

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

EFFECTO DE LA OSMOLARIDAD DEL DILUTOR Y  
TEMPERATURA DE PRESERVACIÓN SOBRE  
LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS EN  
ALPACAS (*Vicugna pacos*) EN ÉPOCA  
DE VERANO EN EL AÑO 2023 EN  
LA CIUDAD DE TACNA

TESIS

Presentada por:

Bach. Alddair Alexis Alca Anchapuri

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA – PERÚ

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TESIS

“EFECTO DE LA OSMOLARIDAD DEL DILUTOR Y  
TEMPERATURA DE PRESERVACIÓN SOBRE  
LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS EN  
ALPACAS (*Vicugna pacos*) EN ÉPOCA  
DE VERANO EN EL AÑO 2023 EN  
LA CIUDAD DE TACNA”

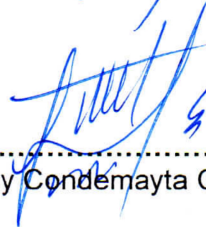
TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 10 DE NOVIEMBRE DEL 2023,  
SIENDO EL JURADO CALIFICADOR:

PRESIDENTE:



.....  
Msc. Cesario Sebastián Cruz Anchapuri

SECRETARIO:



.....  
Msc. Duany Condemayta Cutipa

VOCAL:



.....  
Msc. Maribel Fortunata Medina Rojas

ASESOR:



.....  
Dr. Daniel Gardarillas Espezúa

## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Daniel Gandarillas Espezúa en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Facultad N° 6910-2022-FCAG de la tesis titulada:

EFFECTO DE LA OSMOLARIDAD DEL DILUTOR Y TEMPERATURA DE PRESERVACIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS ESPERMÁTICOS EN ALPACAS (*Vicugna pacos*) EN ÉPOCA DE VERANO EN EL AÑO 2023 EN LA CIUDAD DE TACNA, Presentado por el Bach. Alddair Alexis Alca Anchapuri. Para optar el Título profesional de Médico Veterinario y Zootecnista.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajo de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del **software de similitud textual** Turnitin cuenta con el nivel de **similitud permitido cuyo porcentaje es 9%** Por lo que, **CERTIFICO LA SIMILARIDAD** de la tesis enunciado líneas arriba, la cual esta expedita para continuar con los trámites para la obtención de Título profesional, según corresponda consiguientemente la publicación en el repositorio institucional.

Dr. Daniel Gandarillas Espezúa

DNI: 01771233



Bach. Alddair Alexis Alca Anchapuri

DNI: 74900467



## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme vida, salud, sabiduría, fortaleza para poder culminar mis estudios y enfrentar cada día de mi vida.

A mis padres Richard Alca y Lucila Anchapuri por su amor y por el apoyo que me brindaron en mi carrera universitaria hasta el día de hoy.

A la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por darme la oportunidad de seguir una carrera profesional.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi alma mater la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por brindarme su calurosa estadía durante el trascurso de mi vida universitaria.

A mi asesor el Dr. Daniel Gandarillas Espezúa por sus enseñanzas, guiarme y brindarme su apoyo para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al Proyecto de investigación "Uso de biotecnología para el mejoramiento genético y desarrollo de capacidades en el manejo de alpacas en la zona alto andina de Tacna" por brindarme su apoyo para el desarrollo de esta tesis.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
CONTENIDO .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	ix
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1 Descripción del Problema.....	3
1.2 Justificación.....	5
1.3 Objetivos .....	6
1.3.1 Objetivo General.....	6
1.3.2 Objetivos Específicos.....	7
1.4 Hipótesis.....	7
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO .....	8
2.1 Antecedentes .....	8
2.2 Bases Teóricas.....	10

2.2.1	Camélidos Sudamericanos .....	10
2.2.2	Fisiología y anatomía del aparato reproductivo del macho ...	11
2.2.3	Técnicas de colección de semen .....	16
2.2.4	Características del semen de alpacas. ....	18
2.2.5	Osmolaridad de la célula .....	19
2.2.6	Estrés osmótico en la dilución y temperatura de preservación espermática.....	19
2.2.7	Métodos de preservación del semen de alpaca.....	21
2.3	Marco Conceptual .....	28
CAPÍTULO III MATERIAL Y MÉTODOS.....		29
3.1	Material.....	29
3.1.1	Ubicación Geográfica y Temporal.....	29
3.1.2	Población y Muestra .....	29
3.1.3	Materiales .....	30
3.2	Método .....	32
3.2.1	Tipo y Diseño de Investigación .....	32
3.2.2	Diseño Procedimental.....	32
3.2.3	Análisis de Datos .....	38
CAPÍTULO IV RESULTADOS .....		40
CAPÍTULO V DISCUSIÓN.....		44

CONCLUSIONES .....	49
RECOMENDACIONES.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS.....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de muestras de semen para evaluación de osmolaridad y temperatura de preservación .....	30
Tabla 2. Insumos para la preparación del dilutor Tris-yema de huevo.....	37
Tabla 3. Parámetros espermáticos a osmolaridad de 300, 600 y 1 000 mOsm en temperatura de preservación 5°C y 25 °C .....	40
Tabla 4. Parámetros espermáticos en fresco y después de la dilución con osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm a 5°C de preservación.....	41
Tabla 5. Parámetros espermáticos en fresco y después de la dilución con osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm a 25°C de preservación.....	42

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Parámetros espermáticos (%) a 300 mOsm y temperatura de 5°C.....	62
Anexo 2. Parámetros espermáticos (%) a 600 mOsm y temperatura de 5°C.....	63
Anexo 3. Parámetros espermáticos (%) a 1 000 mOsm y temperatura de 5°C.....	64
Anexo 4. Parámetros seminales (%) a 300 mOsm y temperatura de 25°C.....	65
Anexo 5. Parámetros espermáticos (%) a 600 mOsm y temperatura de 25°C.....	66
Anexo 6. Parámetros espermáticos (%) a 1 000 mOsm y temperatura de 25°C.....	67
Anexo 7. Estadístico para motilidad total comparando osmolaridad y temperatura.....	68
Anexo 8. Estadístico para motilidad total comparando osmolaridad y temperatura.....	68
Anexo 9. Estadístico para integridad funcional de membrana comparando osmolaridad y temperatura .....	69

Anexo 10. Estadístico para viabilidad de acrosoma comparando osmolaridad y temperatura .....	69
Anexo 11. Estadístico para viabilidad espermática comparando osmolaridad y temperatura .....	70

## RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio del proyecto “Uso de biotecnología para el mejoramiento genético y desarrollo de capacidades en el manejo de alpacas en la zona alto andina de Tacna”. El objetivo fue evaluar el efecto de la osmolaridad del dilutor y temperatura de preservación sobre parámetros espermáticos de viabilidad en alpaca. Se colectaron muestras seminales a 4 alpacas macho de los cuales se obtuvieron 20 eyaculados, de las muestras en fresco se evaluó motilidad total, motilidad progresiva, integridad funcional de la membrana, integridad de acrosoma y viabilidad espermática. Posteriormente las muestras fueron divididas en 3 fracciones (300, 600 y 1 000 mOsm), luego éstas a su vez fueron distribuidas en 2 diferentes temperaturas (25 y 5°C) y por último después de 6 horas de preservación se evaluó nuevamente los parámetros espermáticos. Los resultados obtenidos de parámetros espermáticos en fresco fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) en las 3 osmolaridades, la integridad de acrosoma y viabilidad de membrana mostraron diferencias estadísticas a temperatura de 5°C ( $p < 0,05$ ), a diferencia de los parámetros espermáticos a 25°C con las diferentes osmolaridades no mostraron diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ). En conclusión, se encontró que las características espermáticas evaluadas con diferentes osmolaridades y

temperatura de preservación fueron afectadas después de la dilución y sólo la integridad de acrosoma y viabilidad de membrana mostraron diferencias a temperatura de 5°C.

Palabras Clave: *alpaca, osmolaridad, parámetros espermáticos, temperatura*

## **ABSTRACT**

The research work was carried out in the Animal Reproduction laboratory of the school of Veterinary Medicine and Zootechnics of the Jorge Basadre Grohmann National University of Tacna. The objective was to evaluate the effect of the osmolarity of the extender and the due temperature on viability sperm parameters in alpaca. Seminal samples were collected from 4 male alpacas, of which 20 ejaculates were obtained. Total motility, progressive motility, functional integrity membrane sperm, acrosome integrity, and sperm viability were evaluated from the fresh samples. Subsequently, the samples were divided into 3 fractions (300, 600 and 1 000 mOsm), then these in turn were distributed at 2 different temperatures (25 and 5°C) and finally, after 6 hours, the sperm parameters were evaluated again. The results obtained from fresh sperm parameters were statistically different ( $p < 0,05$ ) in the 3 osmolarities, acrosome integrity and membrane viability showed statistical differences at a temperature of 5°C ( $p < 0,05$ ), unlike the parameters sperm at 25°C with the different osmolarities did not show statistical differences ( $p > 0,05$ ). In conclusion, it was found that the sperm characteristics evaluated with different osmolarity and temperature were affected after dilution and only the acrosome

structure and membrane viability showed differences at a temperature of 5°C.

**Keywords:** *alpaca, osmolarity, sperm parameters, temperature*

## INTRODUCCIÓN

El semen de camélidos sudamericanos (CSA) presenta diversos inconvenientes en el proceso y aplicación de técnicas de reproducción asistida (TRA), para mejorar los índices de supervivencia espermática durante el desarrollo de los ensayos experimentales, se busca un ambiente propicio para su preservación (Cooper & Yeung, 2006).

Conocer las condiciones adecuadas para preservar la homeostasis espermática durante su manejo en laboratorio, evita un estrés osmótico y térmico en los espermatozoides; lo que influye en parámetros espermáticos de viabilidad. Teniendo en cuenta estos factores que intervienen en la calidad espermática, el presente estudio evaluó el efecto que ejerce la osmolaridad del dilutor y temperatura de preservación sobre los parámetros espermáticos; se trabajó con osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm en 20 eyaculados de alpaca obtenidos por vagina artificial y se preservaron a temperatura de 25°C y 5°C durante 6 horas. Trascurrido este tiempo los valores de parámetros espermáticos de viabilidad no presentaron diferencias entre las osmolaridades, en cuanto a la temperatura de preservación se observó diferencias en algunos parámetros como motilidad total, integridad de acrosoma y viabilidad de membrana. El efecto de la

osmolaridad y temperatura de preservación sobre la homeostasis celular va en concordancia con la actividad metabólica de la célula (Petrunkina et al., 2001); durante el período de preservación a 25°C, existe un desgaste metabólico que influye en la calidad de los parámetros espermáticos a diferencia de preservar a 5°C.

El resultado de esta investigación aporta datos para futuras investigaciones sobre el comportamiento fisiológico del espermatozoide frente a un medio hiposmótico e hiperosmótico. Evaluando estos factores se quiere reducir el estrés osmótico y térmico de la célula espermática, para favorecer el desarrollo de TRA en esta especie.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Descripción del Problema

La aplicación de TRA como la inseminación artificial (IA), transferencia de embriones (TE) y fecundación *in vitro* (FIV); se presentan como importantes alternativas para contribuir en la mejora de la calidad genética en camélidos sudamericanos; donde un 60% de la población de animales presentan problemas reproductivos (Huanca & Cordero, 2007). Sin embargo, se observa una eficiencia relativamente baja con respecto a la aplicación de estas TRA (Morrell & Abraham, 2020), debido a un limitado conocimiento sobre fisiología reproductiva en esta especie, siendo base para el desarrollo adecuado de las tecnologías reproductivas.

El espermatozoide experimenta cambios morfológicos y funcionales desde la espermatogénesis hasta la fertilización del ovocito; una de ellas es la adaptación osmótica que experimenta el espermatozoide en las diferentes etapas de desarrollo como en la maduración, almacenamiento en el epidídimo, en la eyaculación y por último en el tracto genital femenino (Petrunkina et al., 2007; Cooper & Yeung, 2006).

La capacidad del espermatozoide para afrontar diversos medios en los que se encuentra y mantener parámetros espermáticos viables ha sido uno de los grandes inconvenientes para la aplicación de TRA, debido al estrés osmótico que presenta la célula espermática durante el desarrollo de las técnicas de conservación como la congelación, vitrificación y liofilización; además, las desventajas que presentan estas técnicas son la necesidad de equipo especializado, lo que resulta en mayores costos para la viabilidad de estas técnicas (Carretero et al., 2021). Controlando los factores osmóticos y térmicos durante el manejo de muestras seminales se emplearía de una forma propicia técnicas alternativas de conservación y almacenamiento de semen.

Guthrie et al. (2002) reporta que la motilidad del espermatozoide bovino disminuye abruptamente cuando las células son incubadas en soluciones hiposmóticas ( $<$  a 350 mOsm) o hiperosmóticas ( $>$  a 350 mOsm). Asimismo, Rosato et al. (2002) en humanos y Van Thuan et al. (2005) en ratones determinaron que los espermatozoides suspendidos en soluciones con osmolaridades entre 300 y 600 mOsmol mostraron una disminución en los parámetros de motilidad y características cinéticas, y a 800 mOsm toda motilidad cesa, pero mantiene una viabilidad debido a la integridad de cromatina.

La adaptabilidad osmótica del espermatozoide a condiciones anisomóticas es un factor importante a tomar en cuenta durante los procedimientos de preservación espermática, con el objetivo de investigar la asimilación de solutos por parte de la célula espermática mediante el manejo de solutos y temperatura; el presente trabajo propone evaluar el efecto de la osmolaridad del dilutor y la temperatura de preservación sobre parámetros espermáticos en alpaca macho.

## **1.2 Justificación**

La crianza de alpacas es una actividad económica de gran importancia para las poblaciones alto andinas del Perú debido a que producen fibra de gran finura y carne de alto valor nutricional; esto se refleja en la gran demanda mundial de productos provenientes de esta especie (MINAGRI, 2019). Además, la producción de alpacas representa casi la única fuente de proteínas de elevado valor biológico para las comunidades andinas (Gastelu & Zuñiga, 2019).

La aplicación de TRA como la inseminación artificial, transferencia de embriones y la fecundación in vitro, permiten incrementar el número de animales de alto valor genético, facilitando así el cruzamiento dirigido de hembras y machos de gran élite con características genéticas deseables (Vallecillo, 2011). En este sentido el aporte metodológico del proyecto de

investigación es fomentar el estudio de las características reproductivas del semen de alpaca e identificar factores que intervienen en el manejo de las muestras seminales como la osmolaridad del dilutor y temperatura de preservación, para lograr una eficiente aplicación de tecnologías reproductivas en esta especie.

El aporte científico del estudio brinda conocimiento de los cambios osmóticos que atraviesa el espermatozoide es similar a lo que sucede en el proceso de congelación en condiciones hipertónicas atraviesa condiciones hiposmóticas durante el enfriamiento, debido al proceso de descongelación (Mazur, 2004; Morris et al., 2007); es así que nos hace inferir que existen factores manejables para la supervivencia espermática durante estos cambios. Con el desarrollo del estudio se brindará un aporte científico al conocimiento de la respuesta de adaptación del espermatozoide a condiciones hiposmóticas e hipertónicas en diferentes temperaturas de preservación y cómo los parámetros espermáticos responden a estos cambios osmóticos y térmicos.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar el efecto de la osmolaridad del dilutor y temperatura de preservación sobre parámetros espermáticos en alpacas (*Vicugna pacos*).

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

Comparar diferentes osmolaridades del dilutor (300, 600 y 1 000 mOsm) sobre parámetros espermáticos a temperatura de 5°C en alpacas (*Vicugna pacos*).

Comparar diferentes osmolaridades del dilutor (300, 600 y 1 000 mOsm) sobre parámetros espermáticos a temperatura de 25°C en alpacas (*Vicugna pacos*).

### **1.4 Hipótesis**

#### **Hipótesis nula: Ho**

Las diferentes osmolaridades del dilutor y temperaturas de preservación muestran efectos similares sobre los parámetros espermáticos en alpacas (*Vicugna pacos*).

#### **Hipótesis alternativa: Ha**

Las diferentes osmolaridades del dilutor y temperaturas de preservación muestran efectos diferentes sobre los parámetros espermáticos en alpacas (*Vicugna pacos*).

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes**

Internacional:

Carretero et al. (2021) realizaron un estudio con el objetivo de evaluar los efectos de la deshidratación sobre la integridad del ADN espermático usando este método para preservar los espermatozoides de llama. Se realizaron dos experimentos: 1) conservación de semen a 5 °C durante 60 días en diferentes soluciones hiperosmóticas (500, 800, 1 000 y 1200 mOsmol/l) (n = 6, repeticiones = 2) y 2) conservación de semen a 5 °C y -20 °C por 60 días en las mismas soluciones hiperosmóticas (n = 6, repeticiones=2). La motilidad, integridad funcional de la membrana y viabilidad fueron menores cuando los espermatozoides estaban deshidratados, mientras que la morfología de las células espermáticas no se vio afectada. En conclusión, hubo una marcada disminución ( $P < 0,05$ ) del porcentaje de espermatozoides con ADN intacto en todas las soluciones cuando la duración de la conservación aumentó, en cuanto a valores de ADN intacto con respecto a la temperatura se presentó mayores valores a -20°C que los espermatozoides conservados a 5°C.

Gloria et al. (2021) evaluaron el efecto de la composición del medio y temperatura (25 y 5°C) en la adaptabilidad del semen de conejo a condiciones anisomóticas. Los espermatozoides de conejo, por lo tanto, se diluyeron en ambas temperaturas (25 y 5°C) en medios a base de electrolitos o azúcares en condiciones osmóticas crecientes (100 a 1 000 mOsm/kg) y las variables espermáticas que se evaluaron fueron cinética espermática, integridad de la membrana y potencial de membrana mitocondrial. Los resultados de este estudio indicaron que los espermatozoides de conejo tienen diferente adaptabilidad a condiciones anisomóticas inducidas por medios a base de azúcar y electrolitos y que la temperatura en el que se inicia el estrés osmótico afecta la respuesta celular.

Van Thuan et al. (2005) realizaron un estudio para investigar la conservación de espermatozoides en medio simple sin congelar y para examinar los efectos de los espermatozoides preservados en la fertilización y desarrollo después de la inyección en ovocitos de ratón maduros. Los espermatozoides se recolectaron del epidídimo y almacenados en diversas condiciones: 1) Medio KSOMaa complementado con 0,1 o 4 mg/ml de BSA y mantenido a temperatura ambiente (RT, 278C); 2) Medio KSOMaa que contiene 4 mg/ml de BSA (KSOM-BSA) y mantenido a 4°C, temperatura ambiente o 37°C; 3) Medio KSOM-BSA con osmolaridad que oscila entre

271 a 2 000 mOsmol, ajustado por adición de NaCl y mantenido en 4°C y 4) un sistema de conservación de dos pasos que consta de almacenamiento en 800 mOsm KSOM-BSA durante 1 semana a temperatura ambiente seguido de almacenamiento a -20°C. Los resultados de conservación óptimos para espermatozoides de ratón eran 800 mOsmol KSOM que contiene 4 mg/ml de BSA y una temperatura de mantenimiento de 4°C. Concluyendo que los espermatozoides de ratón se pueden almacenar en medio KSOM-BSA de 800 mOsm a temperatura ambiente durante 1 semana y luego a -20°C durante un máximo de 3 meses y retener su competencia para ICSI.

## **2.2 Bases Teóricas**

### **2.2.1 Camélidos Sudamericanos**

Los camélidos derivan de especies prehistóricas originadas en Norteamérica que desaparecieron hace más de 11 millones de años. Antes de su desaparición algunos camélidos ancestrales migraron hacia el sur del continente para evolucionar en dos especies domésticas (llama: *Lama glama* y alpaca: *Vicugna pacos*) y dos especies silvestres (guanaco: *Lama guanicoe* y vicuña: *Vicugna vicugna*). Estudios de ADN mitocondrial sugieren que la vicuña y el guanaco fueron los antecesores de las alpacas

y las llamas respectivamente, en un proceso de domesticación que se inició en los Andes centrales de Sudamérica hace 6 000 años (Marín et al., 2007).

La crianza de camélidos domésticos constituye el principal medio de sustento para muchos productores de escasos recursos en los países andinos centrales de Sudamérica que incluyen a Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina y Chile. Estos animales convierten con eficiencia la vegetación nativa de los altos Andes en varios productos, principalmente en carne y fibras de alta calidad (Quispe et al., 2009).

La alpaca es uno de los camélidos sudamericanos importantes en la producción de fibra, estos tienen un peso ligero y buena fortaleza; en esta especie, hay dos variedades que tienen distintas características fenotípicas. La alpaca Huacaya se caracteriza por tener un vellón compacto y esponjoso; mientras que la alpaca Suri por presentar fibras de gran longitud organizadas en rizos colgantes. Ambas variedades tienen similar comportamiento reproductivo tales como la ovulación inducida, viscosidad de semen, bajas tasas de fertilidad y la producción de una cría por año (Antonini et al., 2004).

### **2.2.2 Fisiología y anatomía del aparato reproductivo del macho**

Los testículos de una alpaca adulta se mantienen en un escroto no pendular situado de 5 a 9 cm debajo del ano. Los testículos son pequeños,

elípticos y posicionados en orientación vertical u orientación dorso-caudal oblicuo. Normalmente ambos testículos son del mismo tamaño y de consistencia firme, con movimiento libre en el escroto. La cabeza, cuerpo y cola del epidídimo son pequeños y conectados a los testículos (Morrell & Abraham, 2020).

El escroto mantiene los testículos a una temperatura ligeramente más baja que la temperatura del cuerpo. El peso promedio de los testículos completamente desarrollados es de aproximadamente 15 g, los testículos son relativamente pequeños, en animales adultos miden entre 3,5 y 4 cm de largo y de 2,5 y 3 cm de ancho, móviles dentro de la bolsa escrotal. El conducto deferente es muy delgado (2mm) en su inicio y engrosa (3mm) cuando ingresa a la cavidad abdominal y termina cerca de la vejiga (Morrell & Abraham, 2020).

La próstata está constituida por un cuerpo claramente definido a nivel del cuello de la vejiga y una parte diseminada a lo largo de la uretra pélvica. El cuerpo de la próstata mide aproximadamente 3x2 cm. La glándula bulbouretral es ovalada y localizada en ambos lados de la uretra a la salida de la pelvis; y no presentan glándula vesicular (Sumar, 1991).

El pene es de consistencia fibroelástica, con un pequeño proceso cartilaginoso conocido como proceso uretral. La longitud del pene sin

erección de alpaca es de 26 cm, y la flexura sigmoidea es preescrotal. El prepucio es pequeño, localizado a 15 cm caudal al ombligo, con una apertura triangular en orientación hacia caudalmente. Durante la micción, los camélidos dirigen el chorro de orina hacia atrás entre las patas traseras. El músculo protector del prepucio tira el prepucio hacia adelante antes de aparearse, cambiando la dirección de la apertura del prepucio y permitiendo que el pene se dirija hacia adelante (Bravo, 2014).

### **Espermatogénesis**

La espermatogénesis es la suma de transformaciones que resultan en la formación de espermatozoide a partir de espermatogonia, mientras que se mantiene el número de espermatogonias (Amann & Schanbacher, 1983).

La espermatogénesis comprende fases secuenciales de mitosis, meiosis y postmeiosis de células espermáticas precursoras. Este proceso se lleva a cabo en los compartimientos basal y adluminal del túbulo seminífero, separados funcionalmente entre sí por las células de Sertoli, que garantizan el ambiente propicio para que se lleve a cabo la espermatogénesis y resultan en la formación de los espermatozoides (Galina, 2008).

Estudios histológicos testiculares han mostrado que los túbulos seminíferos en las alpacas tienen un diámetro de 174 – 237µm y que el lumen aparece a los 12 meses de edad y que los primeros espermatozoides y células de Leydig observables se producen poco después, a los 15 a 18 meses de edad (Bravo et al., 2000). Sin embargo, aún no se conoce en detalle el proceso de espermatogénesis.

La espermatogénesis incluye dos fases: a) la espermatocitogénesis, en la cual las espermatogonias sufren una división celular hasta transformarse en espermátides y b) la espermiogénesis, en la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados (Hafez & Hafez, 2002).

A. Espermatocitogénesis: Después de la pubertad y durante la vida reproductiva del macho, las espermatogonias se dividen de una manera rápida y sucesiva por mitosis. Donde las espermatogonias AO (células tronco) son la fuente para la continua producción de gametos, a partir de los cuales se originan las espermatogonias tipo A1 y otras células germinales. Las espermatogonias tipo A1 se dividen progresivamente para formar los tipos A2, A3 y A4. El tipo A4 se divide una vez más para formar espermatogonias intermedias, que a su vez forma la espermatogonia tipo B. Todas ellas

representan estadios sucesivos del desarrollo de la espermatogonia, conocida también como fase proliferativa (Hafez & Hafez, 2002; Galina, 2008).

Las espermatogonias tipo B se dividen por lo menos una vez, y probablemente dos veces, para formar los espermatocitos primarios. El espermatocito primario realiza su primera división meiótica o reduccional para dar origen a los espermatocitos secundarios. Ésta es una fase prolongada donde ocurren los cambios de material genético entre los pares de cromosomas. Durante este período no sólo se realiza la reducción en el número de cromosomas somáticas, sino que también los cromosomas sexuales se separan de manera que un espermatocito secundario recibe el cromosoma X y el otro el cromosoma Y. En la segunda división meiótica de cada espermatocito secundario se produce dos espermátides (Hafez & Hafez, 2002; Galina, 2008).

- B. Espermiogénesis: Consiste en la transformación de las espermátides, redondas, en espermatozoides estructuralmente equipados para fertilizar al óvulo. Estos son cambios que ocurren cuando las espermátides están en contacto con el citoplasma de las células de Sertoli. Durante este proceso comienzan a diferenciarse

las partes que constituyen el espermatozoide, primero la cabeza, el acrosoma, el cuello y la cola. Las diversas etapas de transformación de las espermátides se dividen en cuatro fases: de Golgi, de encasquetamiento, acrosómica y de maduración (Hafez & Hafez, 2002; Galina, 2008). La liberación de las células germinales formadas al interior de los túbulos seminíferos se denomina espermiación. Los espermatozoides son liberados con una gota citoplasmática en el cuello (gota proximal) (Hafez & Hafez, 2002).

### **2.2.3 Técnicas de colección de semen**

El comportamiento sexual de los camélidos sudamericanos presenta características muy peculiares. Las circunstancias de la posición coital y su temperamento nervioso hacen que la obtención de semen presente serias dificultades (Bustinza, 2001).

Se vienen practicando diferentes métodos de recolección de semen en camélidos sudamericanos hasta el momento. Los cuales son: (i) Colección de semen por vagina artificial (Bravo et al., 2000); (ii) colección por electro-eyaculación (Director et al., 2007); (iii) de epidídimo (Morton et al., 2007).

A. Electroeyaculación: Se lleva a cabo utilizando un equipo de fabricación nacional, con una intensidad máxima de 40 voltios, se

obtienen muestras de semen con la ventaja de realizar la colección sin la necesidad de tener hembras en celo, acortar el tiempo de colección y realizarla a lo largo de todo el año; también se utiliza esta técnica para obtener semen de vicuñas y pacovicuñas. Los resultados de electroeyaculación muestran gran variabilidad entre animales y aun entre el mismo animal, además de obtenerse semen muy diluido con las secreciones de las glándulas anexas, contaminado con orina y baja concentración espermática.

- B. Vagina artificial: Una de las técnicas de colección más utilizada, esta técnica fue desarrollada con la ayuda de un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de cópula; la cual consiste en un tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 de largo con una funda interna de látex, un cono de látex al que envolvía un alambre en espiral simulando la cervix de la alpaca y al final un frasco de colección de semen de ovino o un tubo de centrífuga, el agua a 45° se coloca por una válvula-espita; los machos aceptan el maniquí después de un período de entrenamiento (Bravo et al., 2000).
- C. De epidídimo: Los espermatozoides epididimales pueden ser recuperados de animales (recuperación post-mortem) muchas horas o días después de muertos (Kaabi et al., 2003), ello provee una oportunidad para usar valioso material genético, a través de

tecnologías de reproducción asistida o su preservación. El epidídimo tiene fundamentalmente dos funciones, la maduración y el almacenamiento espermático (Chenoweth, 1997). Los espermatozoides maduran y adquieren su capacidad fecundante en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y se almacenan en la cola del epidídimo (Amann & Schanbacher, 1983). Con esta consideración, es importante señalar que se podrían obtener espermatozoides viables provenientes de la cola del epidídimo con movilidad y capacidad fecundante, poco tiempo después de la muerte del animal, pudiéndose ser procesados y congelados para su posterior uso en inseminación artificial (Albers & Barrios, 2006).

#### **2.2.4 Características del semen de alpacas.**

El semen de camélidos sudamericanos tiene una naturaleza viscosa y bajo volumen de colecta (Kershaw-Young & Maxwell, 2012); cuando se utiliza el método de vagina artificial con maniquí el volumen varía entre 1,03 a 3,4 ml, donde el 88,5% del volumen es plasma seminal, el pH varía entre 6,8 a 7,83, el color es blanco lechoso, tiene una baja concentración espermática que oscila entre 21,8 a 105,8 × 10<sup>6</sup> espermatozoides / ml, motilidad entre 46 a 87,6%, vitalidad entre 40,7 a 82,5% e integridad

funcional de membrana entre 30,7 a 67,5% (García et al., 2017; Bravo *et al.*, 2000; Santiani et al., 2005).

### **2.2.5 Osmolaridad de la célula**

La osmolaridad se define como la concentración de solutos totales en una solución, con la propiedad de ejercer presión dentro de dicha disolución. Esta propiedad de los solutos está estrechamente relacionada con lo que se denomina presión osmótica, la cual está involucrada en la regulación del flujo de agua a través de una membrana, fenómeno llamado ósmosis. De este modo, cuando la concentración de solutos (mOsm/kg de agua) es menor en el medio donde se encuentra inmersa una célula que en su propio citosol (hiposmótica), esta tiende a aumentar su volumen, introduciendo agua del medio; más cuando la célula se encuentra inmersa en una solución concentrada (hiperosmótica), sufre reducción del tamaño y arrugamiento de la membrana por la salida de agua (Bolsover et al., 2004).

### **2.2.6 Estrés osmótico en la dilución y temperatura de preservación espermática**

Cada tipo de células posee una velocidad óptima de regulación del estrés osmótica durante la congelación, que garantiza la supervivencia luego de la criopreservación. Si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de

criopreservación aumenta. El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada. Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada (Watson, 2000).

En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima supervivencia, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo, la tasa de enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua intracelular gracias a la presión osmótica extracelular, y prevenir la formación de cristales de hielo intracelular, lo cual es letal para la célula. Las células espermáticas son congeladas a tasas bastante rápidas, en el rango de 15-60 °C/ min, lo cual ha sido empíricamente calculado como la velocidad de congelación con mejor tasa de supervivencia celular (Mazur, 1984).

## **2.2.7 Métodos de preservación del semen de alpaca**

### **Refrigeración de semen**

Las muestras de semen también han sido exitosamente conservadas por refrigeración, así como lo reporta García et al. (2017), las muestras colectadas fueron diluidas con una solución compuesta por 0,3 M Tris, 27,75 mM glucosa, 94,7 mM ácido cítrico, ajustada a un pH  $7,25 \pm 0,05$  y una osmolaridad de  $333,0 \pm 2,80$  mOsm. A esta solución se le añadió tilosina 0,1 mg/ml, gentamicina 0,5 mg/ml y lincomicina 1,8 mg mg/ml y de yema de huevo a una concentración final de 20% (v/v). Las muestras de esta forma fueron mantenidas a 35 °C, y luego a 15 °C por 8 h y refrigeradas a 5 °C por 24 h.

### **Congelación de semen**

La congelación de los espermatozoides viene a ser una detención del proceso de la actividad del espermatozoide. El concepto es que el espermatozoide almacenado en nitrógeno líquido (NL) a  $-196^{\circ}\text{C}$ , retiene su potencial de fertilización indefinidamente. La congelación es un proceso de estrés para los espermatozoides, debido a los cambios de temperatura que sufre el espermatozoide durante el proceso de enfriamiento, asimismo, se tiene como factor de estrés también a la descongelación (Watson, 2000).

El éxito de esta tecnología depende de que el semen utilizado mantenga su poder fecundante tras su descongelación. Para conseguir dicho objetivo, en todo protocolo de congelación seminal han de controlarse rigurosamente los sucesivos pasos que constituyen el proceso de la congelación, y de forma especial aquellos que influyen más directamente sobre la estructura y función de las membranas espermáticas; y sobre el metabolismo celular (Hafez & Hafez, 2002; Muiño, 2008).

Cuando el semen se congela y se conserva a muy bajas temperaturas, esto en NL (-196° C), las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen se pueda conservar durante mucho tiempo con lo que se pueden conservar genes para futuro uso y se asegure la disponibilidad de un semental en particular. También de esta forma se facilita el transporte de semen, y el semen se puede recoger y conservar en épocas distintas a la estación reproductiva. En consecuencia, la utilización de los sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen (Evans & Maxwell, 1990).

El proceso de criopreservación de semen involucra 3 fases: a) Fase de enfriamiento, b) Fase de congelamiento, y c) Fase de descongelamiento (Santiani, 2005).

### Fase de enfriamiento

Durante la fase de enfriamiento la temperatura del semen diluido es disminuida gradualmente desde la temperatura de 30°C hasta 5° C. Esta fase tiene una duración por lo menos 1 a 3 horas (Hafez & Hafez, 2002). En esta fase se produce una disminución de la motilidad espermática a causa de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Wang et al., 1997). Las membranas celulares son las estructuras que sufren mayor daño en los procesos de criopreservación, debido a la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre 10 y 16° C, alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Ruiz, 2005).

Terminada la fase de enfriamiento debe haber un período de transición. En este período se adicionan sustancias crioprotectores al semen diluido, como el glicerol. El glicerol se usa casi universalmente como agente crioprotector. Por lo general, se añade glicerol al semen después de enfriarlo a 5°C; sin embargo, proporciona mayor protección cuando se le agrega inmediatamente antes de congelar. La cantidad final varía de menos 5% a 10% (Hafez & Hafez, 2002). La mezcla de semen y diluyente se deja reposar durante varias horas antes de congelarla, para permitir que

las células espermáticas se equilibren con el diluyente y para que las membranas espermáticas se adapten a las bajas temperaturas (normalmente a 5°C) un tiempo de aproximadamente de 4 a 6 horas es óptimo, dependiendo del medio utilizado (Hafez & Hafez, 2002; Muiño, 2008).

#### Fase de congelación

La fase de congelamiento es un período crítico del proceso de criopreservación. Durante esta fase los espermatozoides son expuestos a un estrés de tipo osmótico y térmico (Watson, 2000). Cuando la temperatura alcanza los -10° C se forma núcleos de hielo de agua pura en el medio extracelular, lo que provoca un incremento progresivo en la concentración de solutos. La fracción líquida se vuelve hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, el agua contenida intracelularmente sale de la célula, lo que permite mantener el equilibrio osmótico dentro de la suspensión (Watson et al., 1988).

La formación del hielo intracelular y el consecuente daño celular se puede evitar usando una velocidad de congelamiento adecuada, la que debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular y evitar la formación de cristales de hielo intracelular, y al mismo

tiempo, debe ser lo suficientemente rápida para prevenir la deshidratación excesiva (Muiño, 2008).

La congelación de semen epididimario bovino se realiza en vapores de nitrógeno aproximadamente entre -110 a -114°C por un período de 10 minutos o enfriando entre -80 y -120°C por un período de 20 minutos, para finalmente ser sumergidas en nitrógeno líquido (-196°C) y almacenarlas hasta su uso (Martins et al., 2009).

#### Fase de descongelación

Finalmente, la fase de descongelamiento es tan importante como la fase de congelamiento, debido a que los espermatozoides tienen que atravesar nuevamente el rango crítico de temperatura, la descongelación puede realizarse a 34°C por 40 s, 37°C por min o 65°C por 6 s (Kaabi et al., 2003).

#### **Conservación de semen por vitrificación**

La vitrificación de esperma es un método reciente de criopreservación, basado en la bajada de temperatura a alta velocidad introduciendo el esperma directamente en nitrógeno líquido, reduciendo la formación de grandes cristales de hielo, como ocurre en la congelación lenta tradicional (Consuegra, 2017).

La vitrificación supone un método alternativo a la criopreservación convencional que permite que la solución pase a un estado vítreo, evitando el daño de la congelación tradicional (Fahy et al., 1984). Este procedimiento se basa en la congelación a alta velocidad: 106 –107 °C/min (Fahy & Wowk, 2015), donde los procesos de solidificación ocurren sin formación de cristales de hielo. Para ello, se emplean altas concentraciones de crioprotectores que ayudan a aumentar la viscosidad del medio (Morris et al., 2006), obteniendo buenos resultados en la vitrificación de embriones y ovocitos. Sin embargo, al emplear esta tecnología para la criopreservación de espermatozoides no se obtienen buenos resultados debido a la baja tolerancia de estas células a la alta concentración de crioprotectores (Isachenko et al., 2003).

### **Conservación de semen por deshidratación**

La deshidratación como medio de preservación para espermatozoides consiste en someter al espermatozoide a un medio hiperosmótico y a bajas temperaturas de conservación (Van Thuan et al., 2005); esto debido a que en condiciones fisiológicas el espermatozoide presenta un aumento en su desplazamiento inmediatamente después de la recolección, estas condiciones conducen a una rápida disminución de la motilidad después de 1 día en comparación con espermatozoides mantenidos a

temperaturas más bajas (-20°C). Es posible que la alta motilidad de los espermatozoides a mayor temperatura aumenta el metabolismo de los espermatozoides, lo que lleva a un consumo rápido de las reservas de energía almacenadas y consiguiente disminución de la viabilidad de los espermatozoides en comparación con espermatozoides mantenidos a bajas temperaturas. (Guthrie et al., 2002). La osmolaridad del medio de conservación del esperma resulta en una disminución de la motilidad del espermatozoide, asimismo retienen mayor capacidad para activar los ovocitos y niveles más altos de competencia de desarrollo. La motilidad y las características cinéticas progresivamente se reducen con el aumento de la osmolaridad y la motilidad de los espermatozoides casi desaparece en un medio de 600 mOsmol (Rossato et al., 2002).

Por lo tanto, espermatozoides inmóviles no son sinónimos de esperma muerto; el esperma almacenado en un medio de alta osmolaridad y desarrollo a término completo es respaldado por la inyección en ovocitos maduros. Esto sugiere que el cese inmediato del movimiento de los espermatozoides antes del almacenamiento puede ayudar a conservar energía y disminuir el proceso catabólico y podría aumentar la viabilidad de los espermatozoides después de la conservación a largo plazo. Asimismo, la mayoría de los medios utilizados en la criopreservación de esperma se complementan con glicerol, que disminuye el movimiento de los

espermatozoides antes de la congelación, aumenta la motilidad y viabilidad posteriores a la descongelación (Gil et al., 2003).

### **2.3 Marco Conceptual**

**Anisomótica:** Es aquella condición donde no existe un equilibrio en la concentración de soluto fuera y dentro de una célula.

**Deshidratación:** Déficit de agua que cursa con molalidad efectiva de los líquidos hacia el exterior de la célula.

**Semen:** Fluido espeso y de color blanquecino que está compuesto por un líquido en el que se encuentran en suspensión los espermatozoides; se produce por las secreciones de distintas glándulas del aparato reproductor masculino, principalmente la próstata y los testículos.

**Hiperosmolaridad:** Se caracteriza por un intercambio osmótico de líquido desde la región extracelular a la región intracelular, mayor concentración de solutos extracelular y menor en la intracelular.

**Test hiposmótico:** La prueba de endosmosis (hypoosmotic test, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica.

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Ubicación Geográfica y Temporal**

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de biotecnología reproductiva animal del proyecto de investigación: “Uso de la biotecnología para el mejoramiento genético y desarrollo de capacidades en el manejo de alpacas (*Vicugna pacos*) en la zona alto andina de Tacna”, perteneciente a la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann ubicado a una coordenada UTM 366907 8006025 y altitud promedio de 599 msnm, en la provincia de Tacna. Con una temperatura que fluctúa entre 22 a 30° en época de verano y 10 a 24° de temperatura en época de invierno. El estudio se realizó durante los meses de febrero y marzo del 2023.

##### **3.1.2 Población y Muestra**

Se trabajó con un grupo de 4 alpacas machos de la raza Huacaya seleccionados de una población de 10 alpacas; de 4 a 7 años de edad, entrenados a la colecta de semen mediante vagina artificial incorporada a un maniquí. Los animales seleccionados presentaban una condición

corporal de 3 a 3,5; clínicamente sanos y su alimentación fue a base de heno de alfalfa y avena.

Las muestras colectadas fueron divididas en 3 fracciones y sometidas a diferentes osmolaridades del dilutor (300, 600 y 1 000 mOsm) y éstos a su vez mantenidos a 3 diferentes temperaturas de preservación (25°C y 5°C) respectivamente.

**Tabla 1.**

*Número de muestras de semen para evaluación de osmolaridad y temperatura de preservación*

Osmolaridad del dilutor (mOsm)	Temperatura de preservación (°C)	N° de repeticiones	N° de muestras evaluadas
300	25	20	40
	5	20	
600	25	20	40
	5	20	
1 000	25	20	40
	5	20	
Total de muestras			120

**3.1.3 Materiales**

**Equipos de laboratorio.**

- Microscopio de contraste de fases
- Baño María

- Refrigeradora
- Micro-osmómetro

### **Material de laboratorio**

- Vasos de precipitación de 50mL.
- Probetas 50 mL.
- Tubos falcon de 15 mL
- Termómetro.
- Tubos de ensayo de 15 mL.
- Vagina artificial
- Láminas portaobjetos.
- Láminas cubreobjetos.
- Jeringas descartables de 5 y10 mL.
- Micropipetas
- Tips (puntas descartables)

### **Reactivos**

- Eosina (5%).
- Nigrosina (10%).
- Fructuosa.
- Formaldehido.
- Citrato de sodio bihidratada.
- Tris (Hidroximetil-aminometano)
- Ácido cítrico.
- Azul de comassie
- Ácido Clorhídrico

- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Yema de huevo.
- Agua bidestilada.
- Solución salina normal (0,90% NaCl).
- Alcohol 70%

## **3.2 Método**

### **3.2.1 Tipo y Diseño de Investigación**

El proyecto de investigación es experimental longitudinal, en la cual se manejan variables de la unidad de estudio y las muestras de estudio fueron evaluadas en distintos momentos durante el desarrollo del estudio.

### **3.2.2 Diseño Procedimental**

#### **Colecta y evaluación del semen fresco**

El semen fue colectado mediante vagina artificial, se realizó 5 colectas de semen ( $r=5$ ) por macho, cada muestra obtenida se fraccionó en 3 partes para los tratamientos de osmolaridad (300 mOsm, 600 mOsm y 1 000 mOsm) posteriormente cada fracción fue dividida y almacenada en 2 diferentes temperaturas (25°C y 5°C), se evaluó los parámetros espermáticos en fresco y después de la dilución a las 6 horas, con las diferentes osmolaridades y temperaturas de preservación.

#### Colección de semen con vagina artificial:

- La funda de látex se colocó en el interior de un tubo de PVC y se sujetó en un extremo del tubo colector de semen con una liga. Por el otro extremo del tubo se vertió agua caliente a 43°C en el interior del tubo y se sujetó con ligas.
- Se insufló aire por la boquilla del tubo, logrando una presión de un dedo meñique en el interior del látex. La vagina artificial armada se colocó en la parte interna del maniquí. Se sujetó bien la vagina al maniquí y se colocó en posición de cúbito ventral.
- Cada macho con su respectivo maniquí fue ubicado a una distancia de 1,5 m respecto a otro macho.
- Se esperó unos 15 a 20 min para que el macho eyacule en la vagina artificial, al término de la eyaculación se retiró cuidadosamente la vagina del maniquí y se llevó al laboratorio para su evaluación seminal.

## Evaluación de los parámetros espermáticos:

### **Evaluación macroscópica**

- El volumen se determinó en mililitros (ml) directamente del tubo graduado.
- La filancia se determinó con la ayuda de una pipeta para poder realizar la expansión del semen y se evaluó con una regla métrica.

### **Evaluación microscópica**

Para la evaluación microscópica de los parámetros espermáticos se empleó un microscopio de contraste de fases (Carls Zeiss) con el Sistema de Análisis Computarizado de Semen (CASA-Androvisión).

*Motilidad y concentración espermática:* Se tomó 3  $\mu$ l (microlitro) de muestra seminal diluida y se depositó en la cámara leja (sistema CASA), se selecciona el programa motilidad y concentración; se evalúa 5 diferentes campos de la muestra y el sistema determinó los parámetros de motilidad y concentración.

### *Integridad de la membrana espermática: Test de Host*

- Preparación de la solución hiposmótica a 150 mOsm consiste en: fructuosa (13,51 g) y citrato de sodio 2H<sub>2</sub>O (7,35 g) en 1 litro de H<sub>2</sub>O destilada. (Jeyendran et al., 1984, p. 219-228).
- Se llevó a baño María (37°C) un tubo falcón con 900 µl de solución hiposmótica. Se extrajo 100 µl de muestra seminal, se agregó a la solución hiposmótica y se mantuvo por 30 minutos en baño María.
- Pasado los 30 minutos, se agregó 100 µl de formol al 10% al tubo falcón y se retiró del baño María.
- Se evaluó la reacción del semen a la solución hiposmótica, en un microscopio de contraste de fases a 400X; se observó el número de espermatozoides reaccionados como aquellos que presentaron un hinchamiento y enrollamiento en su cola.
- Se realizó un conteo de 200 espermatozoides y se sacó el porcentaje de espermatozoides reaccionados y no reaccionados.

### *Integridad del acrosoma*

- Se colocó 10 µl de muestra seminal en un portaobjeto precalentado a 37°C y se agregó 10 µl de Azul de Coomassie (CB) al 0.22 % para

realizar un frotis y se dejó reposar por un tiempo de 5 minutos para luego enjuagarlo.

- Se observó en un microscopio óptico a 1 000x (Carretero et al., 2018). Los espermatozoides teñidos con CB se clasificarán en dos categorías: presencia de acrosoma (tinción violeta a nivel acrosomal) y ausencia de acrosoma (ausencia de tinción a nivel acrosomal).

Se realizó un conteo de 200 espermatozoides y se sacó el porcentaje de espermatozoides que adquirieran la coloración con CB para integridad de acrosoma.

### **Dilución del semen ajustado a una osmolaridad de 300, 600 y 1 000 mOsm a temperatura de 25°C y 5°C**

Para la dilución del semen se utilizó el dilutor Tris-yema de huevo, para la preparación del dilutor se emplearon los insumos mencionados en la Tabla 2, posteriormente se determinó la concentración de solutos con la ayuda del microsmómetro. Para ajustar la osmolaridad del dilutor a 300, 600 y 1 000 mOsm se empleará la fórmula de ajuste de osmolaridad.

**Tabla 2.**

*Insumos para la preparación del dilutor Tris-yema de huevo*

<b>Insumos</b>	<b>Fracción A</b>	<b>Fracción B</b>
Tris	0,30 gr	0,30 gr
Ácido cítrico	0,140 gr	0,140 gr
Fructuosa	0,55 gr	0,55 gr
Yema de huevo	20%	20%
Antibiótico/ Penicilina	150 000 UI/100ml	150 000 UI/100ml
Agua destilada	10 ml	10 ml
Crioprotector	-----	Dimetilsulfóxido 14%

Fuente: Fórmula de Santiani et al. (2005).

Fórmula para ajustar la osmolaridad:

$$\frac{\text{Osmolaridad Observada} - \text{Osmolaridad Deseada}}{\text{Osmolaridad Observada}} \times \text{Volúmen de medio preparado}$$

Procedimiento: Medir la osmolaridad del medio recién preparado (Osmolaridad Observada), restar la Osmolaridad deseada el resultado dividirlo por la osmolaridad observada y multiplicar por el volumen, en ml, del medio preparado. El resultado obtenido es la cantidad de medio que se debe retirar del medio preparado y reemplazarlo por igual cantidad de agua ultra pura. Volver a medir la osmolaridad para comprobar la osmolaridad alcanzada (Ahumada et al., 1998).

La muestra seminal colectada fue fraccionada y diluida en las 3 diferentes osmolaridades 300, 600 y 1 000 mOsm; posteriormente fueron llevadas a temperaturas de 25°C, del mismo modo a 5°C y mantenidas por 6 horas, respectivamente.

### **Evaluación espermática post-dilución a 300, 600 y 1 000 mOsm a 5°C y 25°C**

Se evaluó los parámetros espermáticos después de haber culminado los tratamientos de osmolaridad y temperatura de preservación a las 6 horas.

#### **3.2.3 Análisis de Datos**

Se utilizó prueba de Shapiro-Wilk para determinar normalidad de los datos. Se evaluó el efecto de los tratamientos (efecto de la osmolaridad y la temperatura de preservación) sobre los parámetros seminales mediante el análisis de variancia (ANVA) bajo un diseño factorial de 3 x 2. Los datos que no mostraron normalidad se analizó mediante el análisis de rango de Kruskal Wallis. Para determinar las diferencias de medias entre tratamientos se utilizó la Prueba Tukey, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . Se usó el Software R (versión 4.1.6).

Todos los resultados se expresaron en promedio y desviación estándar.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

**Tabla 3.**

*Parámetros espermáticos a osmolaridad de 300, 600 y 1 000 mOsm en temperatura de preservación 5°C y 25 °C.*

mOsm	T°	Parámetros espermáticos de viabilidad				
		M.T % x̄ D.S	M.P.% x̄ D.S	HOST% x̄ D.S	VA% x̄ D.S	Viabilidad % x̄ D.S
300	5°C	24,3±4,39 <sup>a</sup>	12±4,07 <sup>a</sup>	32,4±4,60 <sup>a</sup>	27,9±1,65 <sup>a</sup>	40,55±7,56 <sup>a</sup>
	25°C	19,9±2,86 <sup>b</sup>	10,1±2,65 <sup>a</sup>	28,8±5,85 <sup>a</sup>	21,7±5,06 <sup>b</sup>	28,45±9,27 <sup>b</sup>
600	5°C	29,1±3,24 <sup>a</sup>	13,6±2,70 <sup>a</sup>	30,95±8,72 <sup>a</sup>	24,6±6,61 <sup>a</sup>	39,8±9,79 <sup>a</sup>
	25°C	20,2±2,89 <sup>b</sup>	9,85±2,11 <sup>a</sup>	27,75±7,34 <sup>a</sup>	22,3±4,85 <sup>a</sup>	27,1±8,15 <sup>b</sup>
1 000	5°C	24±3,39 <sup>a</sup>	13,2±2,42 <sup>a</sup>	27,05±7,24 <sup>a</sup>	22,6±3,17 <sup>a</sup>	34,55±7,46 <sup>a</sup>
	25°C	19,4±3,14 <sup>b</sup>	10,25±2,15 <sup>a</sup>	27,95±7,92 <sup>a</sup>	21,5±4,81 <sup>a</sup>	25,1±5,68 <sup>b</sup>

M.T.=motilidad total, M.P.=motilidad progresiva, HOST=test hipoosmótico, VA=viabilidad del acrosoma, x̄= promedio, D.S= desviación estándar. <sup>a,b,c</sup> Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas (p<0,05).

En la Tabla 3, se observa los resultados obtenidos de la interacción de la osmolaridad 300, 600 y 1 000 mOsm del dilutor y la temperatura de preservación a 5°C y 25°C; la media de los parámetros espermáticos de viabilidad como motilidad total, viabilidad de acrosoma y viabilidad de membrana espermática muestran diferencias estadísticas (p<0,05) y se observa una mayor diferencia al comparar 300 mOsm con temperatura de preservación de 5°C y 25°C. En cuanto a la media de motilidad progresiva

e integridad funcional de membrana no se observa diferencias estadísticas ( $p>0,05$ ) entre las diferentes osmolaridades y temperatura de preservación.

**Tabla 4.**

*Parámetros espermáticos en fresco y después de la dilución con osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm a 5°C de preservación.*

	M.T %	Parámetros espermáticos de viabilidad			Viabilidad %	
		M.P.%	HOST%	VA%	Viabilidad %	
		$\bar{x}$ D.S	$\bar{x}$ D.S	$\bar{x}$ D.S		
Fresco	45,92±5,53 <sup>a</sup>	22,38±4,03 <sup>a</sup>	41,81±11,67 <sup>a</sup>	32,1±5,05 <sup>a</sup>	51,37±9,78 <sup>a</sup>	
5°C	300	24,3±4,39 <sup>b</sup>	12±4,07 <sup>b</sup>	32,4±4,60 <sup>b</sup>	27,9±1,65 <sup>b</sup>	40,55±7,56 <sup>b</sup>
	600	29,1±3,24 <sup>b</sup>	13,6±2,70 <sup>b</sup>	30,95±8,72 <sup>b</sup>	24,65±6,61 <sup>bc</sup>	39,8±9,79 <sup>b</sup>
	1 000	24±3,39 <sup>b</sup>	13,2±2,42 <sup>b</sup>	27,05±7,24 <sup>b</sup>	22,6±3,17 <sup>d</sup>	34,55±7,46 <sup>b</sup>

M.T.=motilidad total, M.P.=motilidad progresiva, HOST=test hipoosmótico, VA=viabilidad del acrosoma,  $\bar{x}$ = promedio, D.S= desviación estándar. <sup>a,b,c</sup> Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas ( $p<0,05$ ).

En la Tabla 4, se observa los resultados obtenidos de los parámetros espermáticos en fresco y después de la dilución con osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm almacenados en temperatura de preservación de 5°C; la media de los parámetros espermáticos como motilidad total, motilidad progresiva, integridad funcional de membrana y viabilidad de membrana espermática no muestran diferencias estadísticas ( $p>0,05$ ) entre las diferentes osmolaridades a una temperatura de 5°C. En cuanto a la media de viabilidad del acrosoma se observa diferencia estadística ( $p<0,05$ ). Con

respecto a la media de los parámetros espermáticos en fresco y después de la dilución se observa diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 5.**

*Parámetros espermáticos en fresco y después de la dilución con osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm a 25°C de preservación.*

		Parámetros espermáticos de viabilidad				Viabilidad %
		M.T%	M.P.%	HOST%	V.A%	
		$\bar{x}$ D,S	$\bar{x}$ D,S	$\bar{x}$ D,S	$\bar{x}$ D,S	$\bar{x}$ D,S
Fresco		45,92±5,53 <sup>a</sup>	22,38±4,03 <sup>a</sup>	41,81±11,6 <sup>a</sup>	32,1±5,05 <sup>a</sup>	51,37±9,78 <sup>a</sup>
25°C	300	19,9±2,86 <sup>b</sup>	10,1±2,65 <sup>b</sup>	28,8±5,85 <sup>b</sup>	21,7±5,06 <sup>b</sup>	28,45±9,27 <sup>b</sup>
	600	20,2±2,89 <sup>b</sup>	9,85±2,11 <sup>b</sup>	27,75±7,34 <sup>b</sup>	22,3±4,85 <sup>b</sup>	27,1±8,15 <sup>b</sup>
	1 000	19,45±3,14 <sup>b</sup>	10,25±2,15 <sup>b</sup>	27,95±7,92 <sup>b</sup>	21,55±4,81 <sup>b</sup>	25,1±5,68 <sup>b</sup>

M.T.=motilidad total, M.P.=motilidad progresiva, HOST=test hipoosmótico, VA=viabilidad del acrosoma,  $\bar{x}$ = promedio, D.S= desviación estándar. <sup>a,b,c</sup> Superíndices diferentes dentro de columnas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

En la Tabla 5, se observa los resultados obtenidos de los parámetros espermáticos en fresco y después de la dilución con osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm almacenados en temperatura de preservación de 25°C; la media de los parámetros seminales como motilidad total, motilidad progresiva, integridad de membrana, viabilidad del acrosoma y viabilidad de membrana espermática no se observa diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) entre las diferentes osmolaridades. Con respecto a la media de los parámetros espermáticos en fresco y después de la dilución se observa diferencias estadísticas ( $p < 0,05$ ).

## **Contrastación de hipótesis**

Ho: Las diferentes osmolaridades del dilutor y temperaturas de preservación muestran efectos similares sobre los parámetros espermáticos en alpacas (*Vicugna pacos*).

Ha: Las diferentes osmolaridades del dilutor y temperaturas de preservación muestran efectos diferentes sobre los parámetros espermáticos en alpacas (*Vicugna pacos*).

## **Prueba estadística: Análisis de varianza**

**$P < 0,05 =$  rechazo Ho**

**$p > 0,05 =$  no se rechaza Ho**

Se realizó la prueba estadística resultando un  $p < 0,05$ :

Lo que indica que se rechaza la hipótesis nula Ho: “Las diferentes osmolaridades del dilutor y temperaturas de preservación muestran efectos similares sobre los parámetros espermáticos en alpacas (*Vicugna pacos*)”. Es decir que los parámetros espermáticos después de 6 horas de preservación muestran resultados diferentes al comparar las osmolaridades del dilutor y temperaturas de preservación.

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

#### **Parámetros espermáticos a osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm a 5°C de preservación**

Los parámetros espermáticos sometidos a las diferentes osmolaridades a 5°C presentan una disminución respecto a las muestras en fresco, como la motilidad, integridad funcional de membrana, integridad de acrosoma y viabilidad de membrana. Es preciso mencionar que la integridad de acrosoma muestra mayor variación entre las diferentes osmolaridades, con  $27,9\pm 1.65\%$  en 300mOsm y progresivamente va disminuyendo en soluciones hiperosmóticas de 600 y 1 000 mOsm. Esto podría deberse a lo investigado por Watson y Duncan (1988) que el estrés térmico produce una alteración en la ultraestructura de la membrana generando daño en la integridad del acrosoma y que a su vez dificulta el traslado de solutos en condiciones hiperosmóticas.

Resultados similares al presente estudio reporta Carretero et al. (2021), el cual evalúa los parámetros espermáticos de llama en soluciones hiperosmóticas >500 mOsm encontrando una disminución de la motilidad, integridad funcional de la membrana y viabilidad espermática en medios con mayor osmolaridad a medida que la temperatura disminuye, como en

nuestro estudio con una disminución viabilidad espermática de  $51,37 \pm 9,78$  % a  $40,55 \pm 7,56$ %. Esta disminución en los parámetros de viabilidad lo reporta Salamon y Maxwell, (2000) en ovinos, debido a la interacción de solutos como la glucosa y proteínas de origen animal con la membrana espermática, a una concentración adecuada estos azúcares que tienen un peso molecular bajo y son metabolizados por los espermatozoides provoca un efecto protector en la membrana espermática frente a cambios osmóticos durante la dilución, un desequilibrio de estos solutos en el medio reduciría este efecto.

Por otro lado, Van Thuan et al. (2005) reporta una integridad óptima de los espermatozoides con 800 mOsm a 4°C y capaces de lograr porcentajes de fecundación al ovocito, debido a la integridad del acrosoma y el ADN espermático que se encuentran viables, esto influye a la interacción de membrana espermática y la zona pelúcida del ovocito maduro (Imoedemhe y Adam, 2003); si bien los parámetros de motilidad son cercanos al 5 a 10%, esto no interfiere con la tasa de fertilización. Esto debido a que el medio de dilución donde se preservan presenta agentes inductores de la reacción acrosomal (calcio ionoforo, heparina y cafeína) que favorece la fertilización, aún con motilidad total disminuida un espermatozoide es viable por la integridad de la membrana acrosomal y espermática (Gil et al., 2003; Alonso et al., 2015). Esta integridad permite

la interacción de solutos que favorecen la liberación calcio y expresar proteínas que favorecen la unión de membrana espermática y el ovocito, debido a una integridad funcional de membrana que permite la osmosis de solutos en la célula (Watson, 2000)

Ball y Vo (2001); Bolsover et al. (2004) indican que la supervivencia a la osmolaridad por parte de la célula depende de los solutos en interacción y la temperatura en las cuales se conservan, la preservación del espermatozoide a 5°C disminuye el grado de peroxidación de membrana, aunque las condiciones sean anisomóticas, a comparación de temperaturas como 25°o 37°C donde la producción de especies reactivas de oxígeno aumenta. Esto se refleja en las diferentes osmolaridades evaluadas entre las dos temperaturas, los parámetros espermáticos de viabilidad a 5°C fueron superiores al de 25°C. Y existe un resultado superior con osmolaridad de 300 mOsm en parámetros como integridad de acrosoma y viabilidad espermática, esto debido posiblemente a la concentración de solutos más cercana a la fisiológica como 400 mOsm (Hafez y Hafez, 2002; Muiño, 2008).

## **Parámetros espermáticos a osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm a 25°C de preservación**

Los parámetros espermáticos de viabilidad como motilidad total, viabilidad de acrosoma y viabilidad de membrana fueron los más afectados al exponerlos a soluciones hiposmóticas e hiperosmóticas a temperatura de 25°C, con valores de  $19,9 \pm 2,86$ ,  $21,7 \pm 5,06$ ,  $28,45 \pm 9,27\%$  de viabilidad, esto debido al estrés osmótico que padece la célula con un gasto energético constante, a diferencia de temperatura de 5°C donde la célula reduce su actividad metabólica (Guthrie et al., 2002). Asimismo, lo reportan Burnaugh et al., (2010) en sementales y Van Thuan et al. (2005) en espermatozoides de ratón, una temperatura ambiente de 38°C a 27°C la motilidad se ve afectada a soluciones hiperosmóticas e hiposmóticas donde la célula sufre un mayor estrés osmótico lo que se relaciona con estrés térmico (Watson, 2000). Debido a que este ambiente promueve la generación de especies reactivas de oxígeno que causan la peroxidación lipídica de la membrana resultando fragilidad de membrana interna y externa del espermatozoide y subsecuente disminución en el desplazamiento espermático (McCarthy et al., 2010). Lo contrario a lo que ocurriría a una osmolaridad de 400 mOsm que permite un desplazamiento óptimo del espermatozoide a diferencia de una osmolaridad de 1 000mOsm.

Resultados diferentes reporta Gloria et al. (2021) en su estudio en conejos a una temperatura de preservación de 25°C, donde la motilidad progresiva de  $62,4 \pm 2,7\%$  disminuye a  $9,76 \pm 3,7\%$  en una osmolaridad de 500 mOsm, en nuestro estudio se observa una diferencia no estadística ( $p > 0,05$ ) entre las diferentes osmolaridades a 25°C. Esto podría atribuirse a la condición de las membranas espermáticas propias de cada especie y su respuesta al medio de interacción con soluciones hiperosmóticas (Ball y Vo, 2001). Así lo indica Kaabi et al. (2003) el espermatozoide de rumiantes presenta en la ultraestructura membrana espermática una mayor cantidad de colesterol a diferencia de otros mamíferos, el cual evitaría en menor grado el estrés osmótico que conduciría a una peroxidación de la membrana lipídica.

## CONCLUSIONES

1. Los parámetros espermáticos de viabilidad como motilidad total, integridad de acrosoma y viabilidad de membrana, muestran diferencias frente a osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm a temperatura de preservación de 5 y 25°C.
2. Los parámetros de integridad de acrosoma y viabilidad espermática presentan diferencias en la osmolaridad a temperatura de preservación de 5°C.
3. Los parámetros espermáticos resultan ser similares con las osmolaridades de 300, 600 y 1 000 mOsm a temperatura de preservación de 25°C.

## **RECOMENDACIONES**

1. Realizar estudios respecto a la capacidad fecundante del espermatozoide en condiciones anisomótica para ensayos de inyección intraplasmática (ICSI).
2. Realizar investigaciones referentes a la expresión de marcadores moleculares de estrés oxidativo y térmicas en la membrana espermática.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahumada, A., Jiménez, M., Mauri, A., Roblero, L., & Sepúlveda, M. (1998). *Manual de procedimientos Laboratorio de Reproducción Asistida*; Editorial Red Latinoamericana de Reproducción Asistida, agosto 1998.
- Albers, M.I., & Barrios, D.R. (2006). Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros post-mortem obtenidos mediante lavado retrógrado, *Zootecnia Trop.*, 24:267-280
- Alonso, A., Baca Castex, C., Ferrante, A., Pinto, M., Castaneira, C., Trasorras, V., Gambarotta, M.C., Losinno, L., & Miragaya, M. (2015). In vitro equine embryo production using air-dried spermatozoa, with different activation protocols and culture systems. *Andrologia* 47 (4), 387–394, <https://doi.org/10.1111/and.12273>.
- Amann, R., & Schanbacher, B. (1983). Physiology of male reproduction, *J, Animal Science*, 57, 380-403.
- Antonini, M., Gonzales, M., & Valvonesi, A. (2004). Relación entre la edad y el desarrollo folicular de la piel postnatal en tres tipos de camélidos domésticos de América del Sur, *Ciencia de la Producción Ganadera*; 90: 241 – 246.
- Ball, B., & Vo, A. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the

- Bolsover, R.S., Hyams, J.S., Shephard, E.A., White, H.A., & Wiedemann, C.G. (2004). From water to DNA: The Chemistry of Life, *Cell Biology*, (2<sup>a</sup> ed,) USA: John Wiley & Sons, Inc,
- Bravo, P.W. (2014). Anatomy and Physiology of Reproduction in the Male, In C, Cebra, D, Anderson, A, Tibary, R, Van Saun & L, Johnson, (Eds,) *Llama and Alpaca Care: medicine, surgery, reproduction, nutrition and herd health*, (1<sup>a</sup> ed,) 1 ,978-1-4377-2352-6, Copyright by Saunders, an imprint of Elsevier Inc, Cánada,
- Bravo, W., Skidmore, J., & Zhao, X. (2000). Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae, *Ani. Reprod. Sci.* 62, 173–193.
- Burnaugh, L., Ball, B.A., Sabeur, K., Thomas, A.D., Meyers, S.A., 2010. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Anim. Reprod. Sci.* 117,249–260. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.014>.
- Bustinza, V. (2001). *Mejoramiento genético en producción de rumiantes menores: Alpacas*, Pág, 113 – 126, Lima – Perú.
- effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J. Andrology* 22, 1061–1069.
- Carretero, M., Arraztoa, C., Fumuso, M., Chaves, M., Santa Cruz, R., & Neild, D. (2021). Dehydration of llama sperm using different osmolarity media and temperatures for preservation. *Animal*

- Reproduction Science*, 225, 106683,
- Chenoweth, P. (1997). Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull, In R, Youngquist & W, Threlfall (Eds.) *Current Therapy in large animal Theriogenology*, Saunders, (1<sup>a</sup> ed,) 217 p.
- Consuegra, C. (2017). *Vitrificación de espermatozoides de caballo empleando crioprotectores no penetrantes*. [Tesis de pregrado, Universidad de Córdoba] <http://hdl.handle.net/10396/21311>
- Cooper, T. G., & Yeung, C.H. (2006). Sperm maturation in the human epididymis, *The Sperm Cell: Production, Maturation, Fertilization, Regeneration*, Cambridge University Press, pp, 72–107, <https://doi.org/10.1017/CBO9780511545115.005>,
- Director, A., Giuliano, S., Carretero, M., Pinto, M., Trasorras, V., & Miragaya, M. (2007). *Journal of Camel Practice and Research*, 14 (2), 203- 206.
- Evans, G, & Maxwell, W. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras, España, Acribia, p, 128-132.
- Fahy, G., MacFarlane, D., Angell, C. & Meryman, H. (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation, *Cryobiology*, 21(4), 407-426
- Fahy, G., & Wowk, B. (2015). Principles of cryopreservation by vitrification, *Methods Mol Biology Humana*, 1257, 21-82.
- Galina, C. (2008). *Reproducción de Animales Domésticos*, (3<sup>a</sup> Ed.),

Editorial LIMUSA, México.

García, W., Alarcón, V., & Bravo, W. (2017). Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo, *Revista investigaciones veterinarias Perú*, 28 (2), <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13080>

Gastelu, T., & Zuñiga, M. (2019). *Evaluación de la capacidad meiótica de ovocitos de alpacas (Vicugna pacos) recuperados por sistema ovum pick up (OPU) y de ovarios obtenidos post mortem*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Huancavelica], <http://repositorio.unh.edu.pe/handle/UNH/3071>

Gil, J., Lundeheim, N., Soderquist, L., & Rodriuez-Martinez, H. (2003). Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*; 59:1241–1255,

Gloria, A., Henning, H., Di Francesco, L., & Contri, A. (2021). Osmotic tolerance of rabbit spermatozoa is affected by extender composition and temperature. *Animal Reproduction Science*, 229;106763

Guthrie, H.D., Liu, J., & Critser, J.K. (2002). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology Reproductive*, 67,1811–1816.

Hafez, B., & Hafez, E. (2002). Reproducción en animales domésticos. (6ª

ed.), Kiawah Island, South Carolina, USA, Editorial Interamericana, McGRAW-HILL.

Holt, W. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53, 47-58.

Huanca, W., & Cordero, A. (2007). Biotecnología reproductiva en camélidos sudamericanos: avances y perspectivas, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú, 15, 185–214.

Imoedemhe, D., Oliva, N., & Adam, A. (2003). Embryonic development following ICSI with human air dried sperm, In ESHRE Annual Meeting, Madrid, Spain, Session 42, Abstract 178.

Isachenko, E., Isachenko V., Katkov, I., Dessole, S, & Nawroth, F. (2003). Vitriification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success, *Reprod Biomed Online*, 6(2). 191-200.

Jeyendran, R., Van Der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., & Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the funcional integrity of the human sperm membrane and its relationships to other semen characteristics, *Journal of Reproduction & Fertility*, 70, 219-228.

Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, H., Rouissi, P., & Anel, L. (2003). Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem, *Theriogenology*, 60, 1249-

1259,

Kershaw-Young, C. M., & Maxwell, W.M.C. (2012). Seminal plasma components in Camelids and Comparisons with other species, *Reproduction Domestic Animals*, 47(4). 369-375.

Marin, J., Zapata, B., González, B., Bonacic, C., Wheeler, J., Casey, C., Bruford, M., Palma, E., Poulin, E., Alliende, A. & Spotorno, A. 2007. Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena Historia Natural* 80: 121–140.

Martins, C., Driessen, K., Melo, P., Costa, A., Carvalho-Neto, J., De Sousa, R., Rumpf, R., & Dode, M. (2009). Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time, *Anim, Reprod, Sci.*, 116, 50-57.

Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications, *Am J Physiol*, 247, 125-142.

Mazur, P. (2004). Principles of cryobiology, In B,J, Fuller, N, Lane y Benson, E. (Eds.), *Life in the Frozen State*, CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, pp, 3–65, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01507.x>.

McCarthy, M.J., Baumber, J., Kass, P.H., & Meyers, S.A. (2010). Osmotic stress induces oxidative cell damage to Rhesus macaque

spermatozoa. Biol. Reprod. 82, 644–651.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080507>.

Ministerio de agricultura y riego [MINAGRI]. (2019).

<https://www.midagri.gob.pe/portal/resoluciones-ministeriales/rm-2019>.

Morrell, J., & Abraham, M. (2020). Semen Handling in South American Camelids: State of the Art, *Frontiers in Veterinary Science*, 06, 20.

Morris, G. J., Faszler, K., Green, J.E., Draper, D., Grout, B., & Fonseca, F. (2007). Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation, *Theriogenology*, 68, 804–812,

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.009>.

Morris, G., Goodrich, M., Acton, E., & Fonseca, F. (2006). The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation, *Cryobiology*, 52(3). 323-334.

Morton, K., Bathgate, R., Evans, G., & Maxwell, W. (2007). Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-based, Tris-based and lactose-based diluents and pellets and straws, *Reproduction, Fertility and Development*, 19, 792-796, <https://doi.org/10.1071/RD07049>

Muiño, R. (2008). Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y Citometría de Flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas, Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal.

Oldenhof, H., Heutelbeck, A., Blasse, A. K., Bollwein, H., Martinsson, G., Wolkers, W.F., & Sieme, H. (2015). Tolerance of spermatozoa to hypotonic stress: role of membrane fluidity and correlation with cryosurvival. *Reproductive fertility development*, 27, 285–293, <https://doi.org/10.1071/RD13177>.

Petrunkina, A.M., Harrison, R.P., Hebel, M., Weitze, K., & Topfer-Petersen, E. (2001). Role of quinine-sensitive ion channels in volume regulation in boar and bull spermatozoa. *Reproduction* 122, 327–336, <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220327>.

Petrunkina, A.M., Harrison, R.A.P., Tsoлова, M., Jebe, E., & Topfer-Petersen, E. (2007). Signalling pathways involved in the control of sperm cell volume, *Reproduction* 133, 61–73, <https://doi.org/10.1530/rep.1.01137>.

Quispe, E., Rodríguez, T., Iñiguez, L., & Mueller, L. (2009). Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal genetic resources*, 45, 1-14.

- Rossato, M., Balercia, G., Lucarelli, G., Foresta, C., & Mantero, F. (2002). Role of seminal osmolarity in the reduction of human sperm motility, *Int Journal Andrology*, 25, 230–235.
- Ruiz, G. (2005). *Efecto de dos antioxidantes (Tempo y Tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a TRIS*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos], Repositorio académico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, <https://hdl.handle.net/20.500.12672/672>.
- Salamon, S., & Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen, *Animal Reproduction Science*, 62, 77-111.
- Santiani, A., Huanca, W., Sapana, R., Huanca, T., & 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, <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x>.
- Stornelli, M., Tittarelli, C., Savignone, C., & Stornelli, M. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria*, 25 (2). 28-35
- Sumar, J. (1991). Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo, In Fernandez-Baca S, (Ed,) *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sud Americanos*, Santiago, Chile,

FAO (pp 111-148).

Vallecillo, A. (2011). *Caracterización reproductiva de toros de la raza marismeña como base a su conservación*, [Tesis doctoral, Universidad de Córdoba], Repositorio académico de la Universidad de Córdoba.

Van Thuan, N., Wakayama, S., Kishigami, S., & Wakayama, T. (2005). New preservation method for mouse spermatozoa without freezing, *Biology Reproduction*, 72, 444–450.

Wakayama, T., & Yanagimachi, R. (1998). Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *National Biotechnology*, 16(7). 639-641 Wang, A., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D., & Loughlin, K. (1997). Reactive oxygen generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 49, 921-925.

Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Animal Reproduction Science*, 61, 481-492.

Watson, P., y Duncan, A. (1988). Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*, 25, 131-142.

## **ANEXOS**

Anexo 1. Parámetros espermáticos (%) a 300 mOsm y temperatura de 5°C.

T°	M.T	M-P.	host	VA	MA	VN	MN	viabilidad
5	23	11	31	30	18	20	18	36
5	21	10	38	30	18	20	18	45
5	22	8	26	26	21	31	34	29
5	29	19	31	28	32	21	27	41
5	31	14	39	26	20	30	28	52
5	19	9	32	28	17	24	21	44
5	23	11	31	30	18	20	18	36
5	21	10	38	30	18	20	18	45
5	22	8	26	26	21	31	34	29
5	29	19	31	28	32	21	27	41
5	31	14	39	26	20	30	28	52
5	19	9	32	28	17	24	21	44
5	23	11	31	30	18	20	18	36
5	21	10	38	30	18	20	18	45
5	22	8	26	26	21	31	34	29
5	29	19	31	28	32	21	27	41
5	31	14	39	26	20	30	28	52
5	19	9	32	28	17	24	21	44
5	22	8	26	26	21	31	34	29
5	29	19	31	28	32	21	27	41
PROM.	24,3	12	32,4	28	21,55	24,5	24,95	40,55
D.S.	4,39	4,06	4,6	1,7	5,539	4,762	6,108	7,556

Anexo 2. Parámetros espermáticos (%) a 600 mOsm y temperatura de 5°C.

T°	M.T	M-P.	host	VA	MA	VN	MN	viabilidad
5	28	18	27	18	20	34	40	19
5	30	15	32	18	20	38	36	52
5	33	12	32	29	21	31	19	43
5	24	11	17	20	25	12	38	42
5	32	16	40	36	19	28	23	42
5	28	11	42	27	21	32	19	39
5	28	18	27	18	20	34	40	19
5	30	15	32	18	20	38	36	52
5	33	12	32	29	21	31	19	43
5	24	11	17	20	25	12	38	42
5	32	16	40	36	19	28	23	42
5	28	11	42	27	21	32	19	39
5	28	18	27	18	20	34	40	19
5	30	15	32	18	20	38	36	52
5	33	12	32	29	21	31	19	43
5	24	11	17	20	25	12	38	42
5	32	16	40	36	19	28	23	42
5	28	11	42	27	21	32	19	39
5	33	12	32	29	21	31	19	43
5	24	11	17	20	25	12	38	42
Prom.	29,1	13,6	30,95	24,65	21,2	28,4	29,1	39,8
D.S.	3,24	2,702	8,720	6,61159	2,067	8,923	9,2957	9,7904

Anexo 3. Parámetros espermáticos (%) a 1 000 mOsm y temperatura de 5°C.

T°	M.T.	M-P.	host	VA	MA	VN	MN	viabilidad
5	19	17	24	21	18	30	32	39
5	28	11	34	21	18	30	32	35
5	23	14	15	19	30	32	21	34
5	28	10	34	22	31	18	27	51
5	24	15	26	26	21	31	34	29
5	21	13	31	28	22	21	27	34
5	19	17	24	21	18	30	32	39
5	28	11	34	21	18	30	32	35
5	23	14	15	19	30	32	21	34
5	28	10	34	22	31	18	27	51
5	24	15	26	26	21	31	34	29
5	21	13	31	28	22	21	27	34
5	19	17	24	21	18	30	32	39
5	28	11	34	21	18	30	32	35
5	23	14	15	19	30	32	21	34
5	28	10	34	22	31	18	27	51
5	24	15	26	26	21	31	34	29
5	21	13	31	28	22	21	27	34
5	23	14	15	19	30	32	21	34
5	28	10	34	22	31	18	27	51
Prom.	24	13,2	27,05	22,6	24,05	26,8	28,35	34,55
D.S.	3,3872	2,4192	7,243	3,168	5,595	5,772	4,614	7,458

Anexo 4. Parámetros seminales (%) a 300 mOsm y temperatura de 25°C.

T°	M.T	M-P.	host	VA	MA	VN	MN	viabilidad
25	17	10	32	15	10	40	25	41
25	20	11	28	22	39	18	30	56
25	21	9	25	19	25	37	26	21
25	21	12	26	25	30	21	19	21
25	24	16	31	30	18	20	18	36
25	18	9	38	30	18	20	18	35
25	20	12	26	15	24	18	28	18
25	22	6	31	19	32	27	23	35
25	22	10	27	21	18	30	32	25
25	17	8	32	21	18	30	32	21
25	23	10	32	20	18	22	32	22
25	20	8	17	18	20	38	41	27
25	19	11	24	18	20	38	41	21
25	21	10	34	25	30	21	19	26
25	12	9	15	30	18	20	18	29
25	24	16	31	30	18	20	18	32
25	18	9	38	15	24	18	28	21
25	20	12	26	19	32	27	23	30
25	22	6	31	21	18	30	32	19
25	17	8	32	21	18	30	32	33
Prom.	19,9	10,1	28,8	22	22,4	26,25	26,75	28,45
D.S.	2,864	2,6537	5,85	5,1	6,984	7,5105	7,3116	9,2706

Anexo 5. Parámetros espermáticos (%) a 600 mOsm y temperatura de 25°C.

T°	M.T	M-P.	host	VA	MA	VN	MN	viabilidad
25	24	13	40	27	18	37	20	35
25	19	10	16	18	42	15	32	50
25	18	10	21	22	23	32	19	20
25	22	9	29	20	18	22	32	17
25	22	10	27	18	20	38	41	19
25	17	8	32	18	20	38	41	30
25	23	10	32	25	30	21	19	22
25	20	8	17	30	18	20	18	32
25	19	11	24	30	18	20	18	21
25	21	10	34	15	24	18	28	30
25	12	9	15	19	32	27	23	19
25	24	16	31	21	18	30	32	33
25	18	9	38	21	18	30	32	25
25	20	12	26	20	18	22	32	21
25	22	6	31	18	20	38	41	22
25	22	10	27	18	20	38	41	21
25	17	8	32	25	30	21	19	26
25	23	10	32	30	18	20	18	29
25	20	8	17	30	18	20	18	32
25	21	10	34	21	18	30	32	38
Prom.	20,2	9,85	27,75	22,3	22,05	26,85	27,8	27,1
D.S.	2,8946	2,10950	7,34040	4,84605	6,5250	7,8758	8,8947	8,14926

Anexo 6. Parámetros espermáticos (%) a 1 000 mOsm y temperatura de 25°C.

T°	M.t.	M-P.	host	VA	MA	VN	MN	viabilidad
25	23	9	45	29	16	33	22	31
25	20	12	25	23	38	22	17	34
25	19	11	20	15	24	18	28	19
25	19	13	25	19	32	27	23	19
25	19	11	24	21	18	30	32	19
25	21	10	34	21	18	30	32	35
25	12	9	15	20	18	22	32	19
25	24	16	31	18	20	38	41	21
25	18	9	38	18	20	38	41	26
25	20	12	26	25	30	21	19	29
25	22	6	31	30	18	20	18	32
25	22	10	27	30	18	20	18	32
25	17	8	32	15	24	18	28	21
25	23	10	32	19	32	27	23	30
25	20	8	17	21	18	30	32	19
25	19	11	24	21	18	30	32	25
25	21	10	34	20	18	22	32	21
25	12	9	15	18	20	38	41	22
25	18	9	38	18	20	38	41	27
25	20	12	26	30	18	20	18	21
Prom.	19,45	10,25	27,95	21,55	21,9	27,1	28,5	25,1
D.S.	3,1367	2,149	7,923	4,806	6,172	7,166	8,444	5,683

Anexo 7. Estadístico para motilidad total comparando osmolaridad y temperatura.

---



---

Analysis of Variance Table

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
temperatura	1	1062.07	1062.07	76.2227	2.198e-14 ***
osmoralidad	1	2.81	2.81	0.2018	0.6541
temper:osmoral.	1	0.11	0.11	0.0081	0.9286
Residuals	116	1616.33	13.93		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

---

Anexo 8. Estadístico para motilidad total comparando osmolaridad y temperatura.

---



---

Analysis of variance

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
temperatura	1	246.53	246.533	32.31	9.916e-08 ***
osmolaridad	1	9.11	9.113	1.1946	0.2767
temperat:osmolar	1	5.51	5.513	0.7227	0.3970
Residuals	116	884.84	7.628		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

---

Anexo 9. Estadístico para integridad funcional de membrana comparando osmolaridad y temperatura.

---

Response: host  
Analysis of Variance Table

Response: host

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
temperatura	1	116.0	116.033	2.3458	0.12834
osmolaridad	1	192.2	192.200	3.8857	0.05108
temperat:osmolari	1	101.2	101.250	2.0469	0.15520
Residuals	116	5737.8	49.464		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

---

Anexo 10. Estadístico para viabilidad de acrosoma comparando osmolaridad y temperatura.

---

Analysis of Variance Table

Response: acrosoma

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
temperatura	1	307.20	307.200	14.5131	0.0002242 ***
osmolaridad	1	148.51	148.512	7.0162	0.0092027 **
temper:osmola	1	132.61	132.613	6.2651	0.0137062 *
Residuals	116	2455.37	21.167		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

---

Anexo 11. Estadístico para viabilidad espermática comparando osmolaridad y temperatura.

---

Analysis of Variance Table

Response: Viabilidad

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
temperatura	1	4625.2	4625.2	71.7225	8.842e-14 ***
osmolaridad	1	201.6	201.6	3.1264	0.04966 *
temperat:osmol	1	0.6	0.6	0.0095	0.92253
Residuals	116	7480.6	64.5		

---

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

---