

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**COMPARACIÓN DE 2 TIPOS DE DILUTORES (*TRIS - YEMA DE HUEVO Y  
LECHE DESCREMADA*) EN LA SOBREVIVENCIA ESPERMÁTICA POST –  
DESCONGELAMIENTO DE SEMEN DE ALPACA (*Vicugna pacos*)  
DE LA RAZA HUACAYA EN LA ZONA COSTA DE TACNA**

**TESIS**

**Presentada por:**

**Bach. Edith Annie Torres Hualla**

**Para optar el Título Profesional de:**

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**TACNA - PERÚ**

**2018**

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**


**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**TESIS**


**COMPARACIÓN DE 2 TIPOS DE DILUTORES (TRIS - YEMA DE HUEVO Y LECHE DESCREMADA) EN LA SOBREVIVENCIA ESPERMÁTICA POST - DESCONGELAMIENTO DE SEMEN DE ALPACA (*Vicugna pacos*) DE LA RAZA HUACAYA EN LA ZONA COSTA DE TACNA**

TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 30 DE NOVIEMBRE DEL 2018,  
SIENDO EL JURADO CALIFICADOR:

PRESIDENTE:

  
Dr. HUGO FLORES AYBAR

SECRETARIO:

  
Msc. LUIS ALBERTO BARRIOS MOQUILLAZA

VOCAL:

  
Msc. CESARIO SEBASTIÁN CRUZ ANCHAPURI

ASESOR:

  
Dr. DANIEL GANDARILLAS ESPEZÚA

## **DEDICATORIA**

Al él que me siempre ve, y está presente en todo momento.

A toda mi familia, por su apoyo y comprensión durante esta etapa de estudiante hasta ser una profesional.  
Los quiero mucho.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi alma mater la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por brindarme su calurosa estadía durante el transcurso 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.

A mi gran compañero que me impulsó en todo momento a seguir en este mundo fascinante de veterinaria, gracias.

A mis amigos y compañeros con quienes compartí buenos momentos durante mi vida de formación profesional.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
CONTENIDO .....	v
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	3
1.1 Descripción del Problema.....	3
1.2 Justificación.....	5
1.3 Objetivos .....	7
1.3.1 Objetivo General.....	7
1.3.2 Objetivos Específicos.....	8
1.4 Hipótesis.....	8
1.4.1 Hipótesis nula: $H_0$ .....	8
1.4.2 Hipótesis alternativa: $H_a$ .....	9

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	10
2.1 Antecedentes .....	10
2.1.1 Nacional.....	10
2.1.2 Internacional .....	12
2.2 Bases Teóricas.....	13
2.3 Marco Conceptual .....	31
CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODO .....	32
3.1 Material.....	32
3.1.1 Ubicación Geográfica y Temporal.....	32
3.1.2 Población y Muestra .....	32
3.1.3 Materiales .....	33
3.2 Método .....	35
3.2.1 Tipo y Diseño de Investigación .....	35
3.2.2 Diseño Procedimental.....	35
3.2.3 Análisis de Datos .....	41
CAPÍTULO IV: RESULTADOS .....	42
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	51
5.1 Motilidad total .....	51
5.2 Integridad funcional de membrana espermática.....	53
5.3 Viabilidad espermática .....	55
5.4 Contrastación de hipótesis .....	57

CONCLUSIONES .....	59
RECOMENDACIONES.....	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS.....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Número de muestras de semen para evaluación.....	33
Tabla 2.	Dilutor 1: Tris-yema de huevo .....	39
Tabla 3.	Dilutor 2: Leche descremada .....	39
Tabla 4.	Motilidad total (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos.....	42
Tabla 5.	Integridad funcional de la membrana (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos.....	45
Tabla 6.	Viabilidad (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Motilidad total (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos..... 44
- Figura 2. Integridad funcional de la membrana espermática (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos..... 47
- Figura 3. Viabilidad (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos..... 50

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Estadístico de grupo para motilidad total después de la descongelación en el dilutor tris y leche .....	68
Anexo 2.	Prueba t estadística de grupo .....	68
Anexo 3.	Prueba T Student para muestras independientes tris yema de huevo y leche descremada .....	68
Anexo 4.	Prueba T para motilidad en fresco y tris yema de huevo al descongelamiento .....	69
Anexo 5.	Correlaciones de muestras relacionadas .....	69
Anexo 6.	Prueba de muestras relacionadas para motilidad en fresco y al descongelamiento .....	69
Anexo 7.	Prueba T para motilidad en fresco y leche descremada al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas ....	69
Anexo 8.	Correlaciones de muestras relacionadas .....	69
Anexo 9.	Prueba T para muestras relacionadas: motilidad en fresco y al descongelamiento .....	70
Anexo 10.	Estadístico de grupo para test de host después de la descongelación en dos tratamientos: tris y leche descremada .....	70

Anexo 11. Prueba T estadística de grupo.....	71
Anexo 12. Prueba T Student para muestras independientes tris yema de huevo y leche descremada .....	71
Anexo 13. Prueba T para test de host en fresco y tris yema de huevo al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas.....	71
Anexo 14. Correlaciones de muestras relacionadas.....	71
Anexo 15. Prueba T para muestras relacionadas: host en fresco y al descongelamiento .....	72
Anexo 16. Prueba T para test de host en fresco y leche descremada al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas.....	72
Anexo 17. Correlaciones de muestras relacionadas.....	72
Anexo 18. Prueba T para muestras relacionadas: test de host en fresco y al descongelamiento.....	72
Anexo 19. Estadístico de grupo para viabilidad después de la descongelación en dos tratamientos: tris y leche descremada .....	73
Anexo 20. Prueba T: estadística de grupo .....	73
Anexo 21. Prueba t student para muestras independientes tris yema de huevo y leche descremada .....	73

Anexo 22. Prueba T para viabilidad en fresco y tris yema de huevo al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas.....	74
Anexo 23. Correlaciones de muestras relacionadas.....	74
Anexo 24. Prueba T para muestras relacionadas: viabilidad en fresco y al descongelamiento.....	74
Anexo 25. Prueba T para viabilidad en fresco y leche descremada al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas.....	74
Anexo 26. Correlaciones de muestras relacionadas.....	74
Anexo 27. Prueba T para muestras relacionadas: viabilidad en fresco y al descongelamiento.....	75

## RESUMEN

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNJBG-Tacna. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la sobrevivencia espermática post-descongelamiento de semen de alpaca de la raza huacaya, comparando dos tipos de dilutores (tratamiento I: tris yema de huevo) y (Tratamiento II: leche descremada). Se colectaron muestras de semen a 5 alpacas macho de los cuales se obtuvieron 25 eyaculados; las muestras en fresco fueron evaluadas en motilidad total, integridad funcional de la membrana y viabilidad; para posteriormente dividir las en dos fracciones, una fracción con T I y la otra fracción T II, luego se llevó a refrigeración a 5°C y por último cada muestra fraccionada fue congelada con Tris-yema de huevo 20% con glicerol al 10% y Leche descremada con etilenglicol al 14% en pajillas de 0,25ml. La evaluación espermática post-descongelamiento fue al día siguiente. Los resultados obtenidos en la evaluación en fresco en motilidad total fue de  $28,24 \pm 11,32\%$  y a la descongelación fue  $4,04 \pm 3,67$  y  $2,96 \pm 2,15\%$  en los tratamientos I y II respectivamente, en donde no se encuentran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos; a la evaluación

de la integridad funcional de la membrana espermática en fresco fue de  $40,96 \pm 12,41\%$  y a la descongelación fue  $12,04 \pm 3,78$  y  $11,32 \pm 2,39\%$  ( $p > 0,05$ ) y en viabilidad en fresco fue de  $46,08 \pm 14,78\%$  y al descongelamiento  $18,96 \pm 7,28\%$  y  $14,2 \pm 3,82\%$  ( $p < 0,05$ ). En conclusión, se encontró que las características espermáticas evaluadas post-descongelamiento fueron afectados por el proceso de la congelación y no habiéndose hallado diferencias significativas entre los dos tratamientos.

**Palabras Clave:** Congelación, Dilutor, Leche descremada, Semen, Tris.

## ABSTRACT

This research work was carried out in the Laboratory of Animal Reproduction of the School of Veterinary Medicine and Zootechnics of the UNJBG-Tacna. The objective of the present work was to evaluate the post-thawing sperm survival of alpaca semen of the huacaya breed, comparing two types of diluents (treatment I: tris yolk) and (Treatment II: skim milk). Semen samples were collected from 5 male alpacas from which 25 ejaculates were obtained; the fresh samples were evaluated in total motility, hyposmotic test and viability; to later divide them into two fractions, a fraction with TI and the other fraction T II, then it was refrigerated at 5 ° C and finally each fractionated sample was frozen with 20% tris-egg yolk-10% glycerol and skim milk -ethylene glycol 14% in 0,25ml straws. The post-thawing sperm evaluation was the next day. The results obtained in the fresh evaluation in total motility:  $28,24 \pm 11,32\%$  and the thawing was  $4,04 \pm 3,67$  and  $2,96 \pm 2,15\%$  in treatments I and II respectively, where no significant differences were found ( $p > 0,05$ ) between treatments; to the evaluation of the Host Test in fresh was of  $40,96 \pm 12,41\%$  and to the thawing was  $12,04 \pm 3,78$  and  $11,32 \pm 2,39\%$  ( $p > 0,05$ ) and in viability in fresh was  $46,08 \pm 14,78\%$  and at thawing  $18,96$

$\pm 7,28\%$  and  $14,2 \pm 3,82\%$  ( $p < 0,05$ ). In conclusion it was found that the sperm characteristics evaluated post- defrosting were affected by the freezing process and no significant differences were found between the two treatments.

Keywords: dilutor, freezing, tris, skim milk, semen.

## INTRODUCCIÓN

La criopreservación de gametos es una técnica reproductiva que se difunde y se desarrolla ampliamente en todo el mundo, en donde el material genético se difunde a través del tiempo y espacio mediante su uso en las técnicas de biotecnología reproductiva. La congelación de semen es muy poco empleada en camélidos sudamericanos (CSA). En donde las dificultades en la colección de semen y en el manejo de las muestras seminales, debido a su alta viscosidad, y el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados para el semen de CSA se constituyen en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación con resultados óptimos de calidad espermática post-descongelamiento (Sumar, J., y Leyva, V., 1981; Bravo et al., 1997).

En la actualidad existe una gran variedad de dilutores para diversas especies domésticas; aún no se reporta un dilutor adecuado para conservación de espermatozoides. Dilutores a base de sustancias de origen animal como la yema de huevo y leche descremada, tienen en su composición lipoproteínas de mayor y fácil adherencia a la

membrana espermática los cuales protegen al espermatozoide durante la criopreservación (Moussa et al., 2002).

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los parámetros espermáticos de sobrevivencia post-descongelamiento comparando dos tipos de dilutores (Tris-yema de huevo y Leche descremada) en semen de alpaca; contribuyendo así a determinar un dilutor apropiado que permita mejores resultados a la descongelación, ya que de este modo se podría aplicar las técnicas reproductivas asistidas en el campo de esta especie, como es el caso de la inseminación artificial como técnica para acelerar la difusión del material genético en poblaciones aún mayores de nuestra región.

# **CAPÍTULO I**

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1 Descripción del Problema**

Los camélidos sudamericanos son especies domésticas que viven y se desarrollan en climas adversos, en donde un 60% de la población de alpacas presentan problemas reproductivos en su hábitat normal, es por ello que en biotecnología reproductiva se vienen desarrollando nuevas técnicas para mejorar la eficiencia reproductiva de estas especies (Huanca W. et al., 2007).

El porcentaje de fertilidad en la alpaca fluctúa en un 70%, en donde un 50 % se ve involucrado por la calidad del semen; es por ello que su colecta y evaluación macroscópica y microscópica del semen, marca un precedente de la calidad seminal. Para el desarrollo de técnicas reproductivas, como la Inseminación artificial se debe conservar el semen por un período prolongado; esto mediante un protocolo de criopreservación a seguir con el empleo adecuado del dilutor, el cual tiene como objetivo alimentar, conservar y proteger a los espermatozoides por un mayor tiempo (Pérez G., 1998).

La criopreservación de semen es una técnica que se viene desarrollando con éxito en otras especies, pero en camélidos sudamericanos aún no se estableció un adecuado protocolo de congelamiento, el cual muchas veces es determinante el tipo de dilutor (Miragaya et al., 2012). El daño producido en el espermatozoide por la congelación y posterior a este proceso, tiene lugar a distintos niveles estructurales y/o funcionales, en donde influye mucho el porcentaje de alteraciones de los espermatozoides y la viscosidad del semen, que vienen siendo uno de los grandes obstáculos en la criopreservación; por lo que todavía no hay un método de criopreservación universal aceptado que logre mejores tasas de sobrevivencia y porcentajes de preñez mayores al 50% obtenidos con semen fresco ( Huanca W. et al., 2007).

El presente estudio pretendió evaluar dos tipos de dilutores que cumplan con la criopreservación del semen y así determinar el porcentaje de sobrevivencia de los espermatozoides después del descongelado. Siendo uno de los primeros estudios en la zona costa de Tacna, donde los animales se aclimataron a la zona por un período de 45 días; una gran diferencia con reportes de otros estudios referidos al mismo tema realizados en la zona sierra, el cual se evaluó en qué medida esto afectó al rendimiento reproductivo de esta especie. En países de Europa y Norteamérica ya están criando y produciendo camélidos sudamericanos,

demostrando que estos animales producen tanto igual como mejor que en su país de origen (Sumar, J., 2007).

## **1.2 Justificación**

El trabajo pretende fomentar el estudio de las características reproductivas del semen de alpaca e identificar factores que intervienen en la eficiencia reproductiva de esta especie; por lo cual esta investigación se enfocó en la evaluación de la calidad del semen de machos reproductores.

La inseminación artificial (IA) con semen congelado es una de las más importantes tecnologías reproductivas en la producción de animales domésticos y combinada con una prueba de progenie, ha contribuido sustancialmente en el mejoramiento genético de diversas especies domésticas haciendo disponer de progenie de alta calidad genética. En camélidos, si bien existen reportes sobre el desarrollo de la IA no puede ser considerada una alternativa tecnológica; ya que no se han superado las limitantes existentes, como el desarrollo de protocolos de criopreservación (Huanca W., Adams G., 2007).

El estudio tuvo como objetivo evaluar el adecuado dilutor para el protocolo de criopreservación de semen de alpaca, de manera que permita mantener la viabilidad espermática post-descongelamiento; y preservar

los espermatozoides por un tiempo prolongado. Y así de esta manera desarrollar las ventajas de la inseminación artificial, al incrementar e impedir la pérdida de reproductores de alto valor genético y comercial.

Desde el punto de vista metodológico, se desarrolló las técnicas convencionales en lo que se refiere a la colecta de semen (con vagina artificial, siendo una de las técnicas de fácil manejo) y evaluación de parámetros seminal; además se estableció cambios en el protocolo de criopreservación en lo que se refiere al manejo de la temperatura de modo manual mediante un control de tiempos con la aplicación de termómetros.

Además el estudio brindó nuevos conocimientos con respecto a la respuesta de los espermatozoides sometidos a dos tipos de dilutores llevados a la congelación; y en qué medida los factores del clima y alimentación interfieren en el rendimiento reproductivo del animal, el cual implica un porcentaje a la sobrevivencia espermática; ya que en comparación con otros estudios realizados en la sierra o trabajaron con muestras extraídas de la misma zona; este trabajo se realizó con muestras obtenidas en la costa de Tacna.

Siendo el dilutor y el protocolo de criopreservación dos factores fundamentales en el desarrollo de esta investigación, como también lo fue la crianza y el manejo de los animales que se llevó a cabo a una altitud de

550 msnm; siendo estos llevados a un proceso de adaptación de hábitat de 45 días, en donde se brindó un ambiente adecuado en el cual se los alimentó; con forrajes como la avena, cebada y alfalfa, los cuales permitieron que estos animales respondan a los tratamientos.

Esta investigación impulsa a que investigadores e instituciones públicas y privadas puedan magnificar el desarrollo y la aplicación de las técnicas de biotecnología reproductiva en camélidos sudamericanos, es por ello que este proyecto pretende impulsar a largo plazo la difusión de mejores sementales a productores alpaqueros y mediante la aplicación de estas biotecnologías lograr la difusión del material genético en poblaciones aún mayores, con lo cual se podrán disminuir los costos de producción en las comunidades alto andinas alpaqueras de la región de Tacna.

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Evaluar los parámetros espermáticos de sobrevivencia post-descongelamiento comparando dos tipos de dilutores (Tris-yema de huevo y Leche descremada) en alpaca (*Vicugna pacos*) de la raza Huacaya en la zona costa de Tacna.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar la motilidad espermática post-descongelamiento comparando dos tipos de dilutores (Tris-yema de huevo y Leche descremada) en alpaca (Vicugna pacos) de la raza Huacaya en la zona costa de Tacna.
- Determinar la integridad funcional de la membrana de los espermatozoides post-descongelamiento comparando dos tipos de dilutores (Tris-yema de huevo y Leche descremada) en alpaca (Vicugna pacos) de la raza Huacaya en la zona costa de Tacna.
- Determinar la viabilidad espermática post-descongelamiento comparando dos tipos dilutores (Tris-yema de huevo y Leche descremada) en alpaca (Vicugna pacos) de la raza Huacaya en la zona costa de Tacna.

### **1.4 Hipótesis**

#### **1.4.1 Hipótesis nula: Ho**

Los parámetros espermáticos de sobrevivencia a la descongelación resultan ser similares con el dilutor Tris yema de huevo en comparación con el dilutor Leche descremada en semen de alpaca de la raza Huacaya en la zona costa de Tacna.

#### **1.4.2 Hipótesis alternativa: Ha**

Los parámetros espermáticos de sobrevivencia a la descongelación resultan ser mejores con el dilutor Tris yema de huevo en comparación con el dilutor Leche descremada en semen de alpaca de la raza Huacaya en la zona costa de Tacna.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Antecedentes**

##### **2.1.1 Nacional**

En un estudio en Lima en temporada de verano a una altitud de 101 msnm, se determinó el efecto de dilutores a base de Tris, Tes y Leche descremada para la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. En la cual llevaron a cabo la siguiente metodología de trabajo, las muestras recuperadas a las 0 horas del sacrificio, fueron diluidas con Tris, Tes y Leche descremada, enfriadas desde 35° a 5°C en 90 minutos, envasadas y congeladas en nitrógeno líquido. Se evaluó la motilidad, integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal a la descongelación. Y los resultados que obtuvieron fueron: En cuanto a la motilidad fue de 14,0 %, 8,6 % y 17,0 % en los grupos Tris, Tes y Leche descremada, respectivamente, donde el grupo Leche descremada fue significativamente mejor que el grupo Tes ( $p < 0,05$ ). Los porcentajes de integridad funcional de membrana (24,30 %, 19,10% y 17,90 %) y vitalidad/integridad acrosomal (32,60 %, 26,30 % y 27,20 %)

fueron similares entre los tres grupos. En donde concluye que los tres dilutores brindan efectos similares para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca (Banda et al., 2010).

En otro estudio realizado en INIA-Puno en temporada de lluvia a una altitud de 4 025 msnm, se evaluó el efecto de dos crioprotectores y dilutores en la calidad de semen de alpaca al descongelamiento; las muestras de semen se obtuvieron de cuatro alpacas adultas mediante vagina artificial; se congelaron usando el dilutor I (Tris, citrato, yema de huevo y glucosa) y otro dilutor II (leche desnatada, yema de huevo y fructosa), cada uno con glicerol (G) y otro etilenglicol (EG). En consecuencia, se formaron cuatro grupos: 1) dilutor I-G; 2) dilutor I-EG; 3) dilutor II-G, y 4) dilutor II-EG. El Semen se diluyó en dos partes: para el enfriamiento a 5 ° C (dilutores sin criopreservante (CPA)), y para la congelación (dilutores con CPA). La viabilidad e integridad del acrosoma se evaluaron utilizando la tinción Giemsa de tripán azul. En donde en comparación los dos criopreservantes obtuvieron una motilidad después de la descongelación en los grupos II-EG ( $20,00 \pm 6,70$  %) y II-G ( $15,30 \pm 4,1$ %) mejor que el grupo IG ( $4,0 \pm 1,1$  %) y I-EG ( $1,0 \pm 1,4$ %). Espermatozoides viables con acrosomas intacta en los grupos II-EG ( $18,70 \pm 2,90$  %) y II-G ( $12,7\% \pm 5,9\%$ ) fueron mayores que en los grupos I-G ( $5,7 \pm 1,5$  %) y I-EG ( $4,0 \pm 1,0$ %). En conclusión el dilutor con Leche

descremada que contiene etilenglicol para congelar semen de alpaca parece promover la supervivencia de las células de espermatozoides con más acrosomas intactos que otros dilutores (Santiani et al., 2005).

En un estudio en Lima en temporada verano, se evaluó la concentración de crioprotectores en dilutores sobre la supervivencia espermática post-descongelamiento; en donde evaluaron espermatozoides colectados del epidídimo de 10 animales y diluidos con dilutor Leche descremada, un período de enfriamiento de 150 minutos hasta 5 °C. Cada muestra fue dividida en 8 porciones a diferentes niveles de concentración de glicerol, para su posterior congelación a vapores de nitrógeno por 20 minutos. Obteniendo los resultados en motilidad al descongelamiento: 24,90 % para una motilidad inicial en fresco mayor al 60 % y 7,40 % de motilidad al descongelamiento para una motilidad inicial menor al 60%, para test hiposmótico:  $12 \pm 15,19$  % y viabilidad e integridad acrosomal:  $12,00 \pm 8,76$ %. Al evaluar la concentración de glicerol existe mejores resultados a concentraciones de 10 % de crioprotector (Choez et al., 2013).

### **2.1.2 Internacional**

En un estudio en Argentina en temporada de lluvia a una altitud de 3 484 msnm; se evaluó la influencia de la criopreservación sobre la motilidad,

viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama. En donde se evaluó espermatozoides colectados mediante vagina artificial obteniendo los siguientes resultados en motilidad al descongelamiento  $20,4 \pm 7,5$  % y viabilidad  $32,4 \pm 10,5$  % con el dilutor yema de huevo citrato-glicerol y dimetilsulfóxido como crioprotectores. Reportando mejores resultados con la utilización de este dilutor (Aller et al., 2001).

Ha reportado también la congelación de espermatozoides del epidídimo usando tres diferentes dilutores. La motilidad del esperma descongelado es mejor utilizando Lactosa-yema de huevo que Tris y citrato-glucosa (18,20, 11,30 y 6,90 %, respectivamente). Además, la integridad acrosómica fue de 83,4% cuando el esperma se congeló en Tris, 80 % con lactosa- yema de huevo y 79 % para el dilutor de citrato-glucosa. Reportando mejores resultados en los parámetros espermáticos con Lactosa yema de huevo (Morton et al., 2007).

## **2.2 Bases Teóricas**

La criopreservación de semen es una importante biotecnología reproductiva que busca promover la conservación del germoplasma masculino por tiempo indeterminado. Esta biotecnología, cuando se asocia a la inseminación artificial, representa un mecanismo eficiente para la promoción y difusión de material genético de excelente calidad. La

criopreservación de semen proporciona una economía para el productor, al reducir los costos de alimentación y transporte de los reproductores, así como los riesgos de enfermedades sexuales.

La congelación de semen es una biotecnología reproductiva muy poco empleada en camélidos sudamericanos. Las dificultades en la colección de semen y en el manejo de las muestras seminales, debido a su alta viscosidad, y el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados para el semen de camélidos se constituyen en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación con resultados óptimos de calidad espermática post-descongelamiento.

Esto determina que la inseminación artificial quede restringida al uso de semen fresco. Asimismo, se tiene que considerar la baja concentración de espermatozoides y el alto porcentaje de anormales que, como características usuales del semen de alpaca, incrementan la dificultad de obtener parámetros espermáticos post-descongelamiento adecuados que permitan la fecundación (Bravo et al.,1997).

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

Los dos testículos se mantienen en un escroto no pendular situado por debajo del ano. El escroto, que es de naturaleza similar a la protuberancia sub-anal encontrada en cerdos, roedores y carnívoros (Bravo et al., 1997),

mantiene los testículos (y los espermatozoides contenidos) 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 espermatozoide de alpaca presenta una longitud total de 47,29 micras, mientras que el largo y el ancho promedio de la cabeza mide 6,12 y 3,68 micras respectivamente (Mancisidor, I., 2013)

### **Espermatogénesis**

La espermatogénesis en los camélidos ha sido dividida en ocho estadios con el desarrollo inicial de la espermatogonia en las regiones externas del túbulo seminífero progresando a espermatozocito primario y secundario, espermátidas y espermatozoides. Las células de Leydig se encuentran entre los túbulos seminíferos y secretan la testosterona en las venas testiculares y vasos linfáticos (Delhon y Lawzewitsch, 1987; citado por Mancisidor, I., 2013).

Estudios histológicos testiculares han mostrado que los túbulos seminíferos en las alpacas tienen un diámetro de 174 – 237 $\mu$ m (Bravo et al., 2000) 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 (Mancisidor, I., 2013). Sin embargo, aún no se conoce en detalle el proceso de espermatogénesis.

### **Alimentación de camélidos sudamericanos**

Los camélidos sudamericanos están anatómicamente y fisiológicamente adaptados para utilizar eficientemente el recurso alimenticio en las praderas alto andinas en comparación con otros rumiantes domésticos.

Las alpacas tienen un requerimiento de energía para el mantenimiento del peso corporal entre 61,2 - 72 Kcal EM/kg PV. , un requerimiento en proteína de 2,38 g/kg de PV., nivel que está muy por debajo al requerimiento de ovinos y vacunos de carne (2,79 g/kg de PV), lo que se explicaría la capacidad de los CSA a reciclar la úrea corporal para la síntesis de proteína microbiana.

Lo que se recomienda para mantener sus requerimientos es un consumo de heno (alfalfa) 1,2 kg/ día de M.S. y un consumo de concentrado de 0,9 % P.V. (Yaranga, R., 2009). Durante el período de adaptación, para evitar posibles problemas de acidosis, el concentrado debe ser suministrado dos veces al día previo a distribuirles el heno de alfalfa. Durante el período de aislamiento deben suministrarle antiparasitarios,

recibir golpes multivitamínicos intramusculares y orales con vitamina E y Selenio (Yaranga, R., 2009).

### **Características del semen de alpaca**

El eyaculado de los camélidos se caracteriza por un bajo volumen y alta viscosidad, bajo número de espermatozoides y los parámetros son muy variables entre los individuos, y entre eyaculados recogidos en el mismo macho. Potencialmente, esto puede dar lugar a problema en la obtención de los eyaculados de calidad aceptable para la conservación de espermatozoides (Bravo et al., 2000).

El volumen de cada eyaculado en alpacas es en promedio 1-2 ml y oscila entre menos de 1ml hasta aproximadamente 7ml. El semen se describe generalmente como lechoso o cremoso de color blanco en función a la concentración de espermatozoides (Garnica et al., 1993).

### **Colecta de semen**

La colección de semen en camélidos sudamericanos tiene grandes inconvenientes, tales como la duración de la cópula, la posición de copula, el lugar de depósito del semen y el tipo de eyaculación, así como el aspecto del eyaculado, su extrema viscosidad y lo dificultoso de su manejo hizo que se investigue una técnica óptima para poder extraer

semen y poder manejarlo sin que éstos pierdan su capacidad fecundante.

Uno de los métodos más usados para la colección de semen es:

**Vagina artificial.**- Esta técnica fue desarrollada con la utilización 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 cérvix de la alpaca y al final un frasco de colección de semen de ovino o un tubo de centrífuga, el agua a 45°C se coloca por una válvula-espita; los machos aceptaron el maniquí después de un período de entrenamiento (Bravo et al., 1997).

### **Evaluación de la calidad seminal**

Características físicas- macroscópicas:

Las características macroscópicas del semen de camélidos sudamericanos, entre las cuales se consideran volumen, color, aspecto, filancia y pH. Estas características del eyaculado dependerán del tipo de colección y de la manipulación, así como de las características fisiológicas de cada animal (Pérez, G., 1998).

Características microscópicas:

Las características microscópicas más importantes que se evalúan en el semen son motilidad, concentración, funcional de la membrana plasmática (prueba hipoosmótica), viabilidad espermática (coloración con eosina/nigrosina) (Pérez, G., 1998).

**Parámetros espermáticos:**

**Motilidad total**

La motilidad es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal. Existen varias técnicas de estudio de motilidad, pero la más utilizada y a la vez la más simple es la valoración visual subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento. Para la realización de esta valoración debe estar en condiciones de normocinesis (temperatura 37° C). Los espermatozoides pueden presentar 2 tipos de movimientos: Movimiento de rotación (alrededor de su eje) Movimiento progresivo (desplazamiento de la célula), el cual a su vez puede ser lineal o circular. Dentro de la motilidad total un caso especial hace referencia a la denominada “motilidad masal” que es únicamente evaluable en eyaculaciones de mamíferos con concentraciones espermáticas elevadas como es el caso de rumiantes. Primero se estima, el porcentaje de espermatozoides que muestran algún

tipo de movimiento o “motilidad total”, segundo, el porcentaje de espermatozoides motiles que presentan un movimiento progresivo o “motilidad progresiva” (Salamon et al.,1995).

### **Integridad de la membrana espermática**

La integridad de la membrana espermática ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su papel clave en la función espermática. De hecho, el estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula. La evaluación morfológica se realiza usando tinciones supravitales como el eosina/negrosina, la eosina/azul de anilina, el azul tripan/giemsas o el amarillo de naftol/eritrocina.

Tinción eosina-nigrosina: La proporción de espermatozoides vivos pueden ser determinados por el uso de técnicas de tinción en el cual la membrana de células dañadas o muertas pueden tomar algunos colorantes. El componente nigrosina proporciona un fondo de contraste a las células espermáticas. La eosina tiene la capacidad de penetrar o no los espermatozoides, lo cual es un indicador de la integridad de la membrana celular y en consecuencia, de la viabilidad o vitalidad celular (Holt, W., 2000).

## **Funcionalidad de la membrana espermática**

Se fundamenta en estudiar la funcionalidad de la membrana plasmática cuando está situada en el medio hipoosmolar. Cuando la membrana está funcionalmente activa no permite la salida de sustancias osmóticamente activas y compensa el desequilibrio osmótico captando agua, por lo que la membrana del espermatozoide se hincha y el flagelo se riza (Holt, W., 2000).

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, 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. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Se considera pues que un espermatozoide con la membrana hinchada es un espermatozoide funcionalmente activo y por tanto vivo; sin embargo, si la membrana no está funcionalmente activa permitirá la salida de sustancias osmóticamente activas y no se hinchará, en este caso un espermatozoide

se considera no funcional. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo (Suarez, P., 2005).

### **Dilución del semen**

En la etapa de maduración y supervivencia espermática durante su tránsito por el epidídimo es dependiente, principalmente de andrógenos; paralelo a los andrógenos, existen otro gran número de sustancias producidas por el epitelio epididimario, que tienen como objeto crear un ambiente luminal específico. Durante su tránsito a través del epidídimo, se remodelan proteínas de la membrana; proceso que es crítico, ya que de él, depende que el espermatozoide adquiera su motilidad y se mantenga viable (Martins et al., 2007).

En un proceso de conservación de semen *invitro*, se recomienda el uso de dilutores para asegurar la viabilidad espermática ya que un dilutor debe satisfacer las siguientes condiciones:

- Debe ser isotónico como el plasma seminal del macho.
- Debe proveer nutrientes como una fuente de energía para los espermatozoides.

- Debe ser un buffer para neutralizar los productos finales de desecho, resultantes del metabolismo de los espermatozoides.
- Proteger contra los efectos dañinos del enfriamiento rápido.
- Inhibir el crecimiento bacteriano.
- Proteger al espermatozoide contra daños durante el congelamiento.

### **Dilutores en la congelación de espermatozoides**

Existen muchos dilutores de semen que han sido usados en llamas y alpacas; sin embargo, solamente algunos han tenido éxito. Los dilutores basados en Tris parecen ser los mejores. Tris con 20% de yema de gallina mantuvo 73% de espermatozoides móviles en la alpaca a las 2 horas de incubación a 37 °C. Uno de las mejoras en el uso de dilutores ha sido el reemplazo de yema de huevo de gallina por yema de huevo de codorniz. La ventaja es que los glóbulos de grasa son más pequeños, además que la mezcla con el semen es más rápida que con yema de huevo de gallina (Bravo et al., 2013).

Los diluyentes contienen Tris (Hidroximetil Aminometano) o citrato como buffers, y glucosa o fructuosa como fuente de energía. Además, deben contener agentes protectores para las membranas celulares durante el enfriamiento a 5 °C (generalmente yema de huevo), y el congelamiento

(generalmente glicerol o etilenglicol) a su vez también le adicionan antibióticos para evitar la formación bacteriana.

### **Dilutor en base a Tris-Yema de huevo**

Descrito para congelación de espermatozoides ovinos (Aisen et al., 2002 citado por Bravo et al., 2013). En la cual presenta los siguientes componentes:

Tris: El intervalo útil de tamponamiento del Tris coincide con el pH fisiológico de la mayoría de los seres vivos. Sumado a su bajo costo, esto hace del Tris uno de los tampones más comunes en laboratorios de biología y bioquímica. También es conocido como trometamina usado en la estandarización de soluciones titulantes (Cunningham., 2000).

Ácido cítrico: El ácido cítrico es un ácido orgánico tricarbóxico que está presente en la mayoría de las frutas, sobre todo en cítricos como el limón y la naranja. Es un buen conservante y antioxidante natural que se añade industrialmente como aditivo en el envasado de muchas conservas (Cunningham., 2000).

Fructuosa: Monosacárido cetósico levógiro, blanco amarillento, cristalino, hidrosoluble, más dulce que la sacarosa y de forma combinada en muchos disacáridos y polisacáridos. En el área de la reproducción se

encuentra presente en las vesículas seminales como fuente de energía para los espermatozoides (Cunningham., 2000).

Yema de huevo: Se presenta en forma de ácidos grasos, las lipoproteínas de baja densidad, los fosfolípidos y el colesterol son los factores en la yema de huevo que proporcionan protección a los espermatozoides durante el almacenamiento en frío; que le permite una mayor permeabilidad a la membrana el cual lo protege, ya que los lípidos como componentes más abundantes de la membrana plasmática, determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación (Cunningham., 2000).

Glicerol: Agente crioprotector de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular. El propano-1,2-3-triol, glicerol o glicerina (del griego glykos, dulce) es un alcohol con tres grupos hidroxilos (–OH). Se trata de uno de los principales productos de la degradación digestiva de los lípidos, paso previo para el ciclo de Krebs y también aparece como un producto intermedio de la fermentación alcohólica (Cunningham., 2000).

La fracción A del diluyente no lleva incluido el crioprotector y se completa con agua bidestilada. La fracción B lleva incluido el crioprotector y completado con la fracción A.

### **Dilutor en base a leche descremada**

Descrito para congelación de espermatozoides de alpaca (Santiani et al., 2005).

Leche descremada: Los constituyentes de la leche con mayor efecto protector aparentan ser las micelas de caseína. La fracción proteica de la leche descremada, constituida por caseína, fosfocaseinato y glicopéptidos de caseína y los carbohidratos presentes, tienen un efecto fisiológico de buffer y de protección celular contra el daño oxidativo durante la conservación (Banda, R., 2010).

Fructuosa: Monosacárido cetósico levógiro, blanco amarillento, cristalino, hidrosoluble, más dulce que la sacarosa y de forma combinada en muchos disacáridos y polisacáridos. En el área de la reproducción se encuentra presente en las vesículas seminales como fuente de energía para los espermatozoides (Cunningham., 2000).

Yema de huevo: Se presenta en forma de ácidos grasos, las lipoproteínas de baja densidad, los fosfolípidos y el colesterol son los factores en la yema de huevo que proporcionan protección a los espermatozoides durante el almacenamiento en frío que le permite una mayor permeabilidad a la membrana el cual lo protege, ya que los lípidos como componentes más abundantes de la membrana plasmática,

determinan la fluidez y resistencia de la membrana durante los procesos de criopreservación (Cunningham., 2000).

Etilenglicol: Agente crioprotector, es un compuesto químico que pertenece al grupo de los dioles. Etilenglicol es un líquido transparente, incoloro, ligeramente espeso como el almíbar y leve sabor dulce (Cunningham., 2000).

La fracción A del diluyente no lleva incluido el crioprotector y se completa con agua bidestilada. La fracción B lleva incluido el crioprotector y completado con la fracción A.

### **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 a  $-79^{\circ}\text{C}$  (hielo seco) o a  $-196^{\circ}\text{C}$  (nitrógeno líquido), retiene su potencial de fertilización indefinidamente. La congelación es un proceso de stress para los espermatozoides, debido a los cambios de temperatura que sufre el espermatozoide durante el proceso de enfriamiento, asimismo, se tiene como factor de stress también a la descongelación (Watson, P., 2000).

Cuando el semen se congela y se conserva a muy bajas temperaturas, esto en Nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}$  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, tanto nacional como internacionalmente, 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 (Holt, W., 2000).

Según Santiani, A. (2003), el proceso de criopreservación de semen involucra 3 fases:

- a) Fase de enfriamiento, b) fase de congelamiento, y c) fase de descongelamiento.

Durante la fase de enfriamiento la temperatura del semen diluido es disminuida gradualmente desde la temperatura en la que fue colectada hasta  $5^{\circ}$  C. Esta fase tiene una duración entre 0,5 a 3 horas. En esta fase se produce una disminución de la motilidad espermática a causa de un aumento de la producción de reactivos de oxígeno (Holt, W., 2000).

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 dándole un alto grado de fragilidad (Neild et al., 2003).

Terminada la fase de enfriamiento debe haber un período de transición. En este período se adicionan los crioprotectores al semen diluido. Este período permite una estabilización de los espermatozoides en la solución. Para lo cual el semen debe ser mantenido a una temperatura de 5° C por un período de 0,5 a 1,5 horas (Neild et al., 2003).

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. 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, P., 2000).

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 al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente rápida para prevenir la deshidratación excesiva (Holt, W., 2000).

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 (Holt, W., 2000).

En resumen la criopreservación de semen en camélidos sudamericanos es parecida a las realizadas en otras especies aunque existen algunas etapas algo inherente que ya se viene definiendo. En donde el proceso de enfriamiento se puede alcanzar en una hora; luego se adiciona el glicerol en forma seriada y usando una tercera parte del dilutor con glicerol cada 15 minutos, luego se deja por una hora para el proceso de adaptación.

El proceso de enpajillamiento se realiza en pajillas de 0,25 y 0,5 ml. La congelación de semen que es satisfactoria es en forma lenta y bajando 1 cm por minuto en vapores de nitrógeno líquido hasta que las pajillas se sumergen en nitrógeno líquido. Al descongelamiento existe aproximadamente un 50% de espermatozoides que pierden su motilidad y

constituye un reto en el proceso de descongelamiento que se viene investigando.

### 2.3 Marco Conceptual

- **Hiposmótico:** De una solución cuya presión osmótica es menor que la otra solución considerada estándar.
- **Plasma seminal:** El plasma seminal es un fluido complejo, producido por glándulas accesorias del aparato reproductor del macho.
- **Buffer o tampón:** Disolución amortiguadora o disolución reguladora es una mezcla en concentraciones relativamente elevadas de un ácido y su base conjugada, es decir sales hidrolíticas activas.
- **Dilutor:** Sustancia que tiene todos los componentes necesarios para mantener la viabilidad de una muestra sin alterar sus parámetros.
- **Crioprotector:** Sustancia que protege o previene en un medio frío.
- **Libido:** Estímulos que desencadenan la conducta sexual del macho.
- **Tris:** Hidroximetil Aminometano, tampón más utilizado en laboratorios de biología y bioquímica.

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIAL Y MÉTODO**

#### **3.1 Material**

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

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de reproducción animal y en el fundo los Pichones Sur de la facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna ubicado a una coordenada UTM 366907 8006025 y a una altitud promedio de 599 msnm, en la provincia de Tacna; con temperatura que fluctúa entre 22 a 30° en época de verano y 10 a 24° de temperatura en época de invierno.

##### **3.1.2 Población y Muestra**

En el presente estudio se trabajó con una población de 10 alpacas macho de la raza Huacaya de 3 a 5 años de edad para el adiestramiento y colecta de semen; de los cuales se seleccionó un grupo de 5 machos que mostraron mayor comportamiento sexual (lóbido) y los cuales hayan aceptado la vagina artificial; de ese grupo se procedió a coleccionar semen

que posteriormente fueron sometidos a 2 tratamientos con diferentes dilutores.

**Tabla 1. Número de muestras de semen para evaluación**

	Tratamiento: Tipo de dilutor	
	Dilutor 1	Dilutor 2
Número de animales	5	5
Número de repeticiones/ tratamiento	5	5
Total de repeticiones	25	25

Fuente: Elaboración propia

### **3.1.3 Materiales**

#### **Equipo de laboratorio.**

- Microscopio óptico.
- Baño María.
- Refrigeradora.
- Balón criogénico
- Equipo convencional de congelación

#### **Material de laboratorio**

- Pajillas de 0,25 mL.
- Vasos de precipitación de 50mL.
- Probetas 50 mL.

- Tubos falcón de 15 mL
- Termómetro.
- Tubos de ensayo de 15 mL.
- Placas Petri.
- Vagina artificial
- Láminas portaobjetos.
- Láminas cubreobjetos.
- Jeringas descartables de 5 y 10 mL.
- Jeringas de tuberculina.
- Micropipetas
- Tips (puntas descartables)
- Vortex

**Reactivos.**

- Eosina (5%).
- Nigrosina (10%).
- Fructuosa.
- Formaldehido.
- Citrato de sodio bihidratada.
- Tris.
- Ácido cítrico.

- Glicerol.
- Etilenglicol
- Yema de huevo.
- Alcohol Polivinílico
- Agua bidestilada.
- Solución salina normal (0,89% NaCl).
- Alcohol 70%.
- Nitrógeno líquido

## **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 tomadas 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 25 colectas de semen (repeticiones) de los 5 alpacas machos durante el desarrollo del estudio, en cada repetición se evaluó en el microscopio los parámetros

espermáticos, antes de la congelación y después de la congelación; debido a que la muestra fue de poco volumen, además que la muestra no puede mantenerse a una temperatura normal por mucho tiempo ya que pierde viabilidad.

### **Evaluación microscópica**

Motilidad espermática: Total

La evaluación de la motilidad total se realizó con los siguientes pasos:

Se colocó un volumen de 10 microlitros de semen sobre un portaobjetos nuevo y precalentado, luego se cubrió con una laminilla cubreobjetos.

La muestra se observó con un microscópico óptico a 20x, se determinó el porcentaje de células espermáticas en movimiento, en un número de 4 campos microscópicos.

Los resultados se expresaron en porcentaje, según la siguiente fórmula:

$$\text{Motilidad Total.} = \frac{\text{Número de espermatozoides móviles.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

Integridad de la membrana espermática: Prueba de Host

Se llevó a baño María a una temperatura de 37°C un tubo falcón con 900 microlitros de solución hiposmótica (citrato de sodio 4,5 mg/ml y fructuosa 2,45 mg/ml )

Del semen recolectado se extrae 100 microlitros, luego se procedió a agregar el semen a la solución hiposmótica, el cual se mantuvieron por 30 minutos en baño María (37°C).

Pasados los 30 minutos, se agrega 100 microlitros de formol al 10% al tubo falcón y se retira del baño María.

Se evaluó la reacción del semen a la solución hiposmótica, en un microscopio óptico a 20 X; y se observó el número de espermatozoides que presentaron un hinchamiento y enrollamiento en su cola.

Los resultados se expresaron en porcentaje, de la siguiente manera:

$$\text{células reaccionadas.} = \frac{\text{Número de espermatozoides hinchados.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

Viabilidad espermática: Tinción eosina negrosina

Se mantiene en una lámina portaobjeto una gota de eosina negrosina.

Se extrajo con una pipeta 10 microlitros (ul) de semen y se le agregó a la lámina portaobjetos.

Luego se realizó un frotis con otro portaobjeto y se procede a secar.

Una vez seco la muestra de tinción se procedió a realizar la prueba de viabilidad.

Se evaluó la muestra en un microscopio óptico a 100x con aceite de inmersión.

Se determinó el número de espermatozoides vivos y muertos, Se consideró espermatozoides vivos a aquellos que no presentan coloración y espermatozoides muertos a los que son teñidos con el colorante.

Se realizó el conteo de 200 espermatozoides, donde se identificaron vivos y muertos.

Para viabilidad.

$$\% \text{ vivos} = \frac{\text{Número de espermatozoides sin coloración.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

#### **Dilución del semen:**

Se determinó la calidad seminal de las muestras, cada muestra se dividió en dos partes y se diluyó en igual volumen (dilución 1:1) con la fracción A (dilutor sin crioprotector) de cada uno de los dilutores tris-yema de huevo y leche descremada.

**Tabla 2. Dilutor 1: Tris-yema de huevo**

Componentes del dilutor	Fracción A	Fracción B
Tris	0,300 g	0,300 g
Ácido cítrico	0,140 g	0,140 g
Fructuosa	0,550 g	0,550 g
Yema de huevo	20%	20%
Antibiótico	P:150 000 UI/100ml E:150.000 ug/100 ml	P:150 000 UI/100ml E:150.000 ug/100 ml
Agua destilada	10 ml	10 ml
Crioprotector	-----	Glicerol 10%

P: Penicilina procainica, E: Estreptomicna sulfato

Fuente: Fórmula de Santiani A. modificada, 2005.

**Tabla 3. Dilutor 2: Leche descremada**

Componentes del dilutor	Fracción A	Fracción B
Leche descremada	9 ml	9 ml
Fructuosa	0,485 g	0,485 g
Yema de huevo	5 %	5 %
Antibiótico	P:150 000 UI/100ml E:150 000 ug/100 ml	P:150 000 UI/100ml E:150 000 ug/100 ml
Agua destilada	10 ml	10 ml
Crioprotector	-----	Etilenglicol 14 %

P: Penicilina procainica, E: Estreptomicna sulfato

Fuente: Fórmula de Santiani A. modificada, 2005.

Para el proceso de enfriamiento las muestras fueron enfriadas hasta 5°C en un tiempo aproximado de 90 minutos diluidas con la fracción A; luego de llegar a 5°C, se adiciono la fracción B (dilutor con crioprotector) del dilutor correspondiente y se dejó estabilizar por 30 minutos a esa temperatura para que por último se empajille en pajillas de 0,25 ml.

### **Protocolo de criopreservación:**

El proceso de congelación de semen se realizó de forma manual:

- Una vez enpajilladas las muestras de semen se llevó a vapores de nitrógeno.
- Se graduó la gradilla portadora de pajillas a 5cm sobre el nivel del nitrógeno líquido, donde se mantuvieron por 10 min.
- Finalmente fueron sumergidas directamente en el nitrógeno líquido a -196°C, y almacenadas en el termo criogénico hasta su evaluación post descongelación.

### **Evaluación espermática post-descongelamiento**

El descongelamiento de las pajillas se realizó al día siguiente después de la congelación, poniéndolas en baño María a 37°C durante 30 segundos.

Se evaluó las muestras de semen descongeladas: la motilidad, integridad funcional de membrana y viabilidad espermática anteriormente mencionados y los resultados se expresó en porcentaje.

### 3.2.3 Análisis de Datos

Se determinó la media y la desviación estándar para los diferentes parámetros seminales evaluados, tales como motilidad total, integridad funcional de la membrana y viabilidad.

Para comparar los dos tipos de dilutores sobre la motilidad total, test hiposmótico y viabilidad, después de la descongelación fueron evaluados mediante la prueba de T- Student, con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ . Se usó el Software estadístico de SPSS (Versión 19).

$$t = \frac{X - \mu}{\frac{S_x}{\sqrt{n}}}$$

$X$  = Media

$\mu$  = Valor a analizar

$S_x$  = Desviación estándar

$n$  = Tamaño de muestra

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

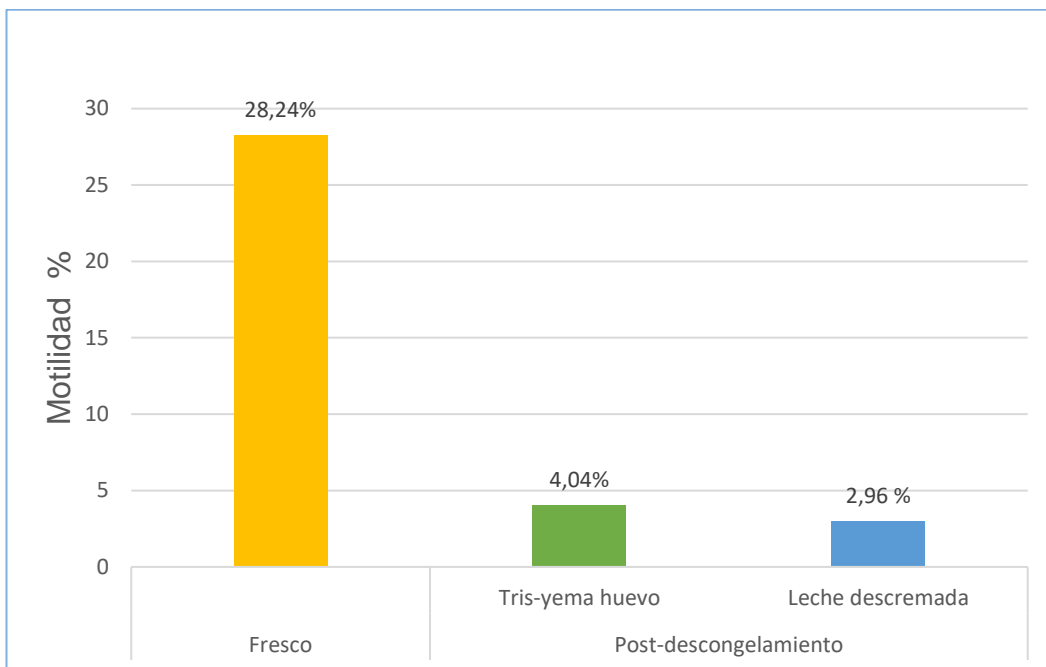
**Tabla 4. Motilidad total (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos**

Nº de repeticiones	semen fresco motilidad (%)	E. post-descongelamiento (%)	
		T1: Dilutor Tris-yema de huevo	T2: Dilutor Leche descremada
1	40	1	1
2	20	5	2
3	45	8	5
4	20	1	1
5	45	5	2
6	20	1	5
7	19	2	2
8	30	16	8
9	50	8	5
10	60	5	5
11	18	10	2
12	30	1	2
13	20	5	1
14	28	1	2
15	24	2	5
16	35	2	1
17	26	2	3
18	19	5	2
19	21	2	1
20	25	5	5
21	19	8	2
22	25	2	8
23	24	1	2
24	23	2	1
25	20	1	1
Promedio	28,24	4,04	2,96
D.S.	11,32	3,67	2,15

Fuente: Elaboración propia.

D.S. =desviación estándar, T1=tratamiento 1, T2=tratamiento 2

En la tabla 4, se observa los resultados de motilidad espermática antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos: Tris-yema de huevo y Leche descremada. Se realizó 5 repeticiones por cada macho que se colectó semen, resultando un total de 25 datos; en los cuales se observó que la motilidad de semen fresco fue de  $28,24 \pm 11,32$  % y la motilidad en la evaluación post-descongelamiento con el tratamiento Tris-yema de huevo es de  $4,04 \pm 3,67$  % y con el tratamiento Leche descremada fue de  $2,96 \pm 2,15$  %, los cuales muestran diferencias significativas entre el semen fresco y después del proceso de congelación ( $p \leq 0,05$ ) (Anexo 6 y 9). Al comparar las medias de los tratamientos, el dilutor Tris-yema de huevo es superior a la Leche descremada pero no significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ), según el estadístico T Student (Anexo 03). Estos resultados demuestran una baja motilidad post-descongelamiento en ambos tratamientos, ya que una baja motilidad inicial en semen fresco determina un resultado poco favorable al protocolo de congelación, lo cual indica que el proceso de congelación en ambos tratamientos reduce el porcentaje de motilidad espermática.



**Figura 1. Motilidad total (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos**

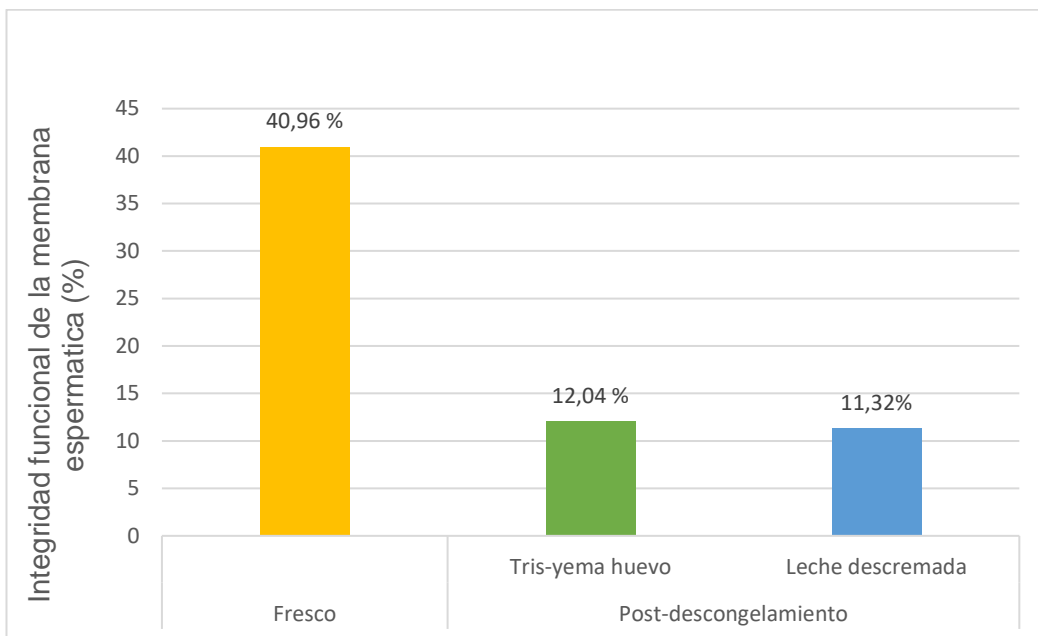
**Tabla 5. Integridad funcional de la membrana (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos**

N° de repeticiones	semen fresco (%)	E. post-descongelamiento (%)	
		T1: Dilutor Tris-yema de huevo	T2: Dilutor Leche descremada
1	70	15	10
2	25	14	12
3	57	10	12
4	55	12	10
5	44	13	11
6	30	10	10
7	40	11	9
8	50	28	20
9	52	9	15
10	55	14	14
11	60	12	9
12	35	9	13
13	38	11	12
14	30	10	10
15	35	12	10
16	55	10	11
17	29	9	10
18	30	14	11
19	30	13	10
20	35	13	12
21	29	11	9
22	30	10	10
23	35	9	10
24	45	12	13
25	30	10	10
Promedio	40,96	12,04	11,32
D.S.	12,41	3,78	2,39

Fuente: Elaboración propia.

D.S. =desviación estándar , T1=tratamiento 1 , T2=tratamiento 2

En la tabla 5, se observa los resultados de la integridad funcional de la membrana espermática antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos: Tris-yema de huevo y Leche descremada. Del total de las 25 repeticiones; se observa la reacción de la membrana espermática al Test hiposmótico, en lo que respecta al semen fresco es de  $40,96 \pm 12,41$  % y la respuesta al Test hiposmótico en la evaluación post-descongelamiento con el tratamiento Tris-yema de huevo es de  $12,04 \pm 3,78$  % y con el tratamiento Leche descremada es de  $11,32 \pm 2,39$  %. Los datos obtenidos de espermatozoides que reaccionaron positivamente al test hiposmótico fueron analizados mediante la prueba de T-Student ( $p < 0,05$ ) antes de la congelación y después de la descongelación para determinar el efecto del proceso de congelación, los cuales muestran diferencias significativas entre el semen fresco y después del proceso de congelación ( $p < 0,05$ ) (Anexo 15 y 18), y entre los dos tratamientos no muestran diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) (Anexo 12). Estos resultados evidencian que el efecto de la congelación influye en la integridad y funcionalidad de la membrana espermática y entre los dos tratamientos se evidencian una pérdida de integridad de membrana espermática, posiblemente por el daño osmótico y mecánico que afronta la membrana durante el proceso criopreservación.



**Figura 2. Integridad funcional de la membrana espermática (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos.**

**Tabla 6. Viabilidad (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos**

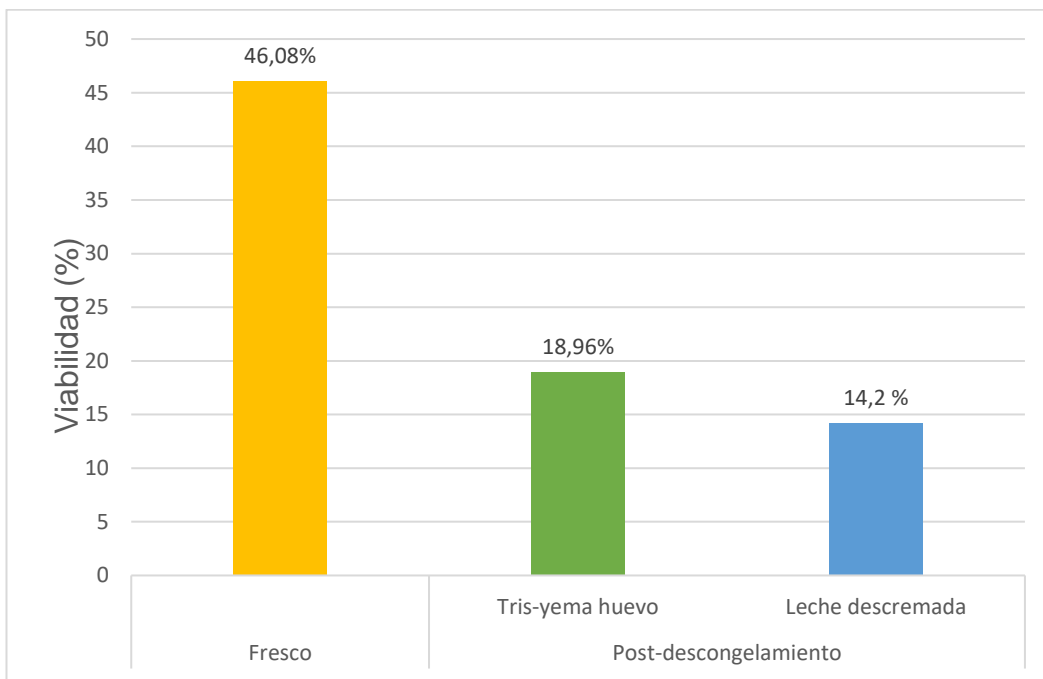
N° de repeticiones	semen fresco (%)	E. post-descongelamiento (%)	
		T <sub>1</sub> : Dilutor Tris-yema de huevo	T <sub>2</sub> : Dilutor Leche descremada
1	60	35	12
2	50	25	15
3	85	20	18
4	67	14	10
5	58	20	11
6	45	25	14
7	50	25	15
8	57	35	20
9	67	15	25
10	56	20	20
11	45	15	18
12	40	10	15
13	35	20	12
14	30	15	10
15	29	14	15
16	45	10	11
17	35	17	10
18	35	26	15
19	47	14	10
20	55	18	13
21	45	29	9
22	35	20	13
23	26	10	16
24	25	12	15
25	30	10	13
promedio	46,08	18,96	14,2
D.S.	14,78	7,28	3,82

Fuente: Elaboración propia.

D.S. =desviación estándar , T1=tratamiento 1 , T2=tratamiento 2

En la tabla 6, se observa los resultados de Viabilidad espermática antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos: Tris-yema de huevo y Leche descremada. Del total de las 25 repeticiones; observándose la viabilidad espermática a la tinción con eosina nigrosina, en lo que respecta al semen fresco es de  $46,08 \pm 14,78$  % y la viabilidad espermática a la evaluación post-descongelamiento con el tratamiento Tris-yema de huevo es de  $18,96 \pm 7,28$  % y con Leche descremada es de  $14,2 \pm 3,82$  %.

Los datos obtenidos en viabilidad espermática fueron analizados mediante la prueba T-Student antes de la congelación y después de la descongelación para determinar el efecto del proceso de congelación en ambos tratamientos. Con respecto a la muestra en fresco, entre los tratamientos Tris-yema de huevo y Leche descremada a la descongelación se encontró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (Anexo 24 y 27) en lo que respecta a ambos dilutores. De igual manera a la comparación entre los dos tratamientos se encontró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (Anexo 21).



**Figura 3. Viabilidad (%) de espermatozoides antes y después de la congelación diluidos con dos tratamientos**

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

#### **5.1 Motilidad total**

Resultados similares al presente estudio reporta Santiani et al., (2005) en Puno; en el cual evalúa las criopreservación de espermatozoides de alpaca con diferentes crioprotectores en su dilutor, reportando una motilidad del  $1,0 \pm 1,4$  % en semen descongelado utilizando Tris yema de huevo-etilenglicol y  $4,0 \pm 1,1$  % con Tris yema de huevo-glicerol; lo cual demuestra que la motilidad al descongelamiento disminuye drásticamente durante el proceso de congelación, lo cual indica que el tipo de crioprotector y el nivel de concentración de los mismos a la criopreservación influye mucho durante el proceso de adaptación del espermatozoide al medio dilutor (Holt, W., 2000). Aunque el mismo estudio reportó resultados superiores en motilidad  $20,0 \pm 6,7$  %, con el segundo tratamiento leche descremada-etilenglicol. Tal superioridad se debe probablemente al tiempo mayor en el que se realizó el proceso de congelación lo cual fue en unos 15 minutos; que en caso del presente estudio se realizó en un tiempo de 10 minutos en vapores de nitrógeno; ya que durante esta fase los espermatozoides son expuestos a un estrés

de tipo osmótico y térmico, en donde se debe controlar una adecuada velocidad de congelación (Watson, P., 2000).

Los resultados del presente estudio en cuanto a motilidad con  $2,96 \pm 2,15$  % con Leche descremada, son parecidos a los de Choez et al., (2013) en un trabajo realizado en Lima en temporada de verano; quienes reportaron motilidades al descongelamiento de  $7 \pm 4,47$  % con Leche descremada-glicerol partiendo de una motilidad inicial menor a 60%, el cual trabajó con espermatozoides del epidídimo y en donde el presente estudio obtuvo muestras de semen mediante vagina artificial con una motilidad promedio inicial de  $28,24 \pm 11,32$  %; lo que indicaría que la motilidad inicial influiría en los resultados obtenidos después del proceso de congelación, en donde un desgaste oxidativo al inicio de la criopreservación determinaría la baja motilidad al descongelamiento (Choez et al. 2013).

Los resultados del presente trabajo muestran diferencias con respecto a los resultados publicados por Banda *et al.* (2010) quien reporta una motilidad de  $14,00 \pm 7,5\%$  ( $4,04 \pm 3,67$  % en este estudio) al descongelamiento utilizando Tris-yema de huevo- glicerol y  $17,0 \pm 4,3$  % ( $2,96 \pm 2,15$  % en este estudio) con Leche descremada-etilenglicol; en ambos tratamientos de esta investigación se utilizó el Cryogens 4,0 como método automatizado de congelamiento; cuyos resultados muestran

diferencias con el presente estudio, esto debido al método automatizado de criopreservación, siendo un método que mejor controla los rangos de temperatura al proceso de criopreservación, un factor importante en la superioridad con nuestros resultados. Otro factor en la diferencia entre nuestros resultados es el método de obtención de la muestra, la cual fue de espermatozoides del epidídimo; en caso de este estudio fue mediante vagina artificial. En donde se obtiene semen con plasma seminal; por un lado estudios indican que el plasma seminal protegería a los espermatozoides durante el congelamiento (Barrios et al., 2000), mientras que otros estudios señalan que la adición de plasma seminal afecta negativamente la calidad seminal durante la criopreservación; el cual contiene proteínas de factor de inicio de capacitación espermática, lo que posiblemente inicia un proceso oxidativo antes de su preservación (Maxwell, W., 2008).

## **5.2 Integridad funcional de membrana espermática**

Resultados similares reporta Choez et al., (2013) quienes obtuvieron resultados en integridad funcional de la membrana espermática post-descongelamiento de  $12,00 \pm 15,19$  % ( $11,32 \pm 2,39$  % en el presente estudio) con el dilutor Leche descremada, el cual demostró una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto a la muestra en fresco con una

motilidad inicial del 60 %. Esta diferencia después de la descongelación puede deberse probablemente al método de congelación que se realizó; al igual que el presente estudio con una integridad de membrana del  $11,32 \pm 2,39$  % al descongelamiento; se trabajó con el método convencional de congelación a vapores de nitrógeno, con diferencia en el período de equilibrio sobre vapores de nitrógeno líquido, el cual fue a 5 cm por 10 minutos en pajillas de 0,25 ml en el estudio reportado por Choez et al.,(2013), fue de 5 cm por 20 minutos. Esto podría deberse a que mayor tiempo de equilibrio podría garantizar una mayor adaptación de los espermatozoides a bajas temperaturas y por tanto una mayor tasa de integridad espermática a la descongelación (Hafez et al., 2002; Muiño et al., 2008).

En cambio Banda et al. (2010), reporta resultados mayores en cuanto a integridad funcional de la membrana con  $24,3 \pm 9,6$  % para dilutor Tris-yema de huevo y  $17,9 \pm 5,5$  % para Leche descremada quien utilizó un método de congelación automatizado con el Criogens 4,0. Siendo este un equipo de crio-congelación automatizado, el cual controla mejor los rangos de temperatura durante el proceso de congelación evitando daños estructurales de la membrana espermática, lo cual demuestra que el proceso de congelación daña la integridad de membrana espermática

cuando no se controla bien los rangos de temperatura en un proceso de congelación convencional.

### **5.3 Viabilidad espermática**

Los resultados del presente estudio indican que hubo una mejor viabilidad espermática con Tris-yema de huevo al descongelamiento  $18,96 \pm 7,28 \%$  en comparación con  $14,2 \pm 3,82 \%$  con Leche descremada; lo que explicaría el factor protector de las lipoproteínas de baja densidad dentro de la yema de huevo, al momento de reestructuración de la membrana espermática durante el proceso de criopreservación (Moussa et al., 2002).

Resultados similares fue reportado por Calderón, D. (2015); con una viabilidad en fresco de  $34,73 \%$  con el dilutor Tris-yema de huevo y a la descongelación fue de  $12,67 \%$ ; concordando con este estudio, ya que en ambos se utilizó un volumen de yema de huevo al  $20 \%$  en el dilutor, método convencional de congelación; en donde la regulación de la temperatura se controla a vapores de nitrógeno. Estos resultados son corroborados con el estudio de Choez et al., (2013) con una viabilidad al descongelamiento de  $12,00 \pm 8,76 \%$  con el dilutor Leche descremada utilizando el método convencional de congelación. Lo que hace indicar que el método utilizado en este estudio y en los demás estudios

reportados influiría en el daño causado en la membrana espermática durante el proceso de congelación.

Aller et al., (2001) obtiene resultados superiores a este estudio ( $18,96 \pm 7,28$  % con tris yema de huevo) con una viabilidad en fresco de  $68,5 \pm 12,3$  % y al descongelamiento fue de  $32,4 \pm 10,5$  % con el dilutor yema de huevo citrato y crioprotectores glicerol y dimetilsulfóxido; la utilización de un crioprotector de membrana espermática adicional como parte del medio de dilución, atribuye una protección más a lo que afronta el espermatozoide durante la reestructuración membrana espermática en el proceso de congelación.

Por otro lado, Santiani et al., (2005) reporta resultados inferiores a los nuestros en donde la viabilidad al descongelamiento con dilutor Tris-yema de huevo fue de  $6,2 \pm 1,5$  %; esta diferencia podría atribuirse al método de evaluación utilizado puesto que este autor realizó una evaluación integral de viabilidad e integridad acrosomal utilizando la tinción azul de tripán y giemsa, donde considera un espermatozoide viable con acrosoma intacto. Por el contrario, en el mismo estudio reporta resultados superiores a este estudio con el dilutor Leche descremada al descongelamiento con una viabilidad de  $21,0 \pm 1,0$  %; esta diferencia podría atribuirse a la utilización de diferentes marcas en lo que respecta a leche descremada; utilizando

en esta investigación la marca (Gloria). Respecto al presente estudio se utilizó la marca (Laive), esto hace indicar que la calidad de lipoproteínas presentes en estos productos lácteos se ve alterada de acuerdo a la calidad del mismo producto; ya que las lipoproteínas de baja densidad cumplen una función importante en la reestructuración de la membrana espermática durante el proceso de congelación y la presencia de las proteínas antioxidantes en la leche favorecen la eliminación de los radicales libres del medio extracelular de los espermatozoides (Moussa et al., 2002).

#### **5.4 Contrastación de hipótesis**

- **Ho:** Los parámetros espermáticos de sobrevivencia a la descongelación resultan ser similares con el dilutor Tris yema de huevo en comparación con el dilutor Leche descremada en semen de alpaca de la raza Huacaya en la zona costa de Tacna.
- **Ha:** Los parámetros espermáticos de sobrevivencia a la descongelación resultan ser mejor con el dilutor Tris yema de huevo en comparación con el dilutor Leche descremada en semen de alpaca de la raza Huacaya en la zona costa de Tacna.
- **Nivel de Significancia:**  $\alpha = 0,05$
- **Prueba Estadística:** T-Student

- **Valor crítico:**

Si  $P < 0,05$  = se rechaza la  $H_0$ , se acepta la  $H_a$

Si  $P > 0,05$  = se acepta la  $H_0$ , se rechaza la  $H_a$

- **Toma de decisión:**

En la estadística no hay significancia entre las medias de los dos tratamientos en donde p valor es  $> 0,05$ . Por lo tanto se rechaza la hipótesis  $H_a$  y se acepta la  $H_0$ .

- **Conclusión:**

Los dos tratamientos se comportan de manera similar sobre los parámetros espermáticos a la descongelación, es decir que la sobrevivencia espermática al comparar los dos tipos de dilutores muestran resultados parecidos.

## CONCLUSIONES

- Los dilutores Tris-yema de huevo y Leche descremada muestran resultados similares sobre los parámetros espermáticos de sobrevivencia a la descongelación.
- La motilidad total de los espermatozoides después de la descongelación disminuye drásticamente en ambos casos de los dos dilutores.
- La respuesta de los espermatozoides al Test Hiposmótico (Host) se ve disminuida después de la congelación, esto nos indica que la congelación influye en la integridad funcional de membrana en ambos casos de los dos dilutores.
- La viabilidad espermática es afectada después de la congelación en ambos casos de los dos dilutores, esto permiten concluir que existe un daño estructural de la membrana espermática durante el proceso de congelación.

## **RECOMENDACIONES**

- Realizar nuevas investigaciones experimentando nuevos dilutores de origen animal, como crioprotector en la congelación de espermias de camélidos sudamericanos en la zona costa de Tacna, como ensayo experimental para su posterior aplicación en la zona alto andina de la misma región.
- Realizar nuevos protocolos de congelación para una curva de congelación adecuada, para criopreservar la viabilidad espermática en alpacas de la región de Tacna.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aller, J., Rebuffi, E., Cancino, A., Alberio, R. (2001). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, Viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (lama glama). Jujuy – Argentina.
- Banda, J., Evangelista, S., Ruiz, L., Sandoval, R. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y Leche Descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, 24(5), 2008–2011.
- Barrios, B., Perez, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño, T., Cebrián-Pérez, J. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. Biol Reprod 63: 1531-1537.
- Bravo, W. y Alarcón, V. (2013). Artículo original: Preservación de semen y Avances recientes en la Inseminación Artificial de Llamas y Alpacas Spermova; 3(2): 158 – 160. Cusco, Perú.

Bravo, W., Ramos, A., Alarcón, V., Ordoñez, C., (2008). The effect of GnRH on fertility of alpacas inseminated with frozen–thawed semen. In: Proc15th ICAR, Budapest, Hungary.

Bravo, W., Alarcón, V., Baca, L., Cuba, Y., Ordoñez, C., Salinas, J., & Tito, F. (2013). Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Animal Reproduction Science*, <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.005>

Bravo, W., Flores, U., Garnica, J., & Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47(3), 619–626. [http://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00020-4](http://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00020-4)

Bravo,W., Skidmore, A., & Zhao, X. X. (2000). Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 173–193. [http://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00158-5](http://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00158-5)

Calderon, D. (2015). Efecto de la adición del plasma seminal de toro (bos taurus) sobre la viabilidad de los espermatozoides criopreservados colectados de los conductos deferentes en alpacas (vicugna pacos);Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.

Choez, K. (2013). efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Lima-Perú.

Cuba, Y. (2000). Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del semen de alpaca (*Lama pacos*) antes y después del proceso de congelado. Thesis. Univ. Nac. San Antonio Abad, Cusco, Perú.

Cunningham Collins English Dictionary (2000). 5th Edition first published in © HarperCollins Publishers 1979, 1986, 1991, 1994, 1998.

Garnica, J., Achata, R., Bravo, W. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*, 32(1-2), 85–90. [http://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90059-Z](http://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90059-Z)

Garcia, J.(2000). SIMPOSIUM XIX de cunicultura. Predicción del valor energético del heno de alfalfa.

Gimeno, M. y Isabel, M. (2014). Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo y oligoastenoteratozoospermicos. Universidad Politècnica DeValència.

Hafez, E. y Hafez, B. (2000). Reproducción e inseminación Artificial en Animales. 7ed. Mexico.McGraw Hill.

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

Huanca, W., Cordero, A., Huanca T., (2007). Biotecnología reproductiva en camelidos sudamericanos: avances y perspectivas. *XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA-Cusco-Perú*, 15, 185–214.

Martins, C., Rumpf, R., Pereira, D., Dode, M. (2007).Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal Reproduction Science*. 101(2007) 326-331

Mancisidor, I. (2013). Efecto del  $\alpha$  – tocoferol durante el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca ( *Vicugna pacos* ). *E.A.P de Genética Y Biotecnología.Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú*,

Morton, K., Bathgate, R., Evans, G., Maxwell, W.M.C. (2007). Cryopreservationof epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a

comparison of citrate- Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod. Fertil. Develop.* 19, 792–796.

Maxwell, W. (2008). Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation. *Theriogenology* 70 (2008) 1360–1363 Australia.

Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Aton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology.*, vol.57, p.1695-1706.

Neild, D., Gadella, B., Chaves, G., Miragaya, M., Colenbrander, B., & Agüero, A. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, 59(8), 1693–1705.

Pérez, G. (1998). Revisa Anual del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) Capítulo 4; Inseminación Artificial en Camelidos Sudamericanos. Anexo Illpa; Puno, Perú.

Santiani, A., Huanca, W., Sapaná, 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.

Salamon, S. y Maxwell, W. (1995). Frozen storage of ram semen: II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38, 1–36.

Suarez, P. (2005). Efecto de la suplementación de L-Cisteína en el dilutor TES-Tris yema, sobre la calidad espermática post-descongelamiento en alpaca (*Vicugna pacos*) Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú

Sumar, J. y Leyva, V. (1981). Colección de semen mediante vagina artificial en alpaca. Proceeding of the IVth International Conference on South America Camelids. Punta Arenas, Chile.

Sumar, J. (2007). XX Reunión ALPA, XXX Reunión APPA; Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15 (Supl. 1). Cusco, Perú.

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

Yaranga, C. (2009). Alimentación de Camélidos Sudamericanos y Manejo de Pastizales; Docente Principal de la Facultad De Zootecnia - UNCP, Huancayo.

## **ANEXOS**

### Anexo 1. Estadístico de grupo para motilidad total después de la descongelación en el dilutor tris y leche

		Grupo	Estadístico	Error típico	
T r a t a m i e n t o s	Tris yema de huevo	Media	4,04	0,736	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	2,52 5,58		
		Mediana	2,00		
		Varianza	13,54	Límite inferior	
		Desv. Tip.	3,68	Límite super.	
		Mínimo	1,00		
		Máximo	16,00		
		Rango	15,00		
		Asimetría	1,68		0,46
		Curtosis	3,35		0,90
	Leche descremada	Media	2,96	0,43	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	2,07 3,85		
		Mediana	2,00		
		Varianza	4,62	Límite inferior	
		Desv. Tip.	2,15	Límite superior	
		Mínimo	1,00		
		Máximo	8,00		
		Rango	7,00		
Asimetría	1,12		0,46		
Curtosis	0,35		0,90		

### Anexo 2. Prueba t estadística de grupo

Grupo	N	Media	Desv. Tip.	Error tip. De la media
Tris	25	4,04	3,68	0,73
Leche	25	2,95	2,15	0,43

### Anexo 3. Prueba T Student para muestras independientes tris yema de huevo y leche descremada

	Prueba de levene para igualdad de varianzas		Prueba T para igualdad de medias			
	F	Sig.	Gl	Sig. (Bilateral)	Dif. de Medias	Error típico
Se han asumido varianzas iguales	4,35	0,04	48	0,21	1,08	0,85

#### Anexo 4. Prueba T para motilidad en fresco y tris yema de huevo al descongelamiento

Grupo	Media	N	Desv. Tip.	Error tip. de la media
Fresco	28,24	25	11,32	2,26
Tris	4,04	25	3,68	0,73

#### Anexo 5. Correlaciones de muestras relacionadas

	N	Correlación	Sig.
Fresco y Tris	25	0,19	0,35

#### Anexo 6. Prueba de muestras relacionadas para motilidad en fresco y al descongelamiento

Diferencias relacionadas						
	Media	Desv. Tip.	95% intervalo de confianza para la diferencia		gl	Sig.
			Inf.	Sup.		
Fresco y Leche	24,20	11,21	19,57	28,82	24	0,00

#### Anexo 7. Prueba T para motilidad en fresco y leche descremada al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas

Grupo	Media	N	Desv. Tip.	Error tip. de la media
Fresco	28,24	25	11,32	2,26
Leche	2,96	25	2,15	0,43

#### Anexo 8. Correlaciones de muestras relacionadas

	N	Correlación	Sig.
Fresco y Leche	25	0,29	0,15

**Anexo 9. Prueba T para muestras relacionadas: motilidad en fresco y al descongelamiento**

Diferencias relacionadas						
	Media	Desv. Tip.	95% intervalo de confianza para la diferencia		gl	Sig.
			Inf.	Sup.		
Fresco y Leche	25,28	10,88	20,78	29,77	24	0,00

**Anexo10. Estadístico de grupo para test de host después de la descongelación en dos tratamientos: tris y leche descremada**

Grupo		Estadístico	Error típico	
T r a t a m i e n t o s	Tris yema de huevo		12,04	
		Media	10,48	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	13,60	
		Mediana	11,00	
		Varianza	14,29	
		Desv. Tip.	3,78	
		Mínimo	9,00	
		Máximo	28,00	
		Rango	19,00	
Leche descremada	Leche descremada		11,32	
		Media	10,48	
		Intervalo de confianza para la media al 95%	13,60	
		Mediana	10,00	
		Varianza	5,72	
		Desv. Tip.	2,39	
		Mínimo	9,00	
		Máximo	20,00	
		Rango	11,00	
		Asimetría	2,22	
		Curtosis	6,45	

### Anexo 11. Prueba T estadística de grupo

Grupo	N	Media	Desv. Tip.	Error tip. De la media
Tris	25	12,04	3,78	0,75
Leche	25	11,32	2,39	0,47

### Anexo 12. Prueba T Student para muestras independientes tris yema de huevo y leche descremada

	Prueba de Levene para igualdad de varianzas		Prueba T para igualdad de medias			
	F	Sig.	Gl	Sig. (Bilateral)	95% intervalo de confianza para la diferencia	
					Inf.	Sup.
Se han asumido varianzas iguales	0,57	0,45	48	0,42	-1,07	2,51

### Anexo 13. Prueba T para test de host en fresco y tris yema de huevo al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas

Grupo	Media	N	Desv. Tip.	Error tip. de la media
fresco	40,96	25	12,41	2,48
tris	12,04	25	3,78	0,75

### Anexo 14. Correlaciones de muestras relacionadas

	N	Correlación	Sig.
Fresco y Tris	25	0,24	0,24

**Anexo 15. Prueba T para muestras relacionadas: host en fresco y al descongelamiento**

	Diferencias relacionadas						
	Media	Desv. Tip.	Error tip. De la media	95% intervalo de confianza para la diferencia		GI	Sig.
				Inf.	Sup.		
Fresco y Tris	28,92	12,06	2,41	23,94	33,89	24	0,00

**Anexo 16. Prueba T para test de host en fresco y leche descremada al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas**

Grupo	Media	N	Desv. Tip.	Error tip. de la media
Fresco	40,96	25	12,41	2,48
Leche	11,32	25	2,39	0,47

**Anexo 17. Correlaciones de muestras relacionadas**

	N	Correlación	Sig.
Fresco y Leche	25	0,25	0,22

**Anexo 18. Prueba T para muestras relacionadas: test de host en fresco y al descongelamiento**

	Diferencias relacionadas					
	Media	Error tip. De la media	95% intervalo de confianza para la diferencia		GI	Sig.
			Inf.	Sup.		
Fresco y Leche	29,64	2,40	24,67	34,60	24	0,00

**Anexo 19. Estadístico de grupo para viabilidad después de la descongelación en dos tratamientos: tris y leche descremada**

Grupo		Estadístico	Error típico
Tris yema de huevo	Media	18,96	1,45
	Intervalo de confianza para la media al 95%	15,95	
		21,97	
	Mediana	18,00	Límite inferior
	Varianza	53,12	
	Desv. Tip.	3,83	Límite super.
	Mínimo	10,00	
	Máximo	35,00	
	Rango	25,00	
	Leche descremada	Media	14,20
Intervalo de confianza para la media al 95%		12,62	
		15,78	
Mediana		14,00	Límite inferior
Varianza		14,67	
Desv. Tip.		2,39	Límite superior
Mínimo		9,00	
Máximo		25,00	
Rango		11,00	

**Anexo 20. Prueba T: estadística de grupo**

Grupo	N	Media	Desv. Tip.	Error tip. De la media
Tris	25	18,96	7,28	1,45
Leche	25	14,20	3,83	0,76

**Anexo 21. Prueba t student para muestras independientes tris yema de huevo y leche descremada**

	Prueba de levene para igualdad de varianzas		Prueba T para igualdad de medias			95% intervalo de confianza para la diferencia	
	F	Sig.	Gl	Sig. (Bilateral)	Dif. De medias	Inf.	Sup.
	varianzas iguales	8,64	0,00	48	0,00	4,76	1,44

**Anexo 22. Prueba T para viabilidad en fresco y tris yema de huevo al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas**

Grupo	Media	N	Desv. Tip.	Error tip. de la media
Fresco	46,08	25	14,78	2,95
Tris	18,96	25	7,28	1,45

**Anexo 23. Correlaciones de muestras relacionadas**

	N	Correlación	Sig.
Fresco y Leche	25	0,34	0,08

**Anexo 24. Prueba T para muestras relacionadas: viabilidad en fresco y al descongelamiento**

	Diferencias relacionadas					Sig.
	Media	Error tip. De la media	95% intervalo de confianza para la diferencia		GI	
			Inf.	Sup.		
Fresco y Tris	27,12	2,80	21,33	32,90	24	0,00

**Anexo 25. Prueba T para viabilidad en fresco y leche descremada al descongelamiento: estadístico de muestras relacionadas**

Grupo	Media	N	Desv. Tip.	Error tip. de la media
Fresco	46,08	25	14,78	2,95
Leche	14,20	25	3,83	0,76

**Anexo 26. Correlaciones de muestras relacionadas**

	N	Correlación	Sig.
Fresco y Leche	25	0,31	0,12

**Anexo 27. Prueba T para muestras relacionadas: viabilidad en fresco y al descongelamiento**

	Diferencias relacionadas					
	Media	Error tip. De la media	95% intervalo de confianza para la diferencia		GI	Sig.
			Inf.	Sup.		
Fresco y Leche	31,88	2,81	26,07	37,68	24	0,00