/module/9417644952/name/Efecto%20de%20la%20congelacion%20y%20descongelacion%20de%20semen%20equino%20en%20dos%20diluyentes%20comerciales.pdf>

Baca, L. 1998. Evaluación del tiempo optimo del equilibrado con tres dilutores en el congelamiento de semen de alpacas. Tesis Ing. Zoot. Cusco, Perú, UNSAAC.

Banda, RJ; Evangelista, S; Ruiz, L; Sandoval, R; Rodríguez, LC; Valdivia, CM; Santiani, A. 2010. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 21(2):145-153.

- Bravo, PW; Flores, U; Garnica, J; Ordoñez, C. 1997. Collection of Semen and Insemination Artificial of Alpacas. *Theriogenology* 47(3):619-626.
- Bravo, PW; Pacheco, C; Quispe, G; Vilcapaza, L; Ordoñez, C. 1999. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Archives of Andrology* 43(3):239-246.
- Bravo, PW; Ccallo, M; Garnica, J. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research* 38(1):91-95.
- Bravo, PW; Alarcón, V. 2013. Preservación de semen y avances recientes en la inseminación artificial de llamas y alpacas. *Spermova* 3(2):158-160.
- Bustanza, V. 2001. *La Alpaca: Crianza, Manejo y Mejoramiento*. 1 ed. Puno, Perú, Editorial Universitaria. 343 p.
- Callen, JC. 2000. *Biología celular: De las moléculas a los organismos*. 1 ed. México D.F, México, Editorial Continental. 448 p.
- Canorio, N; Paredes, F; Valdivia, F. 2015. Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 26(3):434-443.
- Cárdenas, N. 2002. *Inseminación artificial con espermatozoides congelados colectados de los conductos deferentes en alpacas*. Tesis Med. Vet. Puno, Perú, UNA.
- Carretero, MI; Santa Cruz, CR; Neild, DM; Arraztoa, C; Fumuso, FG; Giuliano, SM. 2013. Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen en llama (*Lama glama*). *Spermova* 3(2):174-176.
- Carretero, MI; Fumuso, FG; Miragaya, MH; Giuliano, SM. 2015. Evaluation of acrosomal status on llama sperm. *Spermova* 5(2):258-263.
- Castillo, LA. 2017. *Adición de metil-β-ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero*. Tesis Mg.Sc. Lima, Perú, UNALM. 73 p.
- Ccalta, R; Ordoñez, C; Ampuero, E; Cucho, H. 2017. Efecto de la criopreservación en la morfometría del espermatozoide de alpaca. *Spermova* 7(2):100-105.

- Choez, K. 2010. Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos (en línea). Lima, Perú, UNMSM-SIRIVS. 8 p. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en <http://docplayer.es/11445335-Criopreservacion-de-semen-en-camelidos-sudamericanos.html>
- Choez, K; Evangelista, S; Castillo, R; Santiani, A. 2013. Efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Spermova* 3(1):83-84.
- Choez, K; Evangelista, S; Ruiz, L; Sandoval, R; Santiani, A. 2014. Efecto de la concentración de tres crioprotectores sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de espermatozoides criopreservados de epidídimo de alpaca. *Spermova* 4(1):80-82.
- Christian, AE; Haynes, MP; Phillips, MC; Rothblat, GH. 1997. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research* 38(11):2264–2272.
- Crichton, E; Pukazhenthii Budhan, S; Billah, M; Skidmore, J. 2014. Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedaries*) spermatozoa. *Theriogenology* 83:168-174.
- Crini, G. 2014. Review: A History of Cyclodextrins. *Chemical Reviews* 114(21):10940-10975.
- Cuba, Y. 2000. Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del semen de alpaca (*Lama pacos*) antes y después del proceso de congelado. Tesis Ing. Zoot. Cusco, Perú, UNSAAC.
- Curry, MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviews of Reproduction* 5(1):46-52.
- El-Bahrawy, KA. 2010. Effect of seminal plasma centrifugation for viscosity elimination on cryopreservation of dromedary camel semen. *Natural Science* 8:196-202.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2005. Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina (en línea). 63 p. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en https://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia_archivos/situacion_alpcas_peru.pdf

Flores, NH; Cucho, H; Carretero, MI; Ciprian, R; Quispe, HA; Calderón, N; Miragaya, MH; Giuliano, SM. 2015. Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la movilidad de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS®. *Spermova* 5(1):47-50.

Fumuso, FG; Giménez, ML; Neild, DM; Giuliano, SM; Chaves, MG; Carretero, MI. 2014. Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie blue. *Spermova* 4(1):50-53

Galantino-Homer, HL; Zeng, WX; Megee, SO; Dallmeyer, M; Voelkl, D; Dobrinski, I. 2006. Effects of 2-hidroxipropil- β -cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Molecular Reproduction and Development* 73(5):638-650.

García, W; Pezo, D; San Martín, F; Olazábal, JP; Franco, F. 2005. Manual del Técnico Alpaquero. 1 ed. Lima, Perú, ITDG. 105 p.

García, W; Alarcón, V; Bravo, PW. 2017. Inseminación artificial de alpacas con semen refrigerado y con inclusión de dos tipos de yema de huevo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 28(2):337-344.

Gillan, L; Evans, G; Maxwell, WM. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development* 9(5):481-487.

Giuliano, SM; Ferrari, M; Spirito, S; Campi, S; Director, A; Fernández, H. 2002. Methodological advances on the hypoosmotic swelling test (HOS test) in (*Lama glama*) spermatozoa. *Bioxcell* 17:149

Giuliano, SM; Carretero, MI; Gambarotta, MC; Neild, DM; Trasorras, VL; Pinto, M; Miragaya, MH. 2010. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science* 118(1):98-102.

Giuliano, SM. 2012. Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericanos. *Spermova* 2(1):6-9.

Giuliano, SM; Bisiau, C; Carretero, MI; Arraztoa, C; Neild, DM. 2012. Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Investigación Veterinaria* 14(2):279.

Gonzales, H. 2008. Obtención y Criopreservación de Espermatozoides de Alpacas. *Scientia* 10(10):223-234

Gonzales, ML; Huanca, T; Cárdenas, O. 2011. Evaluación de la fertilidad en alpacas inseminadas con semen refrigerado a diferentes tiempos post inducción de ovulación. *Spermova* 1(1):64-65.

Hafez, ESE; Hafez, B (eds.). 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7 ed. México D.F., México, Editorial McGraw-Hill Interamericana. 519 p.

Hammerstedt, RH; Graham, JK. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29(1):26-38.

Hanzen, C; Cucho, H; Ampuero, E; Ordoñez, C; Sumar, J (eds.). 2014. Principios de la reproducción de los camélidos sudamericanos. 1 ed. Cusco, Perú, Editorial Universitaria, FUNSAAC. 157 p.

Huanca, T; Mamani, RH; Naveros, ML; Gonzales, M. 2012. Influencia de la colectas sucesivas y color del semen sobre algunas características de semen en alpacas (en línea). *In* Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos (4, 2012, Arica, Chile). Raggi, LA; Rojas, I; Parraguez, VH; Sepúlveda, N (eds). Resúmenes y trabajos. p. 120. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_de_camelidos/camelidos_general/83-VI_congresomundial.pdf

Huanca, T; Mamani, RH; Naveros, ML; Pacheco, JI; Condori, N. 2011. Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos*). *Spermova* 1(1):98-100.

Huo, LJ; Ma, XH; Yang, ZM. 2002. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 58 (7):1349-1360.

Jeyendran, RS; Van Der Ven, HH; Perez-Pelaez, M; Crabo, BG; Zaneveld, LJ. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility* 70(1):219-228.

Kayaci, F; Ertas, Y; Uyar, T. 2013. Enhanced Thermal Stability of Eugenol by Cyclodextrin Inclusion Complex Encapsulated in Electrospun Polymeric Nanofibers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(34):8156-8165

Kershaw-Young, CM; Maxwell, WM. 2011. Advancing Artificial Insemination in Camelids, Particularly the Alpaca (en línea). Sydney, Australia, RIRDC. 99 p. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en <https://cdn.harper-adams.ac.uk/document/project/150604-Advancing-Artificial-Insemination-in-Alpacas423506.pdf>

Kershaw-Young, CM; Maxwell, WM. 2012. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reproduction in Domestic Animals* 47(4):369-375.

Kershaw, CM; Evans, G; Rodney, R; Maxwell, WM. 2016. Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm function and improve post-thaw motility rates. *Reproduction, Fertility and Development* 29(6):1107

Larson, JL; Miller, DJ. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular Reproduction and Development* 52(4):445-449

Li, WS; Wang, SC; Hwang, TS; Chao, I. 2012. Substituent Effect on the Structural Behavior of Modified Cyclodextrin: A Molecular Dynamics Study on Methylated β -CDs. *The Journal of Physical Chemistry B* 116(11):3477-3489.

Mesa, AM; Henao, G. 2012. Effect of cholesterol and dimethyl-formamide on post-thawing parameters in Colombian creole stallion sperm. *Revista MVZ Córdoba* 17(1):2908-2915.

Mocé, E; Graham, JK. 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *Journal of Animal Science* 84(4):826-833.

Mocé, E; Purdy, PH; Graham, JK. 2010. Treating ram sperm with cholesterol loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science* 118(2-4):236-247.

Mocé, E; Tomás, C; Blanch, E; Graham, J.K. 2014. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on bull and goat sperm processed with fast or slow cryopreservation protocols. *Animal* 8(5):771-776.

Moore, AL; Squires, EL; Graham, JK. 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51(3):241-249.

Morton, KM; Bathgate, R; Evans, G; Maxwell, WM. 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.

Morton, KM; Gibb, Z; Bertoldo, M; Maxwell, WM. 2009. Effect of diluent, dilution rate and storage temperature on longevity and functional integrity of liquid stored alpaca (*Vicugna pacos*) semen. *Journal of Camelid Science* 2:15-25.

Morton, KM; Maxwell, WM. 2006. The continued development of artificial insemination technologies in alpacas (en línea). Sydney, Australia. 8 p. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/303486093_The_continued_development_of_artificial_insemination_technology_in_alpacas

Narváez, G. 2008. Inseminación artificial en alpacas con semen congelado, colectado de vagina natural post coital y vagina artificial. Tesis Ing. Zoot. Cusco, Perú, UNSAAC.

Naveros, ML; Contreras, M. 2014. Evaluación de dos dilutores comerciales en la congelación de semen con fines de inseminación artificial en alpacas (*Vicugna pacos*). In Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal (37, 2014, Abancay, Perú). Gómez, NC; Curillo, ML (eds). Memorias. Abancay, Perú, UNAMBA. p. 224.

Olaguivel, C; Naveros, ML. 2014. Efecto de la enzima colagenasa en la congelación de semen en alpacas (*Vicugna pacos*). *Spermova* 4(1):64.

Ordóñez, C; Ampuero, E; Cucho, H; Franco, E. 2012. Avances en la determinación de la velocidad del espermatozoide de alpaca en semen diluido usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). *Spermova* 2(1):63-64.

Ordóñez, C; Cucho, H; Ampuero, E; Antezana, W; Cayo, S. 2013. Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. *Spermova* 3(1):65-66.

Ordóñez, C; Ampuero, E; Alarcón, V; Franco, E; Hanzen, C; Cucho, H. 2015. Evaluación de tres dilutores en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*) en pelets. *Spermova* 5(1):119-123.

Pacheco, JI. 2008. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *Revista Electrónica de Veterinaria* 9(5):1-15.

Pacheco, JI; Mamani, RH; Franco, F; Zea, O; Pezo, D; Vélez, V. 2014. Efecto de la osmolaridad sobre la respuesta endosmótica en espermatozoides de epidídimo y eyaculados de alpaca (*Vicugna pacos*). *Spermova* 4(1):36-38.

Paricahua, E. 2001. Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. Tesis Med. Vet. Puno, Perú, UNA.

Purdy, PH; Graham, JK. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48(1):36-45.

Parrish, JJ; Susko-Parrish, J; Winer, MA; First, NL. 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of reproduction* 38(5):1171-1180.

Quinteros, AA. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, conejo y cerdo (en línea). Tesis Ph. D. Bellaterra, España, Universidad Autónoma de Barcelona. 164 p. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5644/aqm1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Quispe, HA; Ciprian, R; Ordoñez, C; Ampuero, E; Cucho, H. 2015. Test hipoosmótico en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) recuperados del conducto deferente. *Spermova* 5(1):10-14.

Rodríguez, CV. 2012. Identificación y evaluación del mecanismo de activación del sistema proacrosina/acrosina en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Biol. Lima, Perú, UNMSM. 52 p.

- Ramalho-Santos, J; Schatten, G; Moreno, RD. 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biology of reproduction* 67(4):1043-1051.
- Salamon, M; Maxwell, WM. 2000. Storage of ram semen. *Animal reproduction science* 62(1-3):77-111.
- Sandoval, RS. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Tesis Med. Vet. Lima, Perú, UNMSM. 81 p.
- Santiani, A; Huanca, W; Sapana, R; Huanca, T; Sepúlveda, N; Sánchez, R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology* 7(3):303-309.
- Sumar, J; Leyva, V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). In Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos (4, 1981, Punta Arenas, Chile). Resúmenes. Punta Arenas, Chile. p. 12
- Sumar, J. 2002. Llamas y alpacas. In Hafez, ESE; Hafez, B (eds.). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7 ed. México D.F., México, Editorial McGraw-Hill Interamericana. p. 224-242.
- Tomás, C. 2007. Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío (en línea). Tesis Mg. Valencia, España, Universidad Politécnica de Valencia. 46 p. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en <https://riunet.upv.es/handle/10251/12583>
- Ugarelli, A; Evangelista, S; Choez, K; Pacheco, JI; Santiani, A. 2015. Evaluación de diferentes concentraciones de FITC-PSA y FITC-PNA para la valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca. *Spermova* 5(1):87-92.
- Ugarelli, A; Evangelista, S; Santiani, A. 2017. Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 28(1):130-140.
- Vaughan, JL; Galloway, D; Hopkins, D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*): A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Barton ACT, Australia, RIRDC. 98 p.

Vásquez, J; Florentini, E; Valdivia, M. 2012. Hypoosmotic swelling test in alpaca (*Vicugna pacos*) epididymal spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 47(6):83-87.

Viñan, HP. 2017. Adición de metil- β -ciclodextrina cargada de colesterol sobre la criopreservación de semen de toros Holstein Friesian. Tesis Mg.Sc. Lima, Peru, UNALM. 69 p.

WHO (World Health Organization). 2010. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (en línea). 5 ed. Geneva, Switzerland. 286 p. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf;jsessionid=22FBC3D8BD79DA65996906E1296961CC?sequence=1

Zeng, WX; Terada, T. 2001. Effects of Methyl-Beta-Cyclodextrin on Cryosurvival of Boar Spermatozoa. *Journal of Andrology* 22(1):111-118.

Zidovetzki, R; Levitan, I. 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 1768(6):1311-1324.

Zimmermann, MF. 2007. Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida em amostras de sêmen equino descongeladas utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais (en línea). Tesis Mg.Sc. Brasilia, Brasil, Universidad de Brasilia. 65 p. Consultado 15 ago. 2018. Disponible en http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/2791/1/Disserta__o_Marina_Zimmermann%5b1%5d.pdf

Zirena, N. 2014. Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación. Tesis Med. Vet. Lima, Perú, UNMSM. 71 p.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. Materiales utilizados en la investigación

a. Materiales para la colección de semen

- Maniquí de alpaca.
- Vagina artificial.
- Funda de latex recta y conica.
- Frazadilla térmica (SoftHeat®).
- Tubos cónicos para centrifuga de 14 ml.
- Hervidor.
- Termómetro digital.

b. Equipos

- Microscopio de contraste de fases con platina térmica (UOP-UB200i) y videocámara (Proiser ISAS® 782C).
- Computadora (con programa ISAS® v. 1.2).
- Baño maría (Ovan®).
- Cabina de flujo laminar (BIOBASE)
- Vortex Mixer (Labnet International, Inc).
- Baño seco (HT-50, Minitube)
- Balanza digital de precisión ($120 \pm 0.0001\text{g}$, KERN).
- Thermocouple (OaktonTemp 10K).
- Centrifuga de rotor fijo (PrO-Analytical, Centurion Scientific Ltd.).
- Micropipetas de 10 μl y 100 μl (BOECO Germany SP Series).
- Micropipetas de 1000 μl (Jencons SEALPETTE).
- Osmómetro (Löser).
- Horno de laboratorio de convección forzada (ESCO® Isotherm® - ISOCIDE).
- Platina térmica (Premiere®).
- Refrigeradora (BOSH).

c. Materiales para evaluación seminal

- Portaobjetos.
- Tanque criogenico (MVE)
- Cubreobjetos.
- Millenium 2000 XC 20).

- Tips de 10, 100 y 1000 μ l.
- Tubos viales de 2 ml.
- Tubos cónicos de 15 y 50 ml.
- Pajillas de 0.5 ml.
- Globets y porta globets.
- Canastillas.
- Aceite de inmersión
- Corta pajillas.
- Termo descongelador.
- Caja de tecnopor.
- Gradilla.
- Papel toalla.
- Placas Petri.
- Tubo de ensayo de vidrio.

d. Reactivos e insumos

- Tris (Trizma® base, Sigma Aldrich)
- Ácido cítrico (Merk KGaA).
- D(-)-Fructosa (Merk KGaA).
- Citrato de Sodio Dihidratado (Calbiochem®, EMD Chemicals, Inc.).
- Colesterol (Sigma-Aldrich).
- Metil- β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich).
- Colagenasa (de Clostridium Histolyticum - Tipo I, Sigma-Aldrich).
- Cloroformo (Sigma-Aldrich).
- Metanol (Chemical).
- Glicerol (Calbiochem®, EMD Millipore Corp.).
- Ácido acético (AppliChem – Panreac).
- Eosina G 2% (Minitube GMBH).
- Nigrosina Solucion 4% (Minitube GMBH)
- Cloruro de sodio (AppliChem – Panreac)
- Cloruro de potasio (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de calcio dihidratado (Sigma-Aldrich).
- Fosfato de sodio monobásico monohidratado (Sigma-Aldrich).
- Bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de magnesio hexahidratado (Sigma-Aldrich)
- L- lactato de sodio (Sigma-Aldrich)
- Piruvato de sodio (Sigma-Aldrich)
- D(+)-Glucosa (Merk KGaA)
- Hepes (Sigma-Aldrich).

- BSA (Bovine Serum Albumin, Fracción V - libre de ácido graso, Roche).
- Sulfato de gentamicina (Sigma-Aldrich).
- Hidrocloruro de lincomicina (Sigma).
- Tartrato de tilosina (Sigma).
- Coomassie® Brilliant Blue R-250 (AppliChem – Panreac)
- Paraformaldehido (Sigma-Aldrich).
- Formol (Formaldehido 40%).
- Solucion Tampon Fosfato Salino (PBS)
- Alcohol de 96°.
- Agua bidestilada.
- Yema de huevo de gallina.
- Nitrógeno Líquido.
- Alcohol polivinílico.

e. Otros materiales

- Libreta de registro.
- Cámara fotográfica.
- Mascarilla.
- Computador personal.
- Cronometro.
- Guante quirúrgico

ANEXO 2. Preparación de medios utilizados

Medio Tyrode's Albumina Lactato Piruvato (TALP)

Reactivo	Cantidad
Cloruro de sodio	114 mM
Cloruro de potasio	3.1 mM
Bicarbonato de sodio	10 mM
Fosfato de sodio monobásico	0.3 mM
Cloruro de calcio	2 mM
Cloruro de magnesio	0.5 mM
Lactato de sodio	10 mM
Piruvato de sodio	0.2 mM
Glucosa	5 mM
Hepes	10 mM
BSA (fracción V)	3 mg/ml
Gentamicina	50 µg/ml
Agua bidestilada	1000 ml

El producto final debe tener una osmolaridad de 300 mOsmol y un pH de 7.4 y ser almacenado en refrigeración hasta su uso.

Preparación de dilutor A

Medio de dilución Tris + yema de huevo

Reactivo	Cantidad	
Tris	225 mM	0.3025 g.
Fructosa	20.9 mM	0.17 g.
Ácido Cítrico	78 mM	0.125 g.
Tilosina	0.1 mg/ml	1 mg
Gentamicina	0.5 mg/ml	5 mg
Lincomicina	1.8 mg/ml	18 mg
Yema de huevo	20%	2.0 ml
Agua bidestilada (completar vol. final)	~ 80%	~ 8 ml

El producto final fue almacenado en refrigeración hasta el momento de la utilización.

Preparación de Dilutor B

Medio de dilución Tris + yema de huevo + glicerol

Reactivo	Cantidad	
Tris	225 mM	0.303 g.
Fructosa	20.9 mM	0.17 g.
Ácido Cítrico	78 mM	0.125 g.
Tilosina	100 mg	1 mg
Gentamicina	500 mg	5 mg
Lincomicina	1800 mg	18 mg
Yema de huevo	20%	2.0 ml
Glicerol	12%	1.2 ml
Agua bidestilada (completar vol. final)	~ 68%	~ 6.8 ml

El producto final fue almacenado en refrigeración hasta el momento de su utilización.

Medio de tinción de proteínas acrosomales

Solución Coomassie Blue al 0.22%

Reactivo	Cantidad
Coomassie Brilliant Blue R-250	0.22 %
Metanol	50 %
Ácido acético Glacial	10 %
Agua destilada	40 %

1. En una balanza de precisión se pesa 0.22 g de Coomassie Brilliant Blue R-250.
2. En un vaso de precipitado se mide 50 ml de metanol y se agrega el Coomassie Brilliant Blue R-250, se mezcla cuidadosamente.
3. Se agrega 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua destilada.
4. Se homogeniza la mezcla y se almacena en refrigeración

ANEXO 3. Registro de tiempo de copula y resultados de variables macroscópicas y microscópicas en semen fresco de alpaca.

Tabla 10: Tiempo registrado de monta de cada macho sobre el maniquí de colección.

Macho	N	Media (min.)	± DS	CV (%)	Mínimo (min.)	Máximo (min.)
1	5	15.4	5.41	35.15	12	25
2	5	17.6	5.18	29.41	13	25
3	5	15.8	4.21	26.63	12	23
4	5	27.8	5.40	19.44	20	34
5	5	20.0	2.55	12.75	17	23
Total	25	19.3	6.30	32.62	12	34

min.: minutos; DS: desviación estándar; CV: Coeficiente de Variabilidad.

Tabla 11: Tonalidades de color blanco observados en semen fresco de alpacas colectado por vagina artificial.

Color	N° de colectas	%
Blanco cremoso	6	24.0
Blanco lechoso	11	44.0
Blanco lechoso claro	8	32.0
Total	25	100.0

Tabla 12: Volumen de semen y espuma obtenido por vagina artificial en alpacas.

Macho	N	Volumen de semen (ml)	Volumen de espuma (ml)
1	5	2.9 ± 0.34	4.1 ± 1.78
2	5	2.1 ± 0.47	3.8 ± 2.13
3	5	1.3 ± 0.45	0.3 ± 0.43
4	5	1.1 ± 0.92	0.3 ± 0.43
5	5	1.9 ± 0.57	4.2 ± 4.35
Total	25	1.8 ± 0.83	2.6 ± 2.83

Media ± desviación estándar

Tabla 13: Media y DS para la concentración, vitalidad, funcionalidad de membrana e integridad de acrosoma en semen fresco de alpaca obtenido por vagina artificial.

Macho	N	Concentración (x10⁶spz/ml)	Vitalidad (%)	Integridad de membrana (%)	Integridad de acrosoma (%)*
1	5	87.8 ± 39.10	75.56 ± 5.39	70.49 ± 6.47	87.94 ± 5.82
2	5	88.0 ± 56.29	72.81 ± 5.59	77.24 ± 5.30	90.73 ± 5.79
3	5	165.4 ± 82.59	68.96 ± 4.20	69.78 ± 4.18	86.09 ± 5.81
4	5	175.0 ± 78.43	72.49 ± 8.84	75.80 ± 10.07	91.65 ± 4.25
5	5	91.4 ± 60.15	75.88 ± 1.64	68.32 ± 4.84	90.63 ± 2.70
Total	25	121.52 ± 72.15	73.14 ± 5.74	72.32 ± 6.99	89.41 ± 4.95

Media ± desviación estándar

* Solo hay 4 repeticiones/macho.

Tabla 14: Media y DS de motilidad progresiva, motilidad no progresiva y motilidad total en semen fresco de alpaca obtenido por vagina artificial.

Macho	N	Motilidad Progresiva (%)	Motilidad no Progresiva (%)	Motilidad Total (%)
1	5	1.02 ± 1.51	54.58 ± 11.32	55.59 ± 11.07
2	5	3.36 ± 5.14	63.20 ± 10.51	66.56 ± 10.52
3	5	7.28 ± 11.56	63.84 ± 18.20	71.12 ± 7.36
4	5	22.39 ± 6.28	39.67 ± 19.59	62.07 ± 16.64
5	5	2.36 ± 2.89	61.85 ± 7.13	64.21 ± 6.03
Total	25	7.28 ± 9.95	56.63 ± 15.93	63.91 ± 11.29

Media ± desviación estándar

ANEXO 4. Análisis de varianza y test de Tukey de vitalidad espermática en semen refrigerado de alpaca.

Análisis de variancia de datos transformados del efecto del CLC sobre la vitalidad espermática en semen refrigerado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.00144779	0.00072390	0.22	0.8004 NS
Animal	4	0.07627514	0.01906878	5.89	0.0006 **
Colecta (Animal)	20	0.35681530	0.01784076	5.51	<.0001**
Error	48	0.15533472	0.00323614		
Total corregido	74	0.58987295			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.736664	8.711598	0.056887	0.653004

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la vitalidad espermática en semen refrigerado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.65793	25	T2
A	0.65382	25	T1
A	0.64726	25	T3

ANEXO 5. Análisis de varianza y test de Tukey de vitalidad espermática en semen post-descongelado de alpaca.

Análisis de variancia de datos transformados del efecto del CLC sobre la vitalidad espermática en semen post-descongelado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.04109334	0.02054667	6.15	0.0042 **
Animal	4	0.05705599	0.01426400	4.27	0.0049 **
Colecta (Animal)	20	0.21652218	0.01082611	3.24	0.0004 **
Error	48	0.16031811	0.00333996		
Total corregido	74	0.47498962			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.662481	11.84678	0.057792	0.487832

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la vitalidad espermática en semen post-descongelado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.50512	25	T2
A	0.50363	25	T3
B	0.45474	25	T1

ANEXO 6. Análisis de varianza y test de Tukey de la funcionalidad de membrana espermática en semen refrigerado de alpaca.

Análisis de variancia de datos transformados del efecto del CLC sobre la funcionalidad de membrana espermática en semen refrigerado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.00574539	0.00287270	0.58	0.5651 NS
Animal	4	0.07518105	0.01879526	3.78	0.0094 **
Colecta (Animal)	20	0.42555224	0.02127761	4.28	<.0001 **
Error	48	0.23871237	0.00497317		
Total corregido	74	0.74519105			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.679663	10.71737	0.070521	0.658004

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la funcionalidad de membrana espermática en semen refrigerado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.66628	25	T2
A	0.66183	25	T1
A	0.64590	25	T3

ANEXO 7. Análisis de varianza y test de Tukey de la funcionalidad de membrana espermática en semen post-descongelado de alpaca.

Análisis de variancia de datos transformados del efecto del CLC sobre la funcionalidad de membrana espermática en semen post-descongelado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.07711926	0.03855963	7.58	0.0014 **
Animal	4	0.10715109	0.02678777	5.27	0.0014 **
Colecta (Animal)	20	0.49955597	0.02497780	4.91	<.0001 **
Error	47	0.23906605	0.00508651		
Total corregido	73	0.92915064			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.742705	13.34098	0.071320	0.534592

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la funcionalidad de membrana espermática en semen post-descongelado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.56148	24	T3
A	0.55487	25	T2
B	0.48546	25	T1

ANEXO 8. Análisis de varianza y test de Tukey de motilidad progresiva espermática en semen refrigerado de alpaca.

Análisis de varianza de datos transformados del efecto del CLC sobre la motilidad progresiva espermática en semen refrigerado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.00085291	0.00042645	0.07	0.9334 NS
Animal	4	0.07397869	0.01849467	2.99	0.0277 *
Colecta (Animal)	20	0.82627668	0.04131383	6.68	<.0001 **
Error	48	0.29678883	0.00618310		
Total corregido	74	1.19789710			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.752242	33.05895	0.078633	0.237856

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la motilidad progresiva espermática en semen refrigerado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.24089	25	T1
A	0.23953	25	T3
A	0.23315	25	T2

ANEXO 9. Análisis de varianza y test de Tukey de motilidad progresiva espermática en semen post-descongelado de alpaca.

Análisis de variancia de datos transformados del efecto del CLC sobre la motilidad progresiva espermática en semen post-descongelado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.00719702	0.00359851	6.60	0.0030 **
Animal	4	0.00765324	0.00191331	3.51	0.0138 *
Colecta (Animal)	20	0.08126955	0.00406348	7.45	<.0001 **
Error	47	0.02563154	0.00054535		
Total corregido	73	0.12226100			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.790354	44.59396	0.023353	0.052368

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la motilidad progresiva espermática en semen post-descongelado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.065900	25	T3
B	0.048288	24	T2
B	0.042752	25	T1

ANEXO 10. Análisis de varianza y test de Tukey de motilidad total en semen refrigerado de alpaca.

Análisis de variancia de datos transformados del efecto del CLC sobre la motilidad total en semen refrigerado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.00072107	0.00036053	0.06	0.9446 NS
Animal	4	0.07837558	0.01959389	3.10	0.0239 *
Colecta (Animal)	20	0.56242408	0.02812120	4.45	<.0001 **
Error	48	0.30355276	0.00632402		
Total corregido	74	0.94507349			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.678805	16.08654	0.079524	0.494349

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la motilidad total en semen refrigerado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.49758	25	T2
A	0.49530	25	T3
A	0.49017	25	T1

ANEXO 11. Análisis de varianza y test de Tukey de motilidad total de semen post-descongelado de alpaca.

Análisis de varianza de datos transformados del efecto del CLC sobre la motilidad total en semen post-descongelado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.03735261	0.01867631	11.20	0.0001 **
Animal	4	0.04080445	0.01020111	6.12	0.0005 **
Colecta (Animal)	20	0.22908356	0.01145418	6.87	<.0001 **
Error	47	0.07839236	0.00166792		
Total corregido	73	0.38565814			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.796731	20.55286	0.040840	0.198708

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la motilidad total en semen post-descongelado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.22655	25	T3
B	0.19763	24	T2
B	0.17190	25	T1

ANEXO 12. Análisis de varianza y test de Tukey de integridad de acrosoma espermático en semen refrigerado de alpaca.

Análisis de variancia de datos transformados del efecto del CLC sobre la integridad de acrosoma espermático en semen refrigerado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.03427409	0.01713705	2.27	0.1171 NS
Animal	4	0.01525584	0.00381396	0.51	0.7320 NS
Colecta (Animal)	15	0.19085980	0.01272399	1.69	0.0964 NS
Error	38	0.28677386	0.00754668		
Total corregido	59	0.52716360			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.456006	9.537721	0.086872	0.910822

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la integridad de acrosoma espermático en semen refrigerado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.93417	20	T2
A	0.92032	20	T3
A	0.87798	20	T1

ANEXO 13. Análisis de varianza y test de Tukey de los resultados de integridad de acrosoma espermático en semen post-descongelado de alpaca.

Análisis de variancia de datos transformados del efecto del CLC sobre la integridad de acrosoma espermático en semen post-descongelado.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	0.02437066	0.01218533	3.28	0.0486 *
Animal	4	0.12167465	0.03041866	8.18	<.0001**
Colecta (Animal)	15	0.12210607	0.00814040	2.19	0.0258 *
Error	38	0.14130106	0.00371845		
Total corregido	59	0.40945243			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Mean
0.654902	7.857792	0.060979	0.776033

Prueba de comparación múltiple de medias Tukey para la integridad de acrosoma espermático en semen post-descongelado.

Tukey Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.79.837	20	T2
AB	0.78021	20	T3
B	0.74953	20	T1