



UBA
Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Veterinarias

Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción
Animal (INITRA)

Cátedra de Teriogenología

**“EFECTO DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LOS
ESPERMATOZOIDES CRIOPRESERVADOS DE
LLAMA (*Lama glama*)”**

Tesista: Vet. Fumuso Fernanda G.

Director: Dra. Carretero María Ignacia

Co-Director: Dr. Miragaya Marcelo H.

2018

Dedicatoria

A mi abuela Mena, que siempre apoyó mi formación y profesión, me ayudó a acercarme al mundo de la investigación y la docencia, estimulando con sus palabras, su cariño y forma de ser mi crecimiento personal y profesional.

Agradecimientos

A mi familia, que siempre estaban y apoyaban en cada momento.

A Gaty, Deby y Cece el team que estaba presente siempre.

A mis Directoras, Susy y Nachy cada una imprescindible en lo laboral y personal, en su rol de guías y amigas.

A mi Co-director Marcelo que siempre está estimulándonos y apoyándonos a seguir hacia adelante y buscando cosas nuevas.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires por apoyar mi formación y permitir la difusión de las investigaciones realizadas a lo largo de la Tesis.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires por brindar el ámbito y el lugar para el desarrollo de la Tesis, además de ser la casa de estudios de mi título de grado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por la beca de formación de Doctorado.

A todas las personas que me ayudaron a lo largo del desarrollo de esta Tesis, gente invaluable que me ayudaba en el día a día.

Índice

Dedicatoria	Pág. 2
Agradecimientos	Pág. 3
Abreviaturas	Pág. 6
Resumen en español	Pág. 8
Resumen en inglés	Pág. 10
Introducción	
<i>Camélidos</i>	Pág. 12
<i>Características productivas de los Camélidos Sudamericanos</i>	Pág. 13
<i>Características reproductivas de la hembra de CSA</i>	Pág. 15
<i>Anatomía de los órganos reproductivos del macho de CSA</i>	Pág. 16
<i>Características reproductivas del macho de CSA</i>	Pág. 17
<i>Métodos de extracción de semen en los CSA</i>	Pág. 21
<i>Biotecnologías reproductivas en CSA</i>	Pág. 22
Hipótesis y Objetivos	
<i>Hipótesis y Objetivos generales</i>	Pág. 28
<i>Hipótesis y Objetivos particulares</i>	Pág. 28
Materiales y Métodos	
<i>Animales</i>	Pág. 30
<i>Extracción de semen</i>	Pág. 30
<i>Obtención de plasma seminal</i>	Pág. 32
<i>Técnicas de evaluación de las características espermáticas</i>	Pág. 32
<i>Evaluación de la dinámica folicular</i>	Pág. 40
Objetivo particular 1	
<i>Diseño experimental</i>	Pág. 46
<i>Análisis estadístico</i>	Pág. 47
<i>Resultados</i>	Pág. 48
Objetivo particular 2	
<i>Diseño experimental</i>	Pág. 60
<i>Análisis estadístico</i>	Pág. 62
<i>Resultados</i>	Pág. 63

Objetivo particular 3

Diseño experimental ----- **Pág. 71**

Análisis estadístico ----- **Pág. 72**

Resultados ----- **Pág. 73**

Objetivo particular 4

Diseño experimental ----- **Pág. 78**

Resultados ----- **Pág. 81**

Discusión

Efecto del plasma seminal en espermatozoides de semen fresco de llama ----- **Pág. 84**

Conclusiones objetivo particular 1 ----- **Pág. 90**

Efecto del plasma seminal en espermatozoides criopreservados de llama ----- **Pág. 91**

Conclusiones objetivos particulares 2 y 3 ----- **Pág. 98**

Inseminación artificial con semen criopreservado ----- **Pág. 99**

Conclusiones objetivo particular 4 ----- **Pág. 101**

Conclusiones finales ----- **Pág. 102**

Referencias bibliográficas ----- **Pág. 103**

Abreviaturas

% P	Porcentaje de proteína
AT	Azul de toluidina
BTR	Biotecnologías reproductivas
C	Colesterol
CB	Coomassie blue
CFDA	Diacetato de 6-Carboxifluoresceína
CP	Crioprotector
CSA	Camélidos sudamericanos
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EE	Electroeyacuación
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FIO	Factor inductor de la ovulación
FITC-PNA	Isocianato de Fluoresceína conjugado con aglutinina de <i>Arachis hypogaea</i>
FIV	Fertilización <i>in vitro</i>
GAGs	Glicosaminoglicanos
GL	Glicerol
GnRH	Hormona liberadora de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HG	Halo grande
HM	Halo mediano
HOS	Test de endósmosis
HP	Halo pequeño
HT	HEPES-TALP
IA	Inseminación artificial

ICSI	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
ISAS	Sistema integrado de análisis de semen
LH	Hormona luteinizante
MCF	Microscopio de contraste de fase
MMP-2	Metaloproteinasa-2
MO	Movilidad oscilatoria
MP	Movilidad progresiva
MT	Movilidad total
NOA	Noroeste Argentino
PBS	Solución salina buffer
PI	Ioduro de propidio
PS	Plasma seminal
SCD	Sperm chromatin dispersion assay (Técnica de dispersión de la cromatina espermática)
SH	Sin halo
TrKA	Receptor del β -NGF
TT	Triple tinción
VA	Vagina artificial
β-NGF	Factor de crecimiento nervioso beta

Resumen en español

El plasma seminal (PS) es mucho más que un medio de sostén y nutrición para los espermatozoides y, particularmente en los Camélidos Sudamericanos (CSA) ha demostrado estar implicado en múltiples eventos fisiológicos reproductivos. Es así que, no solo contiene factores involucrados en la inducción de la ovulación en las hembras luego del servicio natural sino que también, está implicado en el momento indicado para el encuentro de las gametas, debido a que participa en la formación de un reservorio espermático. Las particularidades de los eyaculados de estas especies; alta filancia, elevada viscosidad estructural y presencia de movilidad espermática oscilatoria están determinadas por el PS. A pesar de los múltiples reportes acerca del rol del PS en la fisiología reproductiva de estas especies, pueden existir efectos a nivel espermático aún no dilucidados. Los objetivos particulares de la presente tesis fueron: 1- evaluar el efecto de incubar espermatozoides de semen fresco de llama en distintas diluciones de PS, 2- evaluar *in vitro* el efecto de agregar PS a espermatozoides post-descongelados de llama, 3- evaluar *in vitro* el efecto del agregado de PS previo al proceso de criopreservación sobre espermatozoides post-descongelados de llama y 4- obtener preñez con semen congelado de llama.

Los resultados del *objetivo particular 1*, permitieron establecer que el PS modifica el patrón de movilidad de los espermatozoides de semen fresco y a su vez, éste patrón es diferente según la cantidad de PS presente en el medio. Por otro lado, el uso de 100% PS no es capaz de mantener la movilidad y la integridad y funcionalidad de membrana a lo largo de 3 hs de incubación a 37°C. Además, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma presente fue menor en todos los tiempos de incubación en las muestras sin PS (0%). Mientras que, las muestras incubadas con 10 y 50% de PS preservaron dichas características espermáticas a lo largo de la incubación. Los resultados del citado objetivo indicarían que es necesario incorporar un medio de sostén a los espermatozoides de llama además del PS para mantener a los mismos viables y con sus membranas funcionales a lo largo del tiempo. Por otro lado, es necesario agregar cierto porcentaje de PS al medio de incubación para ejercer un rol decapacitante que evite la reacción acrosomal espontánea de los espermatozoides en el tiempo.

Los *objetivos particulares 2 y 3* se desarrollaron en espermatozoides criopreservados de llama, donde se evaluó el agregado de PS (10 y 50%) en forma posterior y en forma previa al proceso de congelamiento, respectivamente. En ambos casos, se observó un descenso significativo en los porcentajes de movilidad espermática, viabilidad (CFDA/PI y FITC-PNA/PI) y funcionalidad de membrana con respecto al semen fresco. A partir de la evaluación con FITC-PNA/PI se determinó que dicho descenso en el porcentaje de espermatozoides vivos ocurrió, en ambos experimentos, a expensas de un incremento en el porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados ($p < 0,05$). También, en ambos objetivos los protocolos de criopreservación utilizados comprometieron la calidad del ADN espermático, observándose daño por fragmentación posdescongelado con respecto al semen fresco. Sin embargo, ambos protocolos no modificaron el grado de condensación de la cromatina espermática. Tampoco, se vio alterada la morfología de los espermatozoides congelados, no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el semen fresco y los protocolos empleados en ambos objetivos particulares. La adición de 10% y 50% de PS (*objetivo particular 2*) al descongelado fue incapaz de preservar la movilidad espermática o mejorar la supervivencia de los espermatozoides congelados-descongelados de llama en el tiempo. A pesar de la rápida pérdida de movilidad después del descongelado, la viabilidad y la funcionalidad de membrana se preservaron a lo largo del tiempo (3 hs). Por otra parte, la adición de PS previo al proceso de congelación de los espermatozoides en las concentraciones finales probadas en la presente tesis (*objetivo particular 3*), con el diluyente base utilizado y la curva de congelamiento profundo empleada, no protegerían del daño por congelamiento ni evitarían la criocapacitación de los espermatozoides de llama.

Al realizar IA con semen congelado a partir de los protocolos desarrollados en la presente tesis no se logró preñez. Estos resultados indican la necesidad de seguir investigando las particularidades fisiológicas de los espermatozoides de llama, así como también, estudiar su comportamiento frente al uso de otros protocolos de congelamiento e incluso frente a la combinación de diferentes crioprotectores (CP). Sería importante determinar la composición de la membrana espermática en estas especies, para vincular sus particularidades con el comportamiento espermático durante la criopreservación.

Resumen en inglés

It has been demonstrated that the role of seminal plasma on sperm physiology is not only to act as a transportation media for spermatozoa and provide nutrition, but a more complex link exists between them, especially in the reproductive physiology of South American Camelids. SP not only contains factors involved in the ovulatory response of the females after natural mating but, due to its role in the formation of the sperm reservoir, it is also involved in the timing of the gametes' encounter. Semen particularities in these species such as; thread formation, high viscosity and the presence of oscillatory motility defined by SP. Despite multiple reports on the role of SP in the reproductive physiology of these species, there could be more effects on spermatozoa that are not yet established. The objectives of this thesis were: 1- evaluate the effect of incubating raw llama sperm with different concentrations of SP; 2- evaluate, *in vitro*, the effect of incubating post-thaw llama spermatozoa with different concentrations of SP; 3- evaluate the *in vitro* effect on llama sperm of adding different percentages of SP prior to the cryopreservation; 4- obtain pregnancies after artificial insemination of cryopreserved llama sperm.

The results of the first objective demonstrated that sperm motility differs according to the quantity of SP present in the media, thus showing that SP is involved in the motility pattern of llama sperm. The use of 100% SP is not able to maintain sperm motility and membrane viability and function over time (3 h). However, a certain percentage of SP is necessary in media to avoid spontaneous acrosome reactions in spermatozoa. In addition, the percentage of sperm with reacted acrosomes was higher in the samples without SP (0%) at all the incubation times. On the other hand, adding 10 and 50% SP to media did not show superiority on preserving sperm characteristic over time (sperm motility, membrane integrity and function and acrosome status). These results could indicate that it is necessary to use a support media in addition to SP to preserve sperm with viable and functional membranes over time. Also, that a certain percentage of SP in the media is necessary to exert a decapacitating role to avoid spontaneous acrosome reactions.

The addition of SP (10 and 50%) prior to and after cryopreservation of llama sperm was evaluated in *objectives 2 and 3* of this thesis. In both cases, a significant decrease in sperm motility, viability (CFDA/PI and FITC-PNA/PI), membrane function and intact acrosomes was observed in all thawed samples (0, 10 and 50% SP) when compared to raw semen. Using the

FITC-PNA/PI stain it was established that the decrease in sperm viability in both experiments, was at the expense of an increase in the percentage of dead, reacted sperm ($p < 0.05$). In addition, a significant increase in sperm with fragmented DNA was observed in thawed samples of both objectives compared to raw semen. Nevertheless, no alteration in chromatin condensation was observed in thawed samples, nor was morphology altered when comparing raw semen and all post-thaw samples (0, 10 and 50% SP).

Post-thaw addition of 10% and 50% seminal plasma (*objective 2*) was unable to preserve sperm motility or improve the survival of llama frozen-thawed spermatozoa. Despite the rapid loss of motility of post-thaw llama spermatozoa, membrane integrity and function were preserved over 3 h of incubation. On the other hand, the addition of SP prior to the freezing of llama spermatozoa (*objective 3*) showed no cryoprotective effect and would not prevent the cryocapacitation of llama sperm. In addition, none of the three cryopreservation protocols evaluated showed superiority over the others in preserving llama sperm characteristics, at least with the freezing curve evaluated in this study.

In this thesis, pregnancies were not obtained when artificial insemination with frozen-thawed semen was performed. These results indicate the need for further research in llama sperm physiology and semen cryopreservation. Different cryopreservation protocols could be assayed, including the combination of diverse cryoprotectants.

It would be important to determine the composition of sperm membranes in these species, as this would throw some light on the behavior observed in cryopreservation and could lead to improvements in current freeze-thawing protocols.

Introducción

Camélidos

Los camélidos son mamíferos pertenecientes al orden *Artiodactyla*, suborden *Tylopoda* y familia *Camelidae*. A su vez, dicha familia está dividida en dos tribus; Camelini y Lamini. A la tribu Camelini pertenecen los camélidos del viejo mundo: el Camello dromedario (*Camelus dromedarius*), camello de una joroba y, el camello bactriano (*Camelus bactrianus*) camello de dos jorobas. Por otro lado, la tribu Lamini está constituida por los Camélidos Sudamericanos (CSA) o camélidos del nuevo mundo, existiendo dos especies silvestres, el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) y dos especies domésticas, la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*) (Pinto y col., 2010). A su vez, dentro de las especies domésticas de los CSA existen diferentes biotipos, en el caso de la alpaca se reconocen dos: las variedades “huacaya” y “suri”, ambas utilizadas tanto para producción de fibra como para consumo de carne. En el caso de la llama, existen también dos biotipos: la variedad “q’ara” utilizada principalmente como productora de carne y animal de carga, y la variedad “chaku” utilizada principalmente para la obtención de fibra. Las poblaciones de CSA en América del Sur se encuentran en Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador y Perú, con una población total cercana a los 9 millones de animales. Son fuente de generación de valiosos productos derivados que dan sustento directo a más de 350.000 familias andinas e involucran en forma indirecta a una población de 2,9 millones de habitantes cuyos ingresos económicos dependen de su explotación. Para la República Argentina, los CSA son especies autóctonas y representan una gran importancia socioeconómica para las comunidades de las provincias del Noroeste andino (NOA), donde alrededor de 3000 familias sostienen su economía con la producción y explotación de estas especies. Según el último censo realizado en el año 2011 por el Ministerio de Agricultura y Pesca de la Nación, la población de CSA del país está formada por alrededor de 200.000 llamas, 600.000 guanacos y 127.000 vicuñas, siendo muy baja la cantidad de alpacas que habitan en la Argentina. La crianza de estas especies está en manos de pequeños y medianos productores que habitan en el NOA, pero hay un creciente interés en el resto del territorio. Este incremento se gesta en parte por un aumento en la demanda de productos naturales y por la visibilización de las aptitudes productivas de estas especies. Existen diversas cualidades de los CSA que los convierten en animales de producción sustentable y con un bajo impacto ambiental. Las

características de alimentación, específicamente la forma de prehensión de los pastos y la presencia de almohadillas plantares en sus miembros evitan la erosión y posterior desertificación de los suelos. Esto ha demostrado ser una gran ventaja frente a las especies de explotaciones convencionales como los ovinos y caprinos. Por otro lado, los CSA permiten la obtención de productos alimenticios cárnicos de elevado valor biológico a partir del aprovechamiento de forrajes de baja calidad y bajo valor nutricional, permitiendo la explotación de zonas de climas extremos y la obtención de productos en áreas donde otras especies no podrían ser explotadas. Actualmente hay un mayor interés hacia los CSA, llevando a la revalorización de los mismos, tanto en regiones poco productivas como en zonas diferentes a las altoandinas, donde constituyen una alternativa de baja inversión y con capacidad de combinación con otras especies productivas, como es el caso de la ganadería bovina. Consecuentemente se hace necesario el uso de estrategias reproductivas tendientes a mejorar la producción de los rodeos y la genética de futuros reproductores. Para lograr dicho objetivo es necesario ampliar el conocimiento que actualmente se tiene acerca de la fisiología espermática y proyectar los mismos en la aplicación de biotecnologías reproductivas (BTR).

Características productivas de los Camélidos Sudamericanos

Dentro de los recursos productivos que se obtienen de la explotación de los CSA podemos encontrar la fibra, los productos cárnicos y los cueros. La fibra de los CSA varía según la especie, tanto en el rendimiento obtenido por animal como en las características cualitativas de la misma. Alrededor de 90.000 kilos de fibra de llama son producidos anualmente en el país; menores cantidades se obtienen en la esquila de guanacos y vicuñas, 2100 kg y 500 kg de fibra, respectivamente (Mueller y col., 2010). Este reporte menciona que sólo el 30% de las llamas del país son esquiladas anualmente, dejando implícito el gran potencial que existe en la obtención de fibra de estos animales. La producción media de fibra en la llama es de 1,5 kg de vellón por animal cuando se realiza esquila anual y un promedio de 2,2 kg de vellón considerando todas las esquilas en la vida útil de un individuo (Frank E., 1999). En cuanto al diámetro de la fibra, alrededor de la mitad de las llamas del país poseen valores medios entre 21,9 y 24,9 μm (Frank E., 1999). Cerca del 80% de las fibras obtenidas de llamas del NOA se categorizan como fibras de calidad superfina o fina, lo que permite que sean valorizadas en forma superior al momento de las ventas. La caracterización de las poblaciones de llamas del

NOA en cuanto a categorías de fibra y su correspondiente valor en el mercado se encuentran detalladas en la **Tabla 1** (Frank E., 2017).

Tabla 1. Composición de la población de llamas del NOA según su diámetro (μm) y frecuencia de ocurrencia (%), con su correspondiente valor económico en el mercado (u\$s/Kg de fibra sucia).

Categoría	Diámetro promedio (μm)	Frecuencia (%)	Valores (u\$s/kg)
Baby	<19	4,6	-
Superfino	19 - 21,9	43,4	3,7
Fino	22 - 24,9	35,8	2,5
Medio	25 - 29	13,6	1,2
Grueso	>30	2,6	0,6

Frank E., 2017.

En cuanto a las fibras obtenidas de los CSA silvestres, la fibra de vicuña es una de las más deseadas en el mercado internacional y las prendas fabricadas con la misma son de elevado valor comercial. En nuestro país, la media del diámetro de la fibra de guanaco varía de 15 a 17 μm y entre 12 y 14 μm en la vicuña, estando esta última a la par de las fibras máspreciadas a nivel internacional como la fibra de Cachemir (Frank E., 2017). La finura de la fibra de camélidos es directamente proporcional al valor de la misma en el mercado, obteniéndose en promedio u\$s180 por kilo de fibra de guanaco y u\$s 661 por Kg de vellón de vicuña, en ambos casos son los valores de fibra sucia sin procesar (Frank E., 2017).

La producción de carne de llama está concentrada en las provincias de Jujuy, Salta y Catamarca. La mayor parte de la faena se realiza en los propios establecimientos productivos y en algunos casos existen mataderos municipales que realizan este trabajo con inspección bromatológica, pero esta metodología representa un bajo porcentaje (FAO, 2005). La carne de los CSA es de calidad superior comparada con la carne obtenida de las especies de producción convencional. Es importante destacar que la carne de llama es una de las principales fuentes de proteína de elevado valor biológico para las comunidades del norte argentino. Se caracteriza por tener mayor porcentaje de proteína y menor porcentaje de colesterol, haciendo que sea más saludable y acorde con la tendencia creciente de la demanda en el mercado alimenticio. Al

comparar la carne de diferentes especies podemos observar que en la llama posee un valor medio de proteína (%P) de 23,9% y 39 mg de colesterol (C) cada 100 gr de carne (Mamani-Linares y Gallo, 2013). Estos valores difieren de los presentes en otras especies de consumo: bovino (22,4% P y 49,7 mg/100 g; Cifuni y col., 2004); ovino (18,8% P y 66,9 mg/100 g; Costa y col., 2009) y caprino (20,8% P y 56,6 mg/100 g; Madruga y col., 2009). También existen diferencias en cuanto a la composición de minerales entre especies, aportando la carne de llama mayor cantidad de magnesio, potasio y hierro que la carne ovina y mayor aporte de fósforo y zinc que la carne bovina (Mamani-Linares y col., 2014, *review*).

Características reproductivas de la hembra de CSA

Según la región que habiten las hembras de CSA el comportamiento reproductivo es diferente a lo largo del año. En las zonas altoandinas tienen una estacionalidad estival, la época reproductiva coincide con la época de lluvias y la mayor disponibilidad forrajera (noviembre a marzo), permitiendo así que las crías nazcan en verano, cuando la sobrevida de las mismas es mayor. Mientras que, en regiones con mayor oferta forrajera, como por ejemplo la llanura pampeana, se comportan en forma no estacional con desarrollo folicular durante todo el año. Demostrando que, la actividad ovárica en estas especies está limitada principalmente por la restricción nutricional y además, por las temperaturas ambientales. Por otra parte, los CSA son especies monotocas, poseen gestaciones de un solo individuo con una duración variable dependiendo de la especie. En la llama, la duración de la gestación varía entre 335 y 360 días (Johnson L.W., 1989; Leon y col., 1990).

La dinámica ovárica se caracteriza por presentar ondas foliculares sucesivas con tres fases diferentes: crecimiento, estática y regresión, generando, en cada onda, un folículo dominante y varios folículos subordinados. Chaves y col., (2002) observaron que la duración promedio de la onda folicular en la llama es de $22,6 \pm 2,5$ días, con una fase de crecimiento de $9,2 \pm 2,8$ días, una estática de $5,2 \pm 1,4$ días y una de regresión de $8,2 \pm 2,2$ días. El intervalo entre ondas es de $18,0 \pm 2,6$ días, lo que implica que cuando un folículo se encuentra en regresión existe una nueva onda folicular emergiendo. Estos autores también observaron que la alternancia de los folículos dominantes es similar en ambos ovarios y que la concentración hormonal de

estrógenos presenta correlación con el tamaño folicular presente en los ovarios (Chaves y col., 2002).

La cópula es necesaria para que ocurra la liberación de hormona luteinizante (LH) (Aba y col., 1995) y la consecuente ovulación del folículo dominante, determinando esto que las hembras de CSA se clasifiquen como especies de ovulación inducida (San Martín y col., 1968; England y col., 1969; Urquieta y col., 1995; Gibbons y col., 1996). En la llama, la ovulación se produce en presencia de folículos que miden de 7 a 12 mm de diámetro, tamaño considerado preovulatorio en esta especie. Los estímulos que desencadenan la liberación de LH son: intromisión, penetración del cérvix y acción mecánica del pene en el tracto reproductor de la hembra, estimulación auditiva (mediante un sonido gutural que produce el macho durante el servicio) y la presencia de un factor inductor de la ovulación (FIO) de naturaleza proteica presente en el PS (Adams y Ratto, 2013, *review*). Luego del servicio natural, la ovulación se produce entre las 24 y 48 hs posteriores al mismo. La misma puede también ser inducida con la administración exógena de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o gonadotropina coriónica humana (hCG), produciéndose alrededor de las $28,6 \pm 0,36$ horas post-administración (Bourke y col., 1992). En investigaciones más recientes en alpacas, se identificó al FIO como un factor de crecimiento nervioso beta (β -NGF), logrando una efectividad similar a los análogos de GnRH respecto a los porcentajes de ovulación cuando se administra IM (Kershaw-Young y col., 2012a). Por otra parte, estudios actuales determinaron que el servicio natural es capaz de modificar el ambiente del oviducto en la llama ya que, niveles significativamente mayores de enzima metaloproteinasa-2 (MMP-2) se detectaron en el fluido oviductal de hembras servidas *versus* hembras no servidas (Zampini y col., 2018).

Anatomía de los órganos reproductivos del macho de CSA

En los machos de CSA el saco escrotal se encuentra en la región perineal (a nivel del arco isquiático), es de forma ovoide y no pendular (sin un cuello definido), ubicándose muy cerca del cuerpo. En el macho de llama se encuentra cubierto por la cola a una distancia de 5 a 9 cm del ano. Los testículos son de forma ovoide y su eje longitudinal mayor posee una dirección craneoventral. Poseen un tamaño pequeño con respecto al tamaño corporal del macho adulto (0,02 – 0,03% de peso vivo) y es mucho menor en comparación con otras especies domésticas.

El largo y ancho testicular promedio para machos de llama maduros es de 5,4 y 3,3 cm, respectivamente (Tibary y Vaughan, 2006, *review*). El prepucio se ubica en ventral del abdomen y se caracteriza por ser de forma triangular, péndulo y posee gran movilidad debido a la presencia de músculos prepuciales muy desarrollados. El pene es de tipo fibroelástico y presenta una flexura sigmoidea pre-escrotal, siendo su largo promedio sin erección de 35 a 45 cm desde el arco isquiático hasta la punta del pene (Fowler M., 1998). El diámetro varía entre 0,8 a 1 cm en distal y 1,2 a 2 cm en la base del arco isquiático (Johnson L.W., 1989) y el tamaño del mismo no se modifica considerablemente durante la erección (Sumar J., 1991). Existen dos procesos ubicados en el glande del pene que son particulares en estas especies. El primero, proceso uretral, de forma cónica, de aproximadamente 1 cm de largo, se encuentra en relación con el orificio uretral. El segundo, el proceso cartilaginoso, es una proyección de tejido firme con una curvatura en sentido horario. Este último, mediante movimientos de rotación y de empuje que realiza el pene durante el servicio, permite enhebrar los anillos del cérvix y así, eyacular en forma intrauterina profunda en el extremo craneal de ambos cuernos uterinos (Brown B.W., 2000, *review*).

Los machos de CSA poseen como glándulas sexuales accesorias la próstata y las glándulas bulbouretrales, no estando presentes las glándulas vesiculares. La próstata es una glándula impar que se encuentra a nivel del cuello vesical cubriendo la uretra pelviana y posee un tamaño aproximado de 3 x 3 x 2 cm en el macho de llama (Fowler M., 1998). Trabajos recientes determinaron que el β -NGF sería sintetizado primariamente en la próstata, debido a la detección inmunohistoquímica de grandes cantidades de dicha proteína en esta glándula sexual accesoria del macho de llama (Sari y col., 2018). Por otro lado, las glándulas bulbouretrales son glándulas pares, esféricas que se ubican a los lados de la uretra pélvica en una posición mucho más caudal y en la llama poseen un tamaño promedio de 1 a 1,7 cm de diámetro (Fowler M., 1998). Se ha determinado que la Mucina-5B es el componente proteico del PS responsable de la filancia característica de los eyaculados de los CSA y que, sería aportado al eyaculado por las glándulas bulbouretrales (Kershaw-Young and Maxwell., 2012c).

Características reproductivas del macho de CSA

La cópula en estas especies se realiza en decúbito esternal, momento en que el macho se sienta sobre la grupa de la hembra abrazándola con los miembros anteriores. La duración del

servicio varía entre unos pocos minutos a más de 1 hora y está influenciada por la edad de los machos, la frecuencia (número de servicios) y la presencia de otros machos, y no presentaría relación con el porcentaje de preñez (Vaughan, 2001). La eyaculación es intermitente, prolongada y sin fracciones, siendo el semen depositado en proximidad a la papila de la unión útero tubárica (Brown B.W., 2000, *review*). Las particularidades del servicio en los CSA han demostrado ser desventajas al momento de la extracción de semen mediante vagina artificial debido al prolongado tiempo de trabajo en la colecta de semen, comprometiendo de esta manera, la calidad seminal de las muestras obtenidas (Giuliano y col., 2008).

El eyaculado de los CSA se caracteriza por presentar baja concentración espermática, bajo volumen y, por lo tanto, bajo número total de espermatozoides. Una característica muy importante y particular es que los espermatozoides del semen fresco de estas especies presentan un patrón oscilatorio de movilidad con ausencia o muy bajo porcentaje de movilidad progresiva (MP) (Lichtenwalner y col., 1996; von Baer y Hellemann, 1998; Bravo y col., 1999; Vaughan y col., 2003; Giuliano y col., 2008; 2010). Esto impide la evaluación de la calidad de los eyaculados a través de la estimación de dicho parámetro seminal como se realiza en otras especies domésticas, ya que es posible observar espermatozoides vivos e inmóviles (Giuliano y col., 2008; Fumuso y col., 2018). El eyaculado de estas especies presenta también otras particularidades únicas como la presencia de filancia, definida como la capacidad de formar un hilo de extensión variable cuando la muestra es pipeteada durante su manipulación (Giuliano y col., 2010). Otra característica es su elevada viscosidad estructural, que fue determinada como una variable independiente de la presencia o no de filancia en muestras de semen fresco de llama (Casaretto y col., 2012). Ambas características reológicas dificultan la manipulación de los eyaculados e incluso, pueden producir efectos negativos en las muestras debido al mayor tiempo de procesamiento de las mismas, que actúa en detrimento de la calidad espermática. Contrario a lo que sucede en el humano (Dunn y col., 1977), la desaparición de la filancia del semen de CSA no ocurre luego de la incubación del mismo durante 30 hs a 37 °C o a temperatura ambiente (Apichela y col., 2006) o demora mucho tiempo (24-48 hs) (Garnica y col., 1993). Por esta razón, con el fin de facilitar la manipulación de las muestras, acelerar el procesamiento de las mismas y realizar diversos experimentos, se han utilizado diferentes tratamientos para eliminar la filancia de los eyaculados. El uso de diversas enzimas ha sido empleado tanto en camélidos sudamericanos como en camellos dromedarios, con diferentes

resultados sobre las características espermáticas (Bravo y col., 2000; Giuliano y col., 2010; Kershaw-Young y col., 2013; 2017; El-Bahrawy, K. A. 2017; Zampini y col., 2018). Kershaw-Young y col. (2013) compararon el uso de enzimas proteolíticas *versus* enzimas que actúan degradando glicosaminoglicanos (GAGs) sobre la formación de hilo y las características espermáticas de las muestras tratadas. Dichos autores determinaron que la filancia sería una característica seminal de los eyaculados de los camélidos generada por los componentes proteicos del PS y no por los GAGs presentes en el mismo. Esta conclusión fue alcanzada debido a que enzimas como la hialuronidasa, condroitinquinasa ABC y keratanasa, con sitio blanco sobre los GAGs del PS, tuvieron una acción limitada sobre la formación de hilo en eyaculados de alpaca incubados en el tiempo. Mientras que, el uso de enzimas proteolíticas como la papaína y la proteínquinasa K eliminaron en forma completa dicha característica en los eyaculados de alpaca a los 60 y 120 minutos de incubación, respectivamente. En semen de camello dromedario también se ha sido estudiado el efecto de enzimas tanto proteolíticas (papaína y bromelina) como enzimas hidrolíticas (α -amilasa) sobre la filancia seminal (Monaco y col., 2016). Estos autores observaron resultados similares a los hallados en alpaca, siendo la papaína la enzima más eficiente para eliminar en forma completa la formación de hilo de los eyaculados.

Además de los tratamientos enzimáticos, se han utilizado otras herramientas con el objetivo de disminuir la filancia de los eyaculados de los CSA y de los camélidos del viejo mundo. En alpacas, se ha evaluado la simple dilución del semen fresco con diferentes medios como único tratamiento para eliminar la filancia, observando el descenso de la misma a los 15 minutos de realizada la dilución (Huanca y col., 2015). Dichos autores observaron efectos deletéreos en la movilidad, viabilidad y la funcionalidad de membrana espermática según el medio empleado. En camellos dromedarios, se han combinado la dilución de la muestra de semen fresco con la posterior aspiración mediante jeringas estériles a temperatura ambiente durante periodos de 30 a 60 minutos, observando una reducción de la filancia sin compromiso de la movilidad espermática ni del estado acrosomal (Malo y col., 2016).

En los CSA, el PS no sólo presenta singularidades estructurales como se ha mencionado previamente, sino que también posee particularidades a nivel bioquímico. Distintos estudios determinaron que la composición bioquímica del PS de los CSA difiere a la observada en el toro y en el carnero, teniendo una menor cantidad de fructosa, ácido cítrico y una mayor cantidad

de glicosaminoglicanos (Kershaw-Young y Maxwell, 2012; Kershaw-Young y col., 2012b). A su vez, se establecieron similitudes y diferencias en la proteómica del PS entre diferentes especies domésticas (Druart y col., 2013). Estos autores observaron que el principal componente proteico del PS, tanto en la alpaca como en el dromedario, es el β -NGF, el cual conforma el 47% y 24% de la composición proteica del PS de estas especies, respectivamente. Este factor que se pensaba presente solo en el PS de especies de ovulación inducida también se encontró en el PS de especies de ovulación espontánea como el equino, bovino y carnero (Druart y col., 2013). A continuación, en la **Tabla 2** se detallan los principales hallazgos en la proteómica del PS de los camélidos con respecto a otras especies domésticas como el equino, porcino, bovino y pequeños rumiantes.

Tabla 2. Comparación de composición proteica en el PS de los Camélidos y diferentes especies domésticas (Druart y col., 2013). La presencia de una casilla negra confirma la presencia de la proteína en el PS de la respectiva especie.

<i>Proteína</i>	<i>Bovino</i>	<i>Equino</i>	<i>Porcino</i>	<i>Ovino</i>	<i>Caprino</i>	<i>Alpaca</i>	<i>Camello</i>
β -NGF	■	■	□	■	□	■	■
Nucleobindina-1	■	■	■	■	■	■	■
Nucleobindina-2	■	■	□	■	■	■	■
RSVP-14	■	■	■	■	■	■	■
Lactoferrina	□	■	■	■	■	■	■
Bioadhesina-2	□	■	□	■	■	■	■
Zinc- α -2-glicoproteína	□	□	□	■	■	■	■
Calmodulina	■	□	■	■	■	□	■
α -L-Fucosidasa	■	□	□	■	□	□	■
β -Glactosidasa	□	□	□	■	■	□	■
Sulfidriloxidasa-1	■	■	■	□	□	■	□
β -Actina	□	□	■	□	■	□	■

Las implicancias del PS en la fisiología espermática de los camélidos siguen descubriéndose y cabe destacar que son múltiples. Zampini y col. (2017) determinaron que la proteína SL15 perteneciente a la familia de las lecitinas se encuentra en el PS de la llama y podría ser la responsable de la formación del reservorio espermático al unirse a la N-acetilgalactosamina presente en el epitelio oviductal (Apichela y col., 2014). También, Sari y col. (2018) determinaron que el factor proteico, β -NGF presente en el PS no solo estaría implicado en el proceso de ovulación de las hembras de camélidos, sino que también, podría jugar un rol sobre el espermatozoide de llama. Dichos autores confirmaron mediante inmunohistoquímica la presencia del receptor del factor β -NGF (TrKA) tanto en espermatozoides epidídimarios como en espermatozoides provenientes de eyaculados de llama. Sin embargo, sólo observaron la unión del β -NGF en la pieza media de los espermatozoides de eyaculado, estando ausente en los epidídimarios, indicando que dicho factor es aportado por el PS durante la eyaculación. Además, la presencia de receptores TrKA en la pieza intermedia, sitio de localización de las mitocondrias, podría sugerir la participación del β -NGF en el patrón de movilidad oscilatorio característico del espermatozoide de eyaculado de llama (Sari y col., 2018) y posiblemente del resto los camélidos.

Por todo lo anteriormente mencionado, queda en evidencia el importante rol que juega el PS dentro de la fisiología reproductiva de estas especies y el valor de seguir investigando las posibles implicancias del mismo en los diversos aspectos de la fisiología espermática.

Métodos de extracción de semen en los CSA

En la actualidad, se utilizan diferentes métodos de extracción de semen en los CSA, pero las dos metodologías más empleadas son la vagina artificial (VA) y la electroeyaculación (EE). Giuliano y col. (2008) demostraron múltiples ventajas de la EE con respecto a la VA en cuanto a la calidad seminal de las muestras obtenidas en semen de llama. Los eyaculados obtenidos por EE presentaron mayor volumen, movilidad e integridad espermática y menor porcentaje de anomalías de cabeza, respecto a los eyaculados obtenidos por VA. Por otra parte, esta metodología permite obtener muestras en alpaca (Carretero y col., 2010a), así como también, en especies silvestres donde no es posible la cooperación del macho para la extracción mediante VA (Giuliano y col., 2009; Carretero y col., 2010b). Dado que con la EE se obtuvieron preñeces con semen refrigerado (Giuliano y col., 2012a) y embriones tanto por fertilización *in*

vitro (FIV) (Trasorras y col., 2012; 2013) como por la técnica de inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI) (Conde y col., 2008) se infiere que mediante EE se pueden obtener eyaculados potencialmente fértiles sin necesidad de la cooperación del macho. Por otra parte, a diferencia de la VA los eyaculados obtenidos por EE son libres de espuma y están menos contaminados (Giuliano y col., 2008).

Otros métodos que permiten la obtención de muestras de CSA son el uso de esponjas y fundas intravaginales que se colocan en el tracto reproductor de una hembra y luego del servicio natural se recupera la muestra de las mismas (Director y col., 2004). La aspiración poscoital, es una metodología utilizada ampliamente a campo en Perú, en la cual la muestra se recolecta desde el fondo de vagina mediante aspiración luego del servicio natural (Alarcón y col., 2012). Cabe aclarar que las metodologías anteriormente mencionadas, poseen gran cantidad de desventajas: incomodidad del macho durante el servicio, alargamiento del mismo producto de dicha incomodidad, eyaculación incompleta y posibles heridas que pueden causarse en el pene del macho (Director y col., 2004). Además, esta reportada la alteración de la calidad y contaminación de las muestras con eritrocitos y secreciones vaginales (Alarcón y col., 2012). Por otro lado, el uso de las muestras obtenidas con dichas metodologías para la IA posee el riesgo de transmisión de patógenos entre animales.

Existen también otros métodos que permiten la obtención de espermatozoides de CSA como son, el desvío de los conductos deferentes (Meza y col., 2018) y el corte de epidídimos provenientes de testículos de matadero (Del Campo y col., 1994).

Biotechnologías reproductivas en CSA

En los últimos años se han realizado nuevos avances en el uso de biotechnologías reproductivas (BTR) en los CSA. En cuanto a las hembras, la transferencia de embriones es la BTR más utilizada e instaurada para el mejoramiento genético a través del manejo reproductivo en estas especies (Sumar J., 2013). Para ello, se han utilizado tratamientos de superestimulación ovárica con el objetivo de maximizar la utilización de las hembras y aprovechar su capacidad de producir múltiples folículos, obteniendo resultados satisfactorios (Trasorras y col., 2009). Estos tratamientos permiten obtener varios embriones (tanto *in vivo* como *in vitro*) a partir de una hembra donante (Carretero y col., 2010c; Trasorras y col., 2014).

Con respecto a la producción de embriones *in vitro*, se han utilizado diversas metodologías de obtención de ovocitos, como la aspiración o disección de folículos de ovarios provenientes de faena (Del Campo y col., 1994; Ratto y col., 2005), la aspiración de folículos luego de la exposición quirúrgica del ovario mediante laparotomía por el flanco (*llamas*: Miragaya y col., 2002, Trasorras y col., 2009; *alpacas*: Ratto y col., 2007) y la aspiración folicular guiada por ultrasonografía vía transvaginal (Brogliatti y col., 1996, 2000; Ratto y col., 2002; Berland y col., 2011). En la llama, se han obtenido embriones tanto a través del uso de la fertilización *in vitro* como mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides con resultados satisfactorios (Conde y col., 2008; Trasorras y col., 2013), logrando preñeces con embriones obtenidos mediante FIV a partir de gametas de animales vivos (Trasorras y col., 2014). Sin embargo, los resultados al utilizar estas técnicas de reproducción asistida son bajos y por ello, no tienen aún una aplicación comercial.

En cuanto a la criopreservación de embriones existen pocos reportes que hayan utilizado dicha BTR en llama y sus resultados han sido variables. Los trabajos publicados por Aller y col. (2002) y Taylor y col. (2006) reportaron un 50% y un 67% de preñez respectivamente, al transferir embriones vitrificados de llama. Por otro lado, von Baer y col. (2002) no obtuvieron preñeces en llamas al realizar la transferencia de dos embriones vitrificados. La criopreservación de embriones es en la actualidad uno de los ámbitos de investigación más activos en la hembra de CSA.

En cuanto a las BTR del macho de CSA, la inseminación artificial (IA) está limitada al uso de semen fresco con una tasa de preñez máxima del 77% en centros experimentales y de no más del 50% en criaderos particulares (Huanca y col., 2007). En el caso de los camellos dromedarios, los índices de preñez con semen fresco también son desalentadores siendo aún inferiores a los obtenidos en CSA (menores al 53%) (Skidmore y col., 2006).

Utilizando semen congelado de llama y alpaca e inseminando a tiempo fijo (24 hs pos-inducción de la ovulación) se han obtenido hasta el momento tasas de preñez del 26% (Bravo y col., 2000), 7% (Aller y col., 2003) y 0% (Vaughan y col., 2003), no considerándose estos resultados aceptables para la aplicación masiva de dicha biotecnología. Existe un reporte en llamas que estableció la necesidad de realizar la IA post-detección de la ovulación para lograr preñeces con semen refrigerado (Giuliano y col., 2012a). Dicho trabajo obtuvo un 23% de preñez realizando el seguimiento de la dinámica folicular, la inducción de la ovulación

mediante 8 µg de buserelina vía endovenosa hasta la detección de la misma, momento en el que se procedía con la IA (inseminación sobre ovulación). La relación del momento de ovulación y la IA también se ha considerado un tema relevante de investigación en los camélidos del viejo mundo, observando que cuanto más corto es el tiempo entre la inducción de la ovulación y la inseminación se obtienen mejores índices de preñez (Skidmore y col., 2006).

Hasta el momento, la mayoría de los estudios realizados sobre criopreservación de semen en camélidos se han centrado en la estandarización de las distintas variables de los protocolos. Con respecto a los crioprotectores (CP), el glicerol ha sido prácticamente el único crioprotector empleado, utilizándose al 6-7% en los protocolos de CSA y a diferentes concentraciones finales en el caso del camello dromedario (3 a 6%) (**CSA:** Bravo y col., 2000; Aller y col., 2003; Vaughan y col., 2003; Santiani y col., 2005; Morton y col., 2010; **Camellos:** Malo y col., 2018; 2019; El-Barahwy K.A y col., 2017). El uso de CP diferentes al glicerol (GL) y, la evaluación de la calidad espermática posdescongelado se está investigando activamente en camélidos. En menor medida se ha probado el etilenglicol en alpacas y camellos (Santiani y col., 2005; 2013; Malo y col., 2017; El-Badry y col., 2017) y también las amidas, habiéndose evaluado el efecto de la dimetilformamida (DMF) en llamas (Santa Cruz y col., 2012; Carretero y col., 2015a; 2017a) y, la DMF y metilformamida en camellos (Malo y col., 2017; El-Badry y col., 2017). Actualmente, uno de los focos de estudio más activos sigue siendo la determinación del efecto de distintos CP y las diferentes concentraciones finales de los mismos. Morton y col. (2010), trabajaron con espermatozoides de epidídimo de alpaca evaluando el efecto de distintas concentraciones de GL sobre la calidad espermática luego del descongelado. Estos autores observaron que la concentración final de glicerol entre 3 a 4% con el uso de Equex STM® en el medio de criopreservación, mantuvo mejores porcentajes de espermatozoides móviles y con acrosomas intactos comparado con menores porcentajes de dicho CP en ausencia de Equex STM®. Carretero y col. (2015a; 2017a) presentaron varios reportes analizando el efecto de diferentes protocolos de criopreservación en semen de llama. Estos autores encontraron que el uso de GL al 7% es nocivo y causa daño por fragmentación del ADN espermático, mientras que la DMF al 7% preserva dicha característica. En dicho estudio, las muestras fueron congeladas en presencia de colagenasa para facilitar el envasado de las pajuelas (Carretero y col., 2015a). Posteriormente, los mismos autores compararon muestras

que fueron congeladas en presencia de colagenasa y PS, *versus* otras que se centrifugaron para descartar la enzima y el plasma, congelando estas últimas sólo con el diluyente de criopreservación (Carretero y col., 2017a). Los resultados encontrados en este estudio no mostraron diferencias significativas en las diferentes variables espermáticas analizadas entre las muestras congeladas en presencia de PS y enzima respecto de aquellas congeladas sin PS y sin enzima (Carretero y col., 2017a). En el caso de los camélidos del viejo mundo también se ha evaluado el uso de diferentes concentraciones finales de GL y su efecto en la calidad espermática luego del congelado-descongelado de las muestras. Los trabajos realizados por Malo y col. (2017) en dromedario como por Niasari-Naslaji y col. (2007) en camello bactriano, observaron que cuando la concentración final de glicerol utilizada es superior al 6% existe un efecto deletéreo sobre los espermatozoides descongelados.

Otra de las áreas de estudio ha sido la búsqueda de un diluyente apto para la criopreservación de espermatozoides de camélidos. En CSA, existen reportes tanto en la alpaca como en la llama, en los que se evaluaron diferentes medios de criopreservación sobre distintas características espermáticas. Se ha llegado a la conclusión, que los medios de dilución que conservan mejor las características espermáticas son aquellos formulados a base de lactosa (**alpaca**: Morton y col., 2007; **llama**: Giuliano y col., 2012a). En el caso de los camellos, se han probado diluyentes a base de diferentes sacáridos, y se determinó que el diluyente a base de Tris-buffer-glucosa demostró ser superior que aquellos a base de lactosa o sacarosa (Niasari-Naslaji y col., 2006).

También, ha sido tema de estudio la aplicación de diferentes temperaturas de equilibramiento y curvas de congelamiento sobre la viabilidad, movilidad espermática y calidad del ADN espermático en estas especies (Carretero y col., 2015a). Estos autores determinaron que la sobrevida espermática era superior cuando las muestras eran equilibradas a 5 °C y congeladas utilizando una curva de congelamiento rápida, indistintamente del crioprotector utilizado (DMF o GL). A pesar de ello, la integridad del ADN y el porcentaje de movilidad espermática fueron superiores al utilizar la DMF como CP (Carretero y col., 2015a). En camello dromedario, se ha evaluado el impacto de diferentes tiempos de equilibramiento en la calidad espermática al descongelado. Es así que, Malo y col. (2017) compararon el efecto de 10, 30, 60 y 120 minutos de equilibramiento a 5 °C sin observar diferencias en la calidad espermática entre los distintos tiempos evaluados.

El efecto del PS en la fisiología espermática tanto en semen fresco como criopreservado ha sido estudiado en diversas especies y se han determinado resultados tanto beneficiosos como nocivos sobre los espermatozoides (*conejo*: Castellini y col., 2000; *porcino*: Suzuki y col., 2002; *equino*: Heise y col., 2011; Barrier-Battut y col., 2013; *carnero*: Fernández-Gago y col., 2013). En alpacas, Kershaw-Young y Maxwell (2011) evaluaron el efecto del PS en espermatozoides de semen fresco y observaron que una concentración final de 10% de PS conservaba la movilidad, preservaba la integridad acrosómica y mantenía la viabilidad de los espermatozoides. Hasta la presente tesis, no se ha estudiado el efecto de incubar espermatozoides de semen fresco de llama en distintas diluciones de PS. Con respecto a la criopreservación de semen, la mayoría de los protocolos de criopreservación de semen utilizados en CSA no remueven el PS durante el procesamiento de las muestras, es decir el diluyente es agregado al eyaculado completo (Bravo y col., 2000; Aller y col., 2003; Vaughan y col., 2003; Santiani y col., 2005; Giuliano y col., 2012a; Carretero y col., 2015a). Existen reportes que mencionan la dificultad en la homogeneización de las muestras diluidas y a su vez, el problema en el envasado de las pajuelas debido a las características inherentes a los eyaculados de los CSA, mencionadas previamente. Además, estas características del PS podrían interferir con la llegada y consiguiente entrada de los CP a los espermatozoides. En algunas especies como la equina, el PS es removido previo a la criopreservación de las muestras (Miragaya y col., 2001). El congelamiento de espermatozoides de CSA en ausencia de PS facilitaría la manipulación de las muestras previo al congelamiento y podría ser una alternativa en estas especies. Sin embargo, hasta el momento existe un único reporte en el que se congelan espermatozoides de llama en ausencia de PS (Carretero y col., 2017a). Como se mencionó previamente, en dicho estudio se utilizó la incubación del semen con colagenasa para poder obtener el pellet de espermatozoides. Esto se debe a que, debido a las características reológicas de los eyaculados de estas especies, no es posible separar los espermatozoides del PS sino se utiliza un tratamiento enzimático previo (Giuliano y col., 2010) o la centrifugación a alta velocidad (Kershaw - Young y Maxwell 2011; Fumuso y col., 2018). Otro aspecto por considerar es que el PS de los CSA juega un rol importante en la fisiología reproductiva de dichas especies debido a la presencia del FIO (Ratto y col., 2005) capaz de inducir ovulación en hembras de alpaca cuando es administrado por vía intramuscular y/o por vía intrauterina. Por otra parte, Apichela y col. (2014) determinaron que el PS participa en la formación de

reservorios espermáticos en el oviducto de la hembra de llama, por lo tanto, la dilución o el tratamiento enzimático, así como la ausencia o presencia del mismo podría ser un factor importante a tener en cuenta al desarrollar protocolos de criopreservación de semen.

Debido a los escasos reportes sobre el tema y a la complejidad del semen en estas especies, los conocimientos del efecto del PS sobre los espermatozoides de CSA continúa siendo uno de los aspectos de la fisiología espermática que requiere mayor investigación en la actualidad. Por otro lado, los bajos porcentajes de preñez obtenidos con semen criopreservado indicarían que los espermatozoides de estas especies sufren un deterioro en su capacidad fertilizante durante el congelamiento, porque a pesar de que se insemine igual cantidad de espermatozoides viables y móviles que cuando se utiliza semen fresco, se obtienen muy bajos porcentajes de preñez. Los objetivos de la presente tesis plantearon la evaluación del efecto del PS en espermatozoides de semen fresco y criopreservado de llama. A su vez, el desarrollo de la tesis tuvo también como objetivo la realización de una prueba biológica mediante la IA de hembras de llama con el protocolo de criopreservación más eficiente.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis General

El plasma seminal es necesario para mantener la capacidad fertilizante del espermatozoide criopreservado de llama (*Llama glama*).

Objetivo general

Estudiar el efecto que ejerce el plasma seminal sobre la capacidad fertilizante de espermatozoides criopreservados de llama (*Lama glama*) con el fin de mejorar los actuales porcentajes de preñez con semen criopreservado.

Hipótesis particular 1

El plasma seminal modifica el patrón de movilidad y preserva la viabilidad, la funcionalidad de membrana y la integridad acrosomal del espermatozoide fresco de llama.

Objetivo particular 1

Evaluar el efecto de incubar espermatozoides frescos de llama en distintas diluciones de plasma seminal.

Hipótesis particular 2

El agregado de plasma seminal modifica características del espermatozoide congelado-descongelado de llama.

Objetivo particular 2

Evaluar *in vitro* el efecto de agregar plasma seminal a espermatozoides post-descongelados de llama.

Hipótesis particular 3

El agregado de plasma seminal a espermatozoides de llama previo al proceso de criopreservación modifica características espermáticas pos-descongelado.

Objetivo particular 3

Evaluar *in vitro* el efecto del agregado de plasma seminal previo al proceso de criopreservación sobre espermatozoides post-descongelados de llama.

Hipótesis particular 4

Es posible obtener preñez mediante inseminación artificial utilizando semen congelado de llama.

Objetivo particular 4

Obtener preñez con semen congelado de llama.

Materiales y Métodos

ANIMALES

Se trabajó con machos adultos de llama (*Lama glama*) de 7 a 14 años de edad en correcto estado de salud, con un peso de $136,5 \pm 14,1$ kg (promedio \pm DE) y con hembras adultas de llama (*Lama glama*) de 3 a 9 años de edad. Los animales fueron mantenidos en el predio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, ubicado en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. La ciudad está situada a nivel del mar, latitud $34^{\circ}36'$ y longitud $58^{\circ}26'$. Fueron alimentados con fardo de pastura y alimento balanceado. Dispusieron de agua fresca y de sombra durante todo el estudio. Todos los animales se esquilieron en el mes de noviembre de cada año durante la realización de la tesis.

EXTRACCIÓN DE SEMEN

La extracción de semen, tanto para los eyaculados destinados a la obtención de plasma seminal como para la obtención de muestras de semen para utilizar en los experimentos, se realizó mediante electroeyaculación bajo anestesia general según el protocolo descrito por Director y col. (2007). Se utilizó un electroeyaculador P-T Electronics® modelo 304 de 220 volts con un vástago de 3 electrodos lineales número 4. Previo a la extracción se estimuló la micción de los machos llevándolos a corrales de otro macho. Posteriormente, se realizó la anestesia general con Xilacina (Clínica Equina, PRO-SER® S.A.; 0,2 mg/kg) y Ketamina (Clínica Equina, PRO-SER® S.A.; 1,5 mg/kg) (**Figura 1**). El vástago de estimulación se colocó en el recto, previa lubricación del mismo con gel y los electrodos fueron posicionados en dirección ventral sobre la próstata (**Figura 2**). El voltaje se aumentó de a 0,2 V en cada estímulo, comenzando en 2 V y finalizando en 10 V. Cada estímulo tuvo una duración de 3 segundos, separados por un periodo de descanso de 1 segundo entre los mismos. Habiendo alcanzado el voltaje máximo se mantuvo el mismo en cada estímulo hasta lograr la electroeyaculación; la estimulación se aplicó durante 6 a 12 minutos. Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, identificado como CICUAL N° 2015/27.



Figura 1. Macho de llama ubicado en la manga de camélidos para recibir la sedación previa a la electroeyaculación.

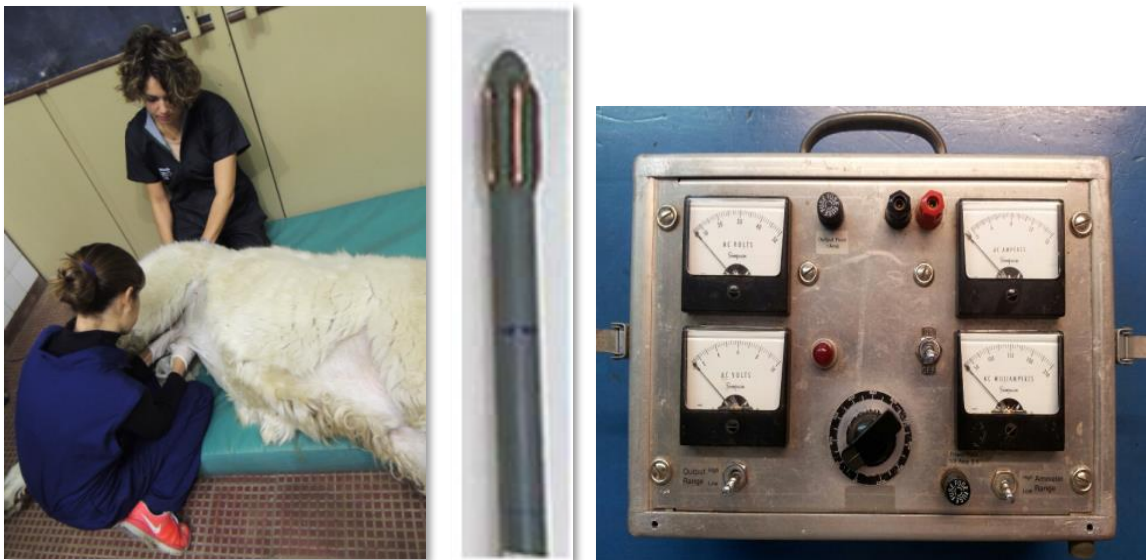


Figura 2. Maniobra de extracción de semen de llama bajo anestesia general, vástago de estimulación y equipo de electroeyaculación (Director y col., 2007).

OBTENCIÓN DEL PLASMA SEMINAL

En cada muestra de semen fresco destinada a la obtención de PS para el desarrollo de los objetivos, se evaluó en forma previa la movilidad, integridad y funcionalidad de la membrana espermática y el estado acrosomal de los espermatozoides. Luego, para la separación del PS, los eyaculados fueron sometidos a una serie de centrifugaciones (4 a 5), durante 30 minutos a 13400 rpm hasta confirmar la ausencia de espermatozoides mediante observación del sobrenadante en microscopio óptico con contraste de fase (400x). El protocolo utilizado fue suficiente para remover la totalidad de los espermatozoides de los eyaculados. El PS obtenido de cada macho se fraccionó y se conservó en forma de “pool”, es decir cada dosis de PS a utilizar estaba conformada por partes iguales de PS proveniente de diferentes machos (mínimo 3 machos). El “pool” de PS fue almacenado y conservado a – 20 °C hasta su utilización.

1. **Objetivo particular 1:** Para armar el pool de PS para el desarrollo de dicho objetivo se utilizaron 16 eyaculados provenientes de 6 machos de llama de entre 6 a 12 años.
2. **Objetivo particular 2:** Para armar el pool de PS para el desarrollo de dicho objetivo se utilizaron 12 eyaculados provenientes de 6 machos de llama de entre de 7 a 14 años.
3. **Objetivo particular 3:** Para armar el pool de PS para el desarrollo del objetivo se utilizaron 8 eyaculados provenientes de 4 machos de llama de entre de 7 a 14 años.

TÉCNICAS DE EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS

1. Movilidad espermática

Los patrones de movilidad espermática evaluados fueron: movilidad oscilatoria (MO), movilidad progresiva (MP) y la sumatoria de ambas determinó la movilidad espermática total (MT). La misma se evaluó mediante la colocación de 10 µl de las muestras entre portaobjeto y cubreobjeto sobre platina térmica a 37 °C utilizando microscopio de contraste de fase (100x) **(Figura 3)**.



Figura 3. Microscopio de contraste de fase con platina térmica para la determinación de la movilidad espermática.

2. Filancia

La filancia se evaluó a través del uso de una micropipeta colocando parte de las muestras sobre un portaobjeto o sobre el borde del tubo de recolección, observando o no al retirar la misma, la formación de un hilo de extensión variable. Las muestras fueron clasificadas según presentaran o no dicha característica (**Figura 4**).

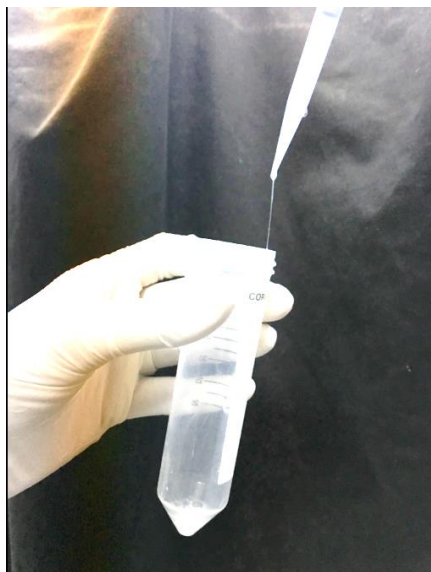


Figura 4. Evaluación de la presencia o no de filancia mediante el uso de micropipeta (100-1000 μ l).

3. *Morfología espermática*

Se evaluó un total de 200 espermatozoides por muestra, colocando una gota de la misma fijada con solución buffer formolada entre portaobjeto y cubreobjeto, obteniendo los porcentajes de espermatozoides con morfología normal y anormal, mediante el uso de microscopía de contraste de fase (1000x) (**Figura 5**). Los espermatozoides fueron clasificados en 6 categorías: **A-** espermatozoides normales; **B-** espermatozoides con cola anormal; **C-** cabezas sueltas; **D-** espermatozoides con cabeza anormal; **E-** espermatozoides con gota citoplasmática; **F-** espermatozoides con pieza intermedia anormal.

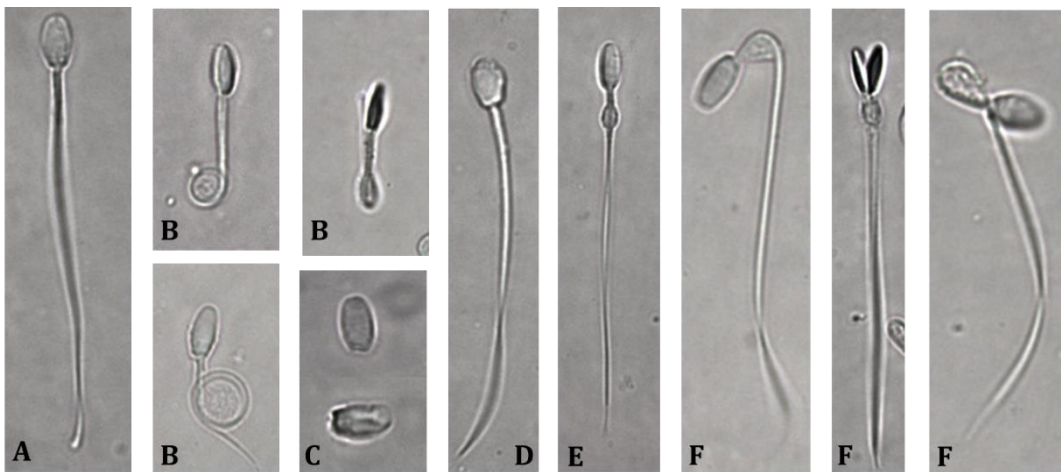


Figura 5. Imágenes de espermatozoides de llama durante la evaluación de la morfología espermática (1000x). **A-** Normal. **B-** Colas anormales. **C-** Cabezas sueltas. **D-** Cabeza anormal. **E-** Gota citoplasmática proximal. **F-** Pieza intermedia anormal.

4. *Test de endósmosis (HOS test)*

Para obtener el porcentaje de espermatozoides con membranas funcionales se realizó el test de endósmosis según la técnica de Giuliano y col. (2008). Brevemente: se incubó a 37 °C 50 µl de muestra en 200 µl de una solución hiposmótica de fructosa-citrato de sodio (50 mOsm) durante 20 minutos. Al término de la incubación se detuvo la reacción con solución hiposmótica formolada y se evaluaron las muestras con microscopio de contraste de fase (400x), contando un mínimo de 200 espermatozoides por muestra (**Figura 6**). Los patrones observados se clasificaron en dos categorías: **1-** espermatozoides con enrollamiento de la cola debido a la incorporación de medio (membrana funcional: HOS positivo) y **2-** espermatozoides

sin enrollamiento de la cola debido a la falta de incorporación de medio (membrana no funcional: HOS negativo).

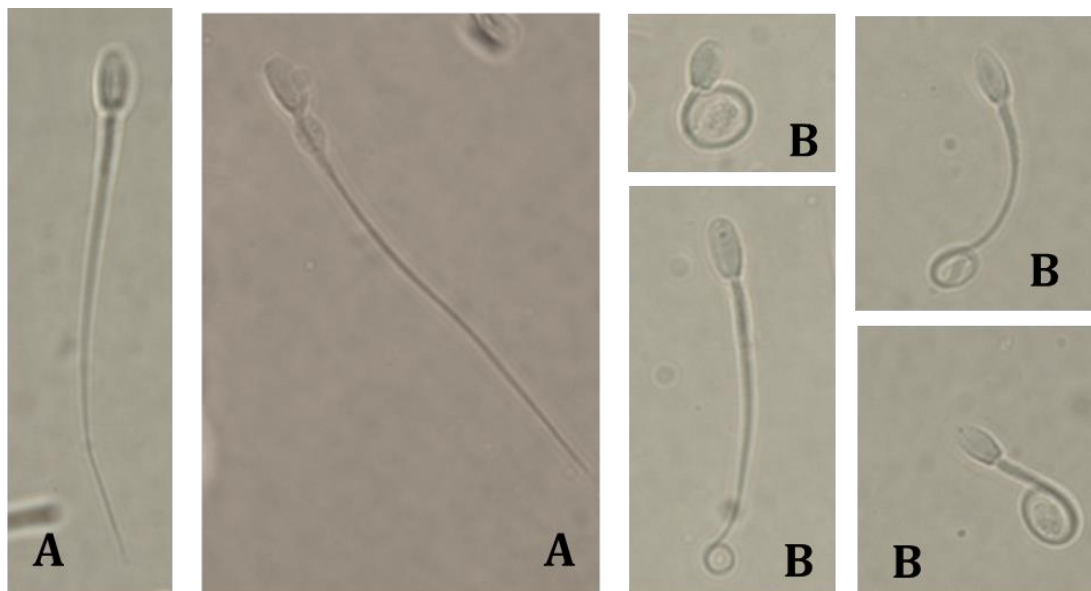


Figura 6. Espermatozoides de llama evaluados mediante la prueba de endósmosis (HOS Test) observados con microscopía de contraste de fase (1000x). **A-** HOS negativos. **B-** HOS positivos.

5. ***Integridad de la membrana plasmática espermática (viabilidad)***

La integridad de la membrana plasmática se evaluó según la técnica descrita por Giuliano y col. (2008), utilizando como colorantes vitales el Diacetato de 6-Carboxifluoresceína (CFDA) y el Ioduro de Propidio (PI) (Sigma Chemicals®). Brevemente, se incubaron a 37 °C durante 10 minutos 50 µl de la muestra en una solución salina isotónica (500 µl) con 10 µl de CFDA (0,5 mg/ml). Luego se agregaron 10 µl de PI (0,5 mg/ml) y se incubó nuevamente durante 10 minutos a 37 °C. Se evaluaron un mínimo de 200 espermatozoides por cada muestra utilizando un microscopio de epifluorescencia (400x). Los espermatozoides se clasificaron en dos categorías: **1-** espermatozoides que se tiñeron de verde con el colorante CFDA debido a que presentaron sus membranas íntegras (vivos) y **2-** espermatozoides teñidos de rojo con el colorante PI debido a que presentaron sus membranas dañadas o no íntegras (muertos) (**Figura 7**).

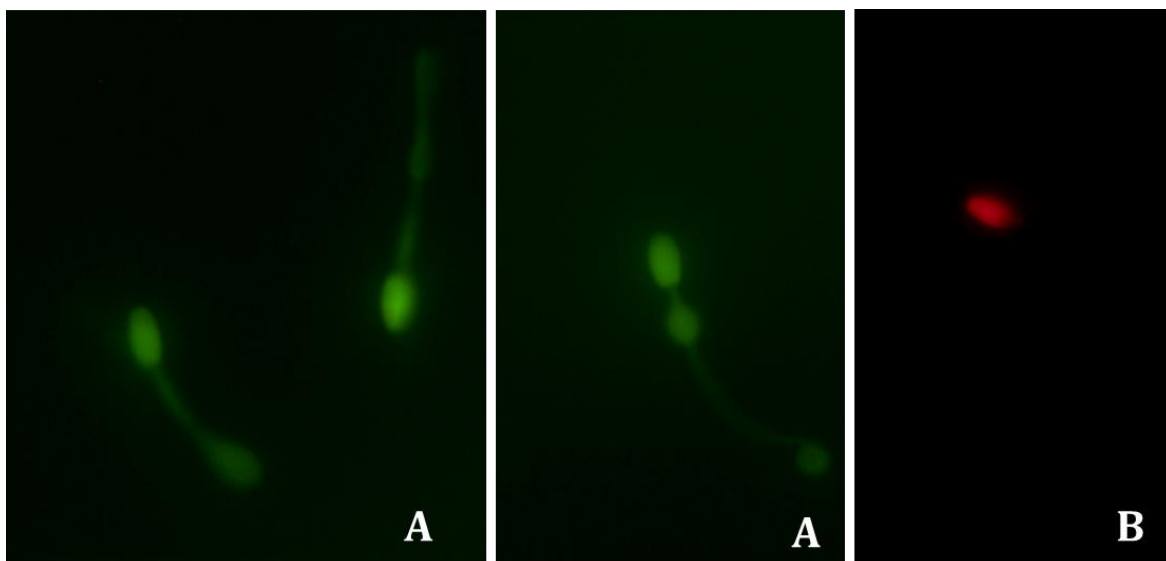


Figura 7. Espermatozoides de llama teñidos con CFDA/PI para evaluar la integridad de la membrana espermática (viabilidad) observados mediante microscopía de fluorescencia (1000x). **A-** Espermatozoides vivos (CFDA). **B-** Espermatozoides muertos (PI).

6. *Estado acrosomal*

Se utilizó la tinción de Coomassie Brilliant Blue R-250 (CB) (Bio-Rad®) según Giuliano y col. (2012b). Brevemente: se realizaron frotis que se secaron al aire y fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se enjuagaron con solución salina buffer (PBS) y se dejaron secar al aire. Posteriormente, los portaobjetos se tiñeron con el colorante CB al 0,22% durante 5 minutos, se lavaron con agua destilada y una vez secos, se realizó el conteo de 200 espermatozoides utilizando microscopio óptico (1000x). Los espermatozoides se clasificaron en dos categorías: **1-** espermatozoides con acrosoma presente (acrosoma teñido) y **2-** espermatozoides con acrosoma ausente (sin tinción en región acrosomal) (**Figura 8**).

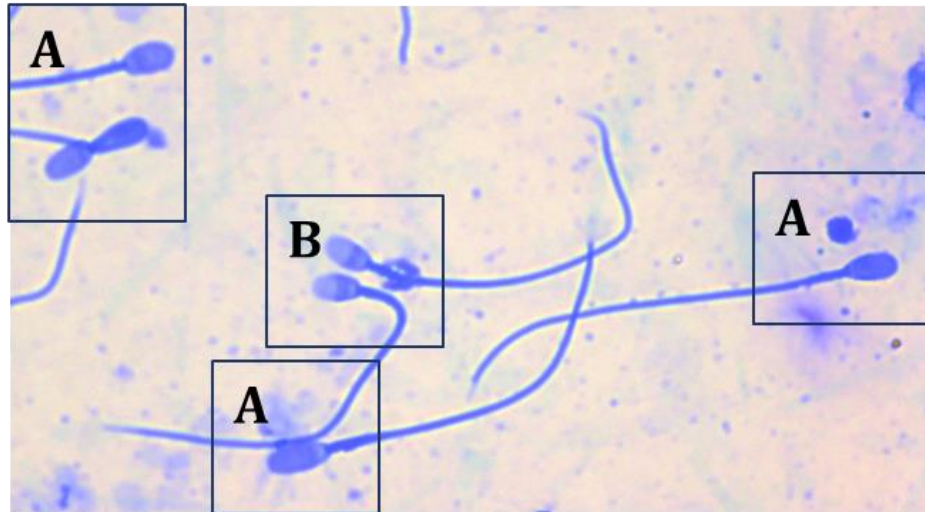


Figura 8. Espermatozoides de llama teñidos con Coomassie Blue para evaluar el acrosoma mediante microscopía óptica (1000x). **A-** espermatozoides con acrosoma presente (teñido) y **B-** espermatozoides con acrosoma ausente (sin teñir).

7. Estado acrosomal y viabilidad espermática

Se utilizó la tinción de Isotiocianato de Fluoresceína conjugado con aglutinina de *Arachis hypogaea* e Ioduro de propidio (FITC-PNA/PI) para evaluar la viabilidad y el estado acrosomal simultáneamente (Sigma Chemicals®). Esta técnica fue realizada de acuerdo a Carretero y col. (2015b) con pequeñas modificaciones. Brevemente, una muestra de 12,5 μ l fue incubada durante 10 minutos a 37 °C en una solución salina isotónica (125 μ l) con 2 μ l de FITC-PNA (2 mg/ml en PBS). Luego, se agregó 2 μ l de PI (0,5 mg/ml en solución salina) y se incubaron 10 minutos más a 37 °C. Posteriormente, 5 μ l de las muestras fueron colocadas entre portaobjeto y cubreobjeto y evaluadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia (1000x). Los espermatozoides fueron clasificados en 6 patrones: **A-** espermatozoides vivos con acrosoma intacto: ausencia de fluorescencia en la cabeza y en el capuchón acrosomal; **B-** espermatozoides vivos con acrosomas reaccionando: ausencia de fluorescencia roja en cabeza y una fluorescencia verde intensa en el capuchón acrosomal; **C-** espermatozoides vivos con acrosomas reaccionados: ausencia de fluorescencia roja en cabeza y fluorescencia verde en forma de puntillado o media luna en el acrosoma o una fluorescencia verde en segmento ecuatorial; **D-** espermatozoides muertos con acrosomas intactos: fluorescencia roja en la cabeza y ausencia de fluorescencia verde en capuchón acrosomal; **E-** espermatozoides muertos

con acrosomas reaccionando: fluorescencia roja en cabeza y fluorescencia verde intensa en el capuchón acrosomal y **F-** espermatozoides muertos con acrosomas reaccionados: fluorescencia roja en cabeza y fluorescencia verde en forma de puntillado o media luna en el acrosoma o fluorescencia verde en segmento ecuatorial. Para facilitar el análisis estadístico las categorías reaccionando y reaccionado (tanto para vivos como muertos) fueron agrupados en una categoría: espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado (VR: vivos con acrosomas reaccionando + vivos con acrosomas reaccionados) y muertos con acrosoma reaccionado (MR: muertos con acrosomas reaccionando + muertos con acrosomas reaccionados) (**Figura 9**).

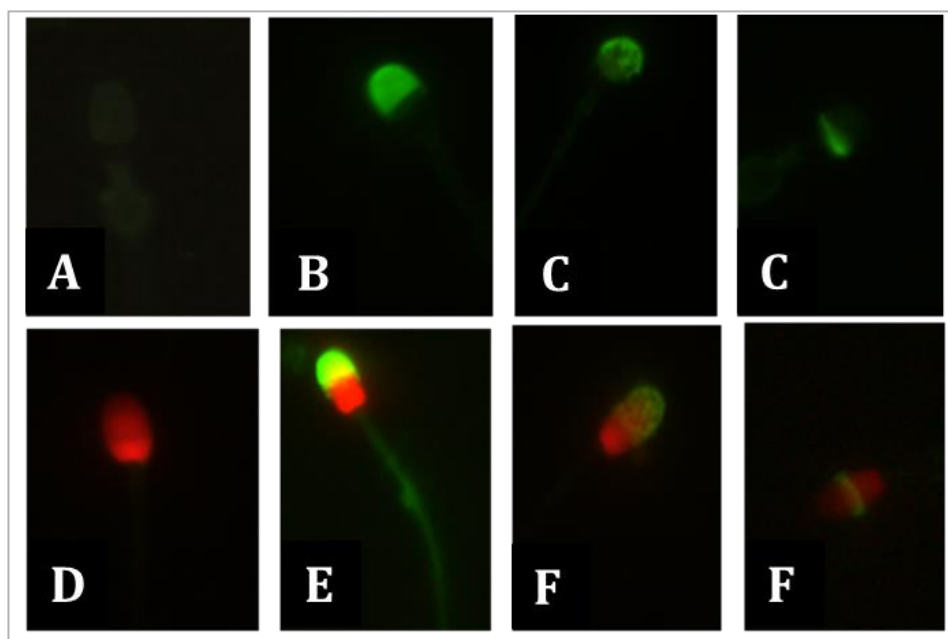


Figura 9. Espermatozoides de llama evaluados con la tinción de FITC-PNA/PI observados con microscopía óptica y de fluorescencia (1000x). **A-** vivo intacto, **B-** vivo reaccionando, **C-** vivos reaccionados, **D-** muerto intacto, **E-** muerto reaccionando y **F-** muertos reaccionados (Carretero y col., 2015b).

8. *Condensación de la cromatina espermática*

Para evaluar el grado de condensación de la cromatina se utilizó la tinción con Azul de Toluidina (AT) (Fluka® BioChemika) según la técnica de Carretero y col. (2009). Brevemente: se realizó un extendido con 10 μ l de muestra y se fijó con etanol 96 ° durante 2 minutos, luego que las muestras se secaran al aire, se colorearon con AT al 0,02% durante 5 minutos, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Se evaluaron un mínimo de 200

espermatozoides por cada tratamiento, utilizando microscopio óptico (1000x). Los espermatozoides se clasificaron en tres categorías según el grado de condensación de la cromatina: **A-** celeste (AT negativo, sin alteración en la condensación de la cromatina); **B-** violeta claro (AT intermedio, algún nivel de descondensación de la cromatina) y **C-** azul-violeta oscuro (AT positivo, alto grado de descondensación de la cromatina) (**Figura 10**). Se utilizó Ditiotreititol (DTT) al 1% en agua deionizada como control positivo de la técnica.

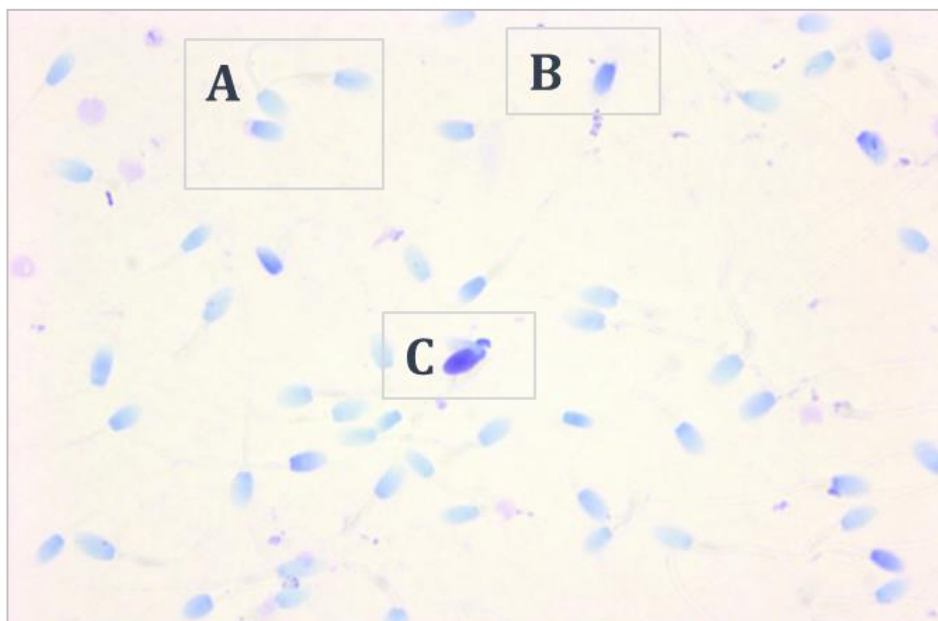


Figura 10. Espermatozoides de llama teñidos con Azul de Toluidina, observados con microscopía de inmersión (1000x): **A-** Negativos, **B-** Intermedio y **C-** Positivo.

9. **Fragmentación del ADN espermático**

Se evaluó mediante la técnica de dispersión de la cromatina espermática (SCD o Halo test) según Carretero y col. (2012). Brevemente: las muestras se llevaron a una concentración final de 10×10^6 espermatozoides/ml utilizando PBS, se mezclaron con agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Fluka® BioChemika) y se colocaron en portaobjetos tratados previamente con agarosa de normal punto de fusión al 0,5% (A5093 Sigma®). Luego, los portaobjetos fueron incubados en diferentes soluciones de lisis, posteriormente se deshidrataron mediante el pasaje en diferentes baños de etanol de graduación creciente (70, 85 y 96 °) durante dos minutos en cada uno de ellos y se dejaron secar al aire. Finalmente, se realizó la tinción de las muestras con Giemsa y se realizaron los conteos con microscopio óptico (1000x). Los

espermatozoides se clasificaron en cuatro patrones de acuerdo con el grado de dispersión de la cromatina: **A-** núcleos con halos grandes de dispersión de la cromatina; **B-** núcleos con halos medianos; **C-** núcleos con halos pequeños y **D-** núcleos sin halo (**Figura 11**). Los dos primeros patrones se consideraron espermatozoides con ADN intacto (sin fragmentación), mientras que los otros dos patrones representan espermatozoides con ADN fragmentado.

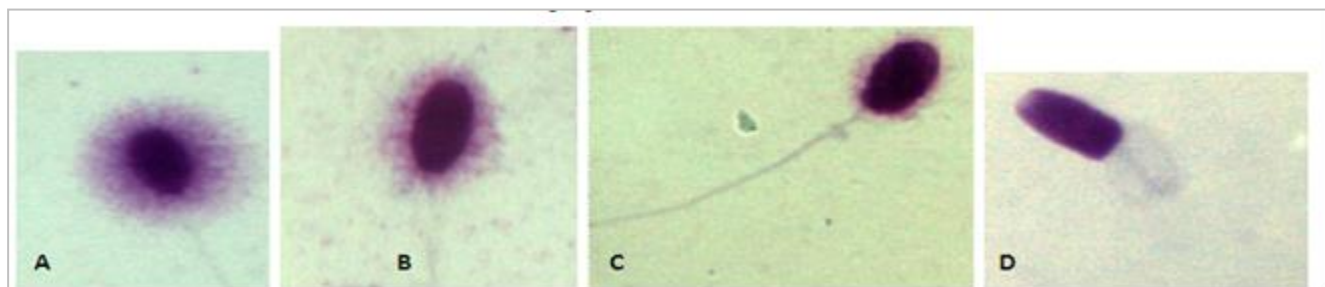


Figura 11. Espermatozoides de llama evaluados con la técnica del halo (SCD): **A-** Espermatozoide con halo grande, **B-** Espermatozoide con halo mediano, **C-** Espermatozoide con halo chico y **D-** Espermatozoide sin halo (1000x).

EVALUACIÓN DE LA DINÁMICA FOLICULAR

Para realizar la inseminación artificial (IA) de las hembras de llama, la dinámica folicular fue monitoreada por palpación y ultrasonografía transrectal utilizando un equipo Ecodoppler color Esaote con transductor lineal dual de 5,0 MHz (My Lab 30 Vet Gold, modelo 7340) (**Figura 12**).



Figura 12. Equipo de ultrasonografía y transductor lineal utilizado para el seguimiento de la dinámica ovárica de las hembras de llama.

Objetivo particular 1

Evaluar el efecto de incubar espermatozoides frescos de llama en distintas diluciones de plasma seminal.

Como prueba piloto previa a la realización del *Objetivo particular 1* se desarrolló la siguiente actividad: *“Evaluación de la presencia o ausencia de PS sobre el patrón de movilidad espermático en espermatozoides de semen fresco de llama”*.

El **objetivo** de este trabajo fue evaluar el efecto de la presencia o ausencia del PS en la movilidad, viabilidad y estado acrosomal en espermatozoides de semen fresco de llama.

Materiales y Métodos

Se obtuvieron un total de 15 eyaculados de 5 machos de llamas ($n=5, r=3$), entre 6 y 10 años de edad, mediante electroeyaculación bajo anestesia general. Cada eyaculado se diluyó 4:1 en una solución de colagenasa al 0,1% en medio HEPES-TALP (HT) y se incubó durante 4 minutos a 37 °C con el objetivo de disminuir la filancia y facilitar la manipulación de las muestras. Inmediatamente después de la incubación cada eyaculado fue dividido en dos alícuotas. Posteriormente, ambas alícuotas se centrifugaron durante 8 minutos a 3000 rpm y los pellets obtenidos se resuspendieron en HT o en PS. Las muestras se incubaron a 37 °C hasta su evaluación a las 0; 1,5 y 3 hs. Se evaluó la movilidad espermática utilizando microscopio de contraste de fase con platina térmica, clasificando la movilidad en oscilatoria, progresiva, circular y total. La viabilidad fue evaluada mediante CFDA/PI y el estado acrosomal se evaluó con la tinción de CB.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa R 2.2.1. En todos los casos se comprobó la normalidad de las variables mediante el test de Kolmogorov. La movilidad oscilatoria, progresiva, circular y total no presentaron una distribución normal, por lo que se utilizó un diseño de Kruskal Wallis. Mientras que, la viabilidad e integridad acrosomal se distribuyeron normalmente por lo que en ellas se utilizó un diseño de parcelas divididas en el

tiempo con el tratamiento como factor de dos niveles (HT y PS) y el tiempo como factor de 3 niveles (0; 1,5 y 3 hs), considerando a los machos como bloque. El nivel de significancia utilizado en todos los análisis fue del 0,05.

Resultados

No se observó interacción entre los tratamientos (HT y PS) y tiempos de incubación (0; 1,5 y 3 hs) en cada una de las características seminales evaluadas. En las muestras incubadas con HT se observaron espermatozoides con movilidad progresiva e hiperactiva, mientras que los espermatozoides incubados en PS presentaron principalmente movimientos oscilatorios. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la movilidad espermática total en las muestras incubadas en HT en los diferentes tiempos evaluados (0 hs: $30,8 \pm 18,9\%$; 1,5 hs: $26,5 \pm 11,5\%$ y 3 hs: $21,5 \pm 13,5\%$). Sin embargo, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la MT en las muestras incubadas con PS a las 3 hs ($2,3 \pm 3,2\%$) respecto de las muestras incubadas en PS a tiempo 0 h ($16,5 \pm 12,6\%$) (**Figura 13**). Respecto al porcentaje de espermatozoides vivos, las muestras incubadas en HT retuvieron un 78,4% de la viabilidad inicial y las muestras incubadas en PS retuvieron un 69,7% de la viabilidad inicial, observándose una disminución significativa de la misma a las 3 hs de incubación respecto a la hora cero en las muestras con PS ($p < 0,05$) No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto entre los tratamientos (HT y PS), sin embargo, dicho porcentaje disminuyó significativamente ($p < 0,05$) después de las 3 hs de incubación en ambas muestras (HT y PS) (**Figura 14**).

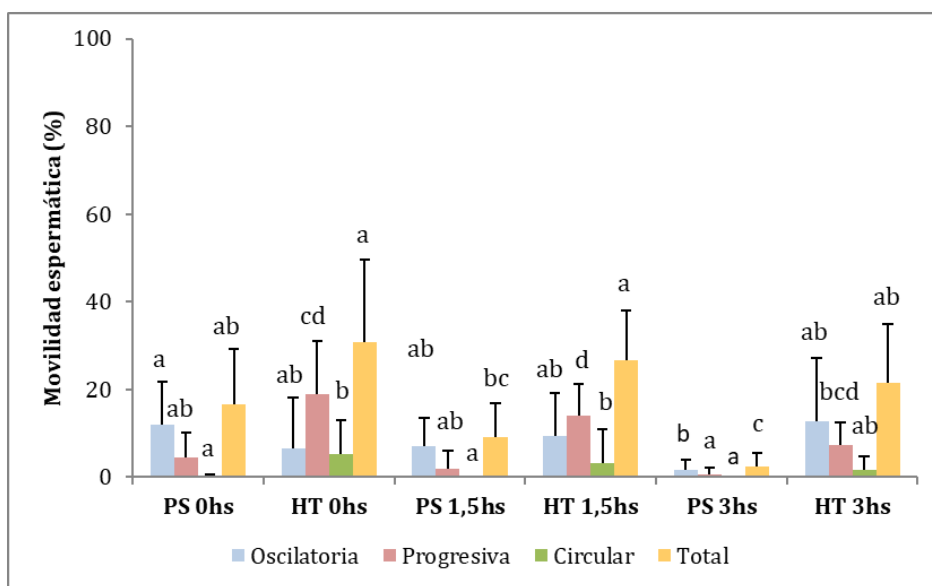


Figura 13. Porcentaje de movilidad espermática en espermatozoides de llama incubados en HEPES-TALP (HT) o en plasma seminal (PS) durante 0; 1,5 y 3 horas a 37 °C (media ± DE) ($n=5$, $r=3$). ^{a,b,c,d} Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos y tiempos en cada una de las variables analizadas ($p<0,05$).

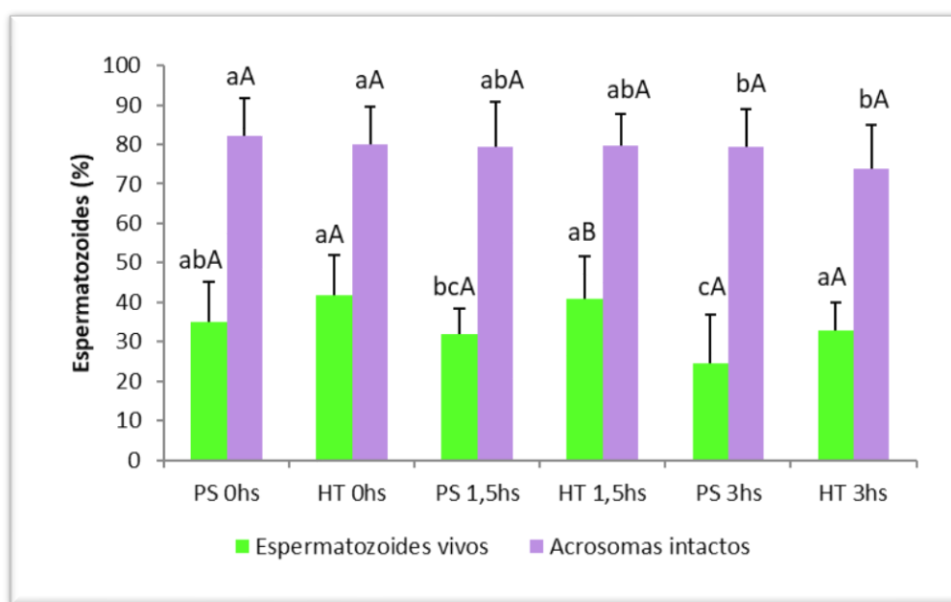


Figura 14. Porcentajes de espermatozoides de llama viables y con acrosoma intacto en muestras incubadas en HEPES-TALP (HT) o en plasma seminal (PS) durante 0, 1,5 y 3 horas a 37 °C (media ± DE) ($n=5$, $r=3$). ^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas dentro de un tratamiento a lo largo de la incubación ($p<0,05$). ^{A,B} Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en un mismo tiempo de incubación ($p<0,05$).

Conclusiones

La presencia de espermatozoides con movilidad progresiva e hiperactiva en las muestras de HT (ausencia de PS) y la observación de movilidad oscilatoria en las muestras incubadas con 100% de PS indican que el PS estaría involucrado en el patrón de movilidad del espermatozoide de semen fresco de llama.

En el plan de tesis estaba planteado el uso del Sistema Integrado de Análisis de Semen (ISAS®) como método de evaluación objetivo junto con el método subjetivo de microscopía óptica. Para determinar si era posible la utilización del mismo en semen de llama se realizó la siguiente actividad:

Evaluación objetiva de la movilidad espermática en semen fresco de llama

El ISAS® es un sistema computarizado que permite la evaluación objetiva de diferentes características espermáticas y una de ellas es la movilidad. En estudios anteriores se determinó que la presencia de espermatozoides inmóviles o con movilidad oscilatoria es una particularidad inherente o propia de la especie y que, por lo tanto, el porcentaje de movilidad en semen fresco no sería un parámetro indicativo de la calidad del eyaculado.

El objetivo de este estudio fue comparar dos metodologías de evaluación de la movilidad progresiva en espermatozoides de llama tratados enzimáticamente, la observación a través de microscopía de contraste de fase versus el ISAS®.

Materiales y métodos

Se obtuvieron un total de 10 eyaculados de 5 machos de llama ($n=5$; $r=2$), entre 6 y 10 años de edad mediante electroeyaculación. Los eyaculados fueron incubados con colagenasa al 0,1% en medio HT durante 4 minutos a 37 °C. Inmediatamente después de la incubación cada eyaculado se dividió en dos alícuotas que se centrifugaron durante 8 minutos a 3000 rpm. Los pellets fueron resuspendidos en HT o PS y se mantuvieron a 37 °C hasta su evaluación. Se evaluó movilidad espermática a través de dos métodos: sistema ISAS Proisser® y microscopio de contraste de fase (MCF) con platina térmica. Además, se evaluó la viabilidad espermática (CFDA/PI) y el estado acrosomal (CB).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa R 2.2.1. Los valores de movilidad espermática fueron analizados estadísticamente mediante un diseño factorial de dos factores con 2 niveles (factor tratamiento con los niveles HT y PS – factor método de evaluación con los niveles CASA y microscopía óptica) aplicando un bloqueo por macho. La viabilidad espermática y el estado acrosomal fueron evaluados mediante un t de Student apareada. El nivel de significancia utilizado en todos los análisis fue del 0,05.

Resultados

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva entre la muestra de HT evaluada a través de MCF comparado con las demás muestras (PS-MCF, HT-ISAS, PS-ISAS). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la viabilidad y el estado acrosomal entre las muestras de HT y PS, indicando que las diferencias observadas no se deberían al tratamiento del semen (**Tabla 3**).

Tabla 3. Porcentajes de movilidad progresiva, viabilidad y estado acrosomal en espermatozoides de llama incubados con HEPES-TALP (HT) o plasma seminal (PS). La movilidad progresiva se evaluó mediante: Microscopio de contraste de fase (MCF) y el Sistema Integrado de Análisis de Semen (ISAS) (media \pm DE) ($n=5$; $r=2$).

Tratamiento	Movilidad Progresiva (%)		Viabilidad (%)	Acrosoma presente (%)
	MCF	ISAS		
HT	24,2 \pm 8,8 ^a	3,8 \pm 5,4 ^b	45,9 \pm 11,9 ^a	81,5 \pm 10,9 ^a
PS	5,2 \pm 7,0 ^b	1,2 \pm 1,4 ^b	35,2 \pm 11,9 ^a	82,1 \pm 10,6 ^a

^{a,b} Letras diferentes indican diferencias entre tratamientos (HT y PS) y entre métodos de evaluación (MCF e ISAS) ($p < 0,05$).

Conclusiones

Debido a la diferencia significativa encontrada entre la aplicación de ambos métodos de evaluación de movilidad espermática progresiva, son necesarios nuevos estudios para estandarizar y validar el sistema de análisis computarizado de imágenes ISAS previo a la aplicación práctica del mismo en la evaluación de la movilidad espermática en esta especie. Es por esta razón que, en el desarrollo de la tesis se utilizó la evaluación subjetiva de la movilidad mediante microscopía óptica.

Diseño experimental Objetivo particular 1

Se evaluaron un total de 18 eyaculados provenientes de 6 machos de llama ($n= 6$, $r= 3$). Luego de la evaluación de las características seminales de cada eyaculado se prosiguió con la incubación del mismo en una solución de colagenasa al 0,1% (Tipo I, Sigma Chemicals®) en HT a 37 °C durante 8 minutos (Giuliano y col., 2010). Dicho tratamiento se realizó con la finalidad de reducir la filancia y poder separar los espermatozoides del PS. Luego, las muestras fueron divididas en cuatro alícuotas y centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos (**Figura 15**). Los 4 pellets obtenidos fueron resuspendidos con diferentes porcentajes de PS en HT: **1) 0% PS** (HT sin PS, control); **2) 10% PS** (90% HT, 10% PS); **3) 50% PS** (50% HT- 50% PS) y **4) 100% PS** (PS sin HT, control). Todas las muestras fueron incubadas a 37 °C hasta su evaluación a tiempo 0; 1,5 y 3 hs. En cada tiempo de incubación se evaluó la movilidad espermática, integridad y funcionalidad de la membrana espermática y el estado acrosomal. El diseño experimental del *Objetivo particular 1* se encuentra diagramado en la **Figura 16**.

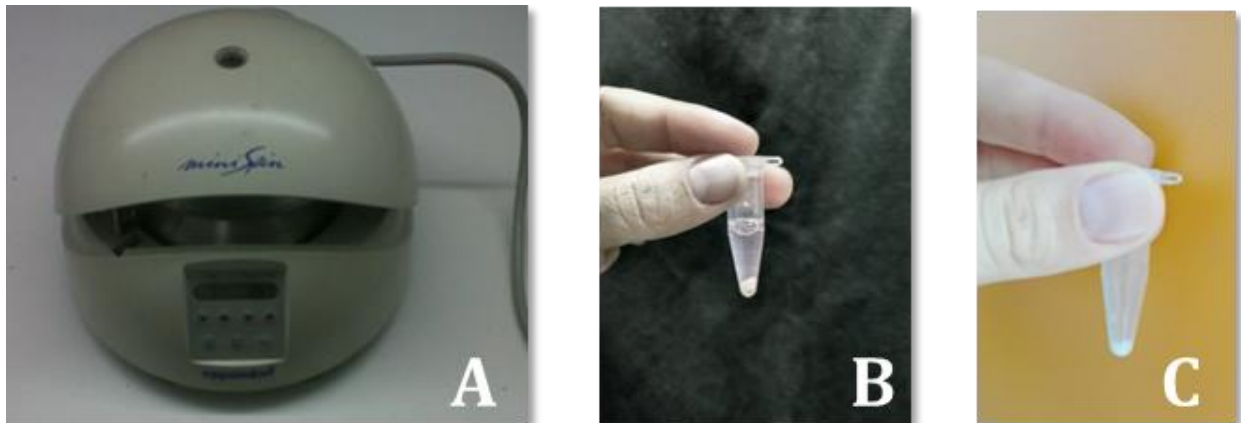


Figura 15. A- Centrífuga miniSpin® utilizada para separar el plasma seminal (PS) y la solución de collagenasa de los espermatozoides de llama. B- Eppendorf de 1,5 ml luego de la centrifugación para obtener el pellet de espermatozoides de llama. C- Pellet de espermatozoides de llama en ausencia de PS y de collagenasa.

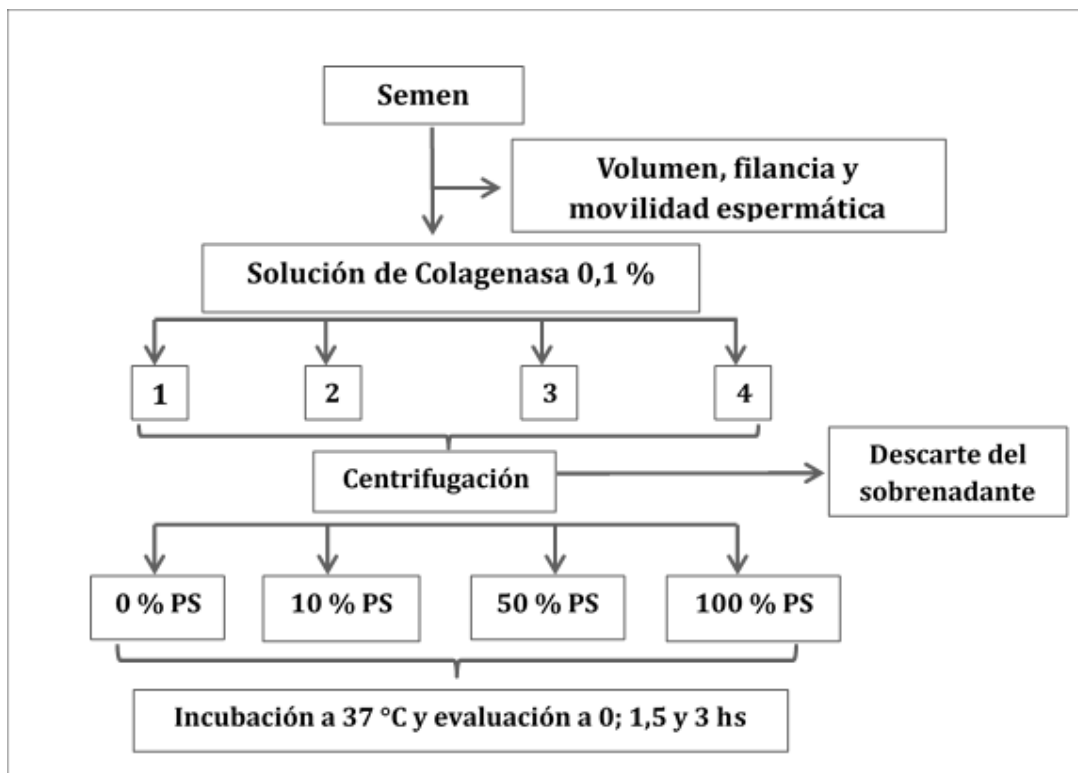


Figura 16. Diseño experimental del *objetivo particular 1*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa R 2.2.1. En todos los casos se comprobó la normalidad de las variables mediante el test de Kolmogorov. El nivel de significancia utilizado en todos los análisis fue del 0,05. Para analizar estadísticamente los resultados de movilidad espermática, viabilidad, funcionalidad de membrana y el estado acrosomal se utilizó un diseño factorial ANOVA de parcelas divididas en el tiempo (*Split-plot design*) de dos factores con 3 y 4 niveles (el factor tiempo de incubación con los niveles: 0; 1,5 y 3 hs y el factor tratamiento con los niveles: 0, 10, 50 y 100% de PS). El diseño del experimento fue un diseño en bloques completamente aleatorizado tomando al macho como bloque.

Resultados Objetivo particular 1

Evaluación del semen fresco

Las características seminales de los eyaculados que se utilizaron para formar el pool de PS fueron normales para la especie (media \pm desvío estándar (DE)): volumen: $3,9 \pm 2,7$ ml; movilidad espermática oscilatoria: $26,1 \pm 16,5\%$; concentración: $98 \pm 75 \times 10^6$ espermatozoides/ml; funcionalidad de membrana: $34,0 \pm 10,5\%$; integridad de membranas (viabilidad): $62,1 \pm 11,6\%$ e integridad acrosomal (CB): $96,8 \pm 3,6\%$. Todos los eyaculados presentaron filancia.

Los valores de las características seminales evaluadas en las muestras de semen fresco utilizado para el diseño experimental fueron (media \pm DE): volumen: $2,3 \pm 2,2$ ml y movilidad espermática oscilatoria: $30,3 \pm 16,4\%$. En el semen fresco sólo se observó movilidad oscilatoria. Todos los eyaculados utilizados en el estudio presentaron filancia.

Movilidad espermática

No se observó interacción entre el porcentaje de PS y el tiempo de incubación. Las muestras incubadas con 50 y 100% de PS presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con MO que el control (0% PS) y que el tratamiento de 10% de PS, aunque esta diferencia no fue significativa ($p > 0,05$). Al tiempo 0 hs de incubación, en las muestras tratadas con 100% de PS, el porcentaje de espermatozoides con MO (26,7%) fue cercano al promedio observado en el semen fresco (30,3%), mientras que, en las muestras incubadas con 50% de PS, la MO promedio (15,3%) fue la mitad al valor observado del semen fresco. En los tratamientos de 0, 10 y 50% de PS se conservó el porcentaje de espermatozoides con MO a lo largo de las 3 hs de incubación ($p > 0,05$). Mientras que, en las muestras incubadas con 100% de PS, se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) de la misma a las 3 horas de incubación respecto al tiempo 0. Los resultados de los porcentajes de MO se pueden observar en la **Tabla 4**.

Con respecto a la MP, al tiempo 0 hs, las muestras con nulos o bajos porcentajes de PS (0 y 10 %) presentaron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) que las muestras con 100 % de PS. Todos los tratamientos (0, 10, 50 y 100% de PS) conservaron la MP a lo largo del tiempo (0; 1,5 y 3 hs), sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con MP en las muestras incubadas con 100% de PS fueron valores prácticamente nulos (1 a 3%), en todos los tiempos de incubación. Los resultados de MP a lo largo del tiempo en cada tratamiento se pueden observar en la **Tabla 4**.

Respecto al porcentaje de espermatozoides con MT no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras (0, 10, 50 y 100% de PS) al analizar cada tiempo de incubación (0; 1,5 y 3 hs). Tampoco se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la MT a lo largo del tiempo en las muestras tratadas con 0, 10 y 50% de PS, mientras que se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) de la misma en las muestras con 100% de PS a las 3 hs de incubación con respecto a la hora 0. Los porcentajes de MT en cada uno de los tratamientos a lo largo del tiempo pueden observarse en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Porcentajes de movilidad oscilatoria (MO), progresiva (MP) y total (MT) en espermatozoides de semen fresco de llama, tratados con colagenasa e incubados a 37 °C con diferentes porcentajes de PS (0, 10, 50 y 100%) durante 0; 1,5 y 3 horas. Los valores son media \pm DE ($n=6$, $r=3$).

PS (%)	Tiempo (hs)	MO (%)	MP (%)	MT (%)
0	0	10,1 \pm 8,7 ^{aA}	16,3 \pm 11,7 ^{aA}	26,4 \pm 12,6 ^{aA}
	1,5	8,8 \pm 7,8 ^{aA}	9,1 \pm 9,3 ^{aA}	17,9 \pm 10,9 ^{aA}
	3	9,3 \pm 7,3 ^{aA}	8,9 \pm 9,9 ^{aA}	18,2 \pm 11,2 ^{aA}
10	0	6,6 \pm 6,0 ^{aA}	19,7 \pm 11,0 ^{aA}	26,3 \pm 8,9 ^{aA}
	1,5	5,8 \pm 5,4 ^{aA}	16,7 \pm 9,9 ^{aA}	22,5 \pm 11,8 ^{aA}
	3	7,2 \pm 5,1 ^{aA}	12,3 \pm 9,9 ^{aA}	19,5 \pm 13,1 ^{aA}
50	0	15,3 \pm 13,4 ^{aA}	11,6 \pm 12,6 ^{aAB}	26,9 \pm 8,9 ^{aA}
	1,5	14,9 \pm 9,7 ^{aA}	9,3 \pm 11,3 ^{aA}	24,2 \pm 11,1 ^{aA}
	3	11,7 \pm 12,6 ^{aA}	7,0 \pm 8,6 ^{aA}	18,7 \pm 14,2 ^{aA}
100	0	26,7 \pm 12,8 ^{aA}	1,0 \pm 3,8 ^{aB}	27,7 \pm 14,0 ^{aA}
	1,5	13,1 \pm 13,3 ^{abA}	3,0 \pm 7,9 ^{aA}	16,1 \pm 16,0 ^{abA}
	3	7,7 \pm 10,7 ^{ba}	1,2 \pm 3,8 ^{aA}	8,9 \pm 11,2 ^{ba}

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento a lo largo del tiempo de incubación ($p<0,05$). ^{A,B} Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de cada tiempo de incubación ($p>0,05$).

Filancia

Las muestras incubadas sin o con un 10% de PS no presentaron filancia en ninguno de los tiempos de incubación (0; 1,5 y 3 hs). Por otro lado, al comienzo del experimento (0 hs) alrededor del 42% de las muestras tratadas con 50% de PS poseían filancia, característica que disminuyó a un 14,2 % a la 1,5 hs de incubación y estaba ausente en todas las muestras a las 3 hs. Con respecto al tratamiento de 100% de PS, la filancia estuvo presente en todas las muestras evaluadas al tiempo 0 y 1,5 hs de incubación, estando sólo presente en la mitad de las muestras a las 3 hs de evaluación (**Figura 17**).

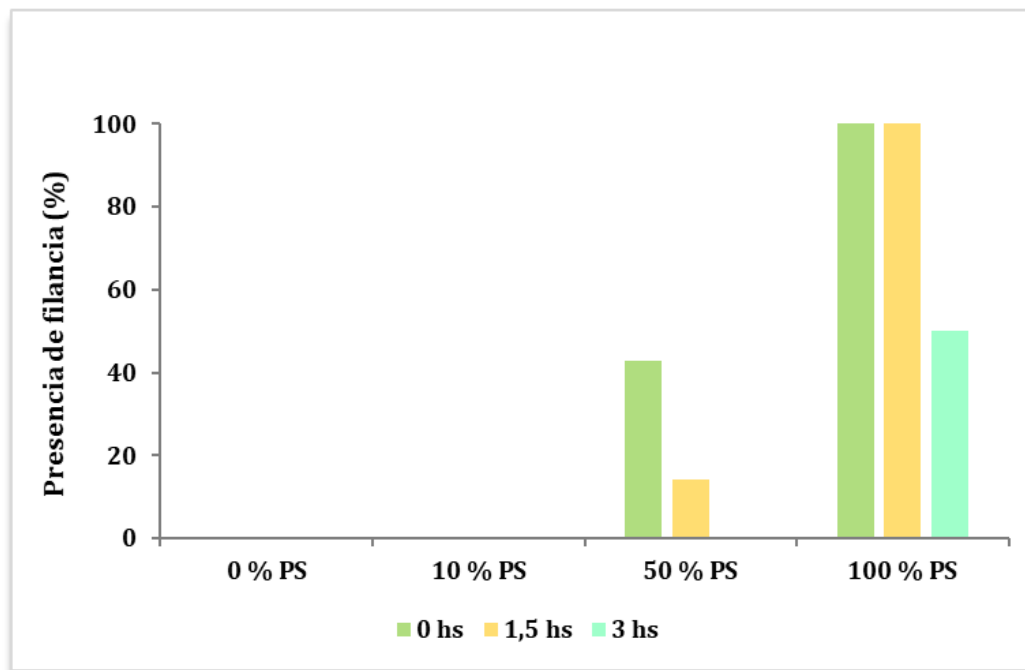


Figura 17. Porcentaje de presencia de filancia en las muestras de espermatozoides de semen fresco de llama, incubados a 37 °C con diferentes porcentajes de PS (0, 10, 50 y 100%) durante 0; 1,5 y 3 horas ($n= 6, r= 3$).

Viabilidad espermática

No se observó interacción entre los factores porcentaje de PS y tiempo de incubación. No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el porcentaje de espermatozoides viables entre los tratamientos de 0, 10 y 50% de PS en cada uno de los tiempos de incubación (0; 1,5 y 3 hs). Además, dichas muestras conservaron la viabilidad espermática ($p>0,05$) a lo

largo del tiempo. Mientras que, se observó una caída significativa ($p < 0,05$) de la misma en las muestras con 100% PS a las 3 hs de incubación (0 hs: $55,4 \pm 16,1\%$ versus 3 hs: $29,1 \pm 19,1\%$ (media \pm DE)). Además, la viabilidad de las muestras con 100 % de PS fue significativamente menor ($p < 0,05$) a la observada en el resto de los tratamientos (0, 10 y 50% de PS) a las 3 horas de incubación. Los valores de viabilidad espermática en los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo pueden observarse en la **Figura 18**.

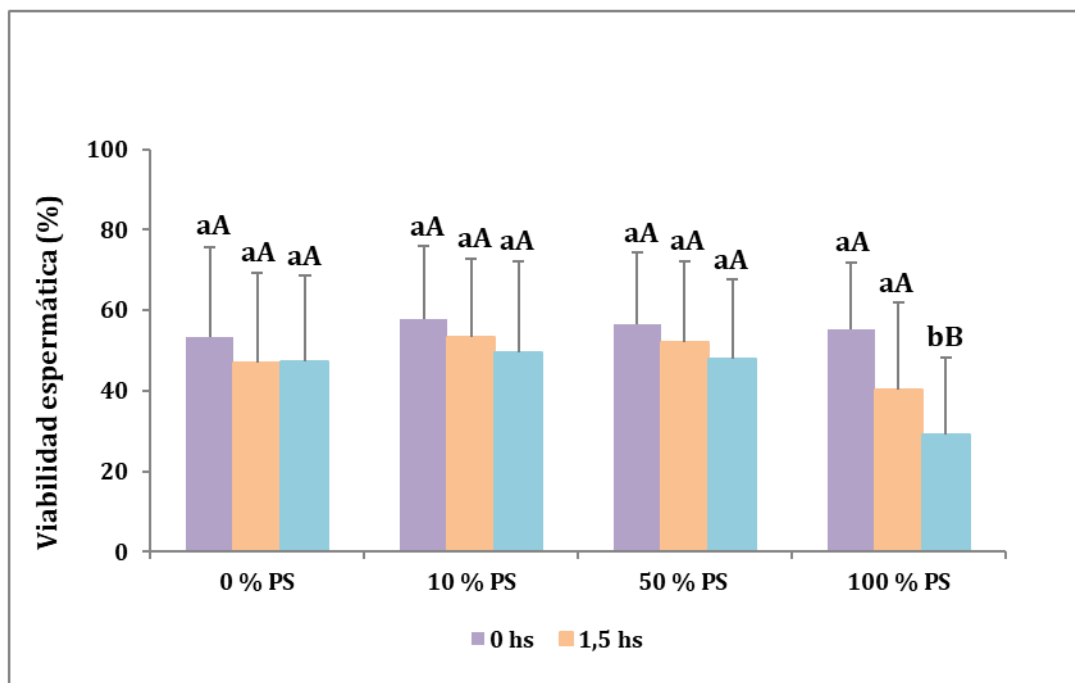


Figura 18. Porcentaje de viabilidad espermática (tinción CFDA/PI) en espermatozoides de semen fresco de llama, incubados a 37 °C con diferentes porcentajes de PS (0, 10, 50 y 100%) durante 0; 1,5 y 3 horas (media \pm DE) ($n = 6$, $r = 3$).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas dentro de un tratamiento a lo largo de la incubación ($p < 0,05$). ^{A,B} Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en un mismo tiempo de incubación ($p < 0,05$).

Funcionalidad de membrana

No se observó interacción entre los factores porcentaje de PS y tiempo de incubación. En todos los tiempos de incubación (0; 1,5 y 3 hs), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con funcionalidad de membrana entre las muestras con 0, 10 y 50% de PS. Por otra parte, dichos tratamientos conservaron la

funcionalidad de sus membranas a lo largo del tiempo. Se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) de dicha característica en las muestras tratadas con 100% de PS a las 3 hs de incubación respecto a la hora 0. Además, la funcionalidad de membrana de las muestras con 100 % de PS fue significativamente menor ($p < 0,05$) a la observada en el resto de los tratamientos (0, 10 y 50% de PS) a las 3 horas de incubación. Los porcentajes de espermatozoides con funcionalidad de membrana en los diferentes tratamientos a lo largo del tiempo pueden observarse en la **Figura 19**.

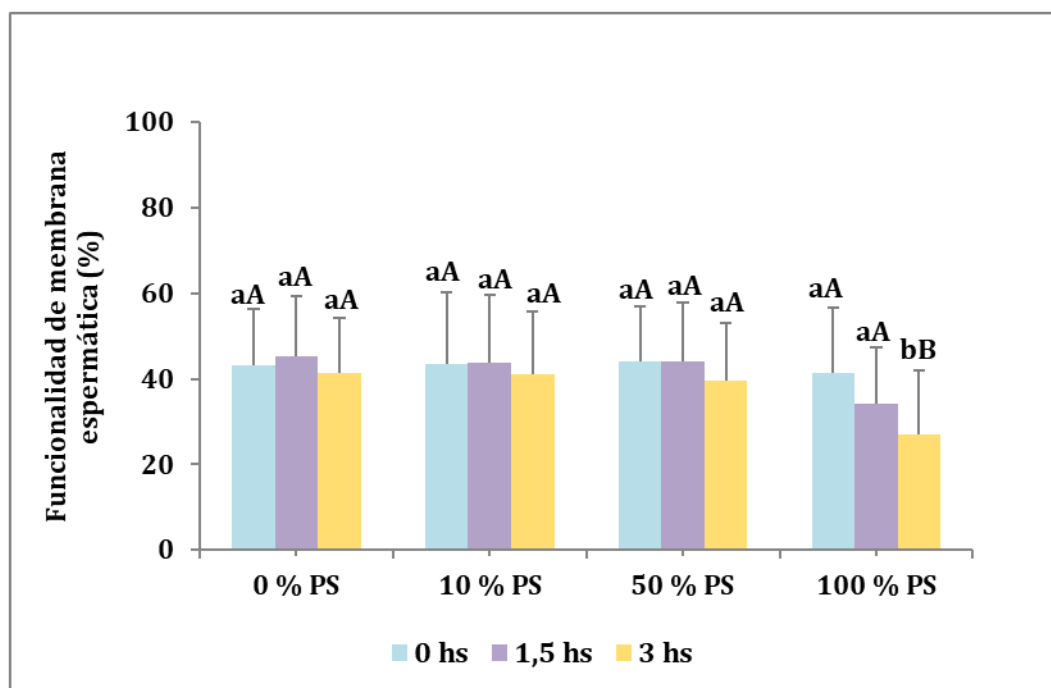


Figura 19. Porcentaje de funcionalidad de membrana (HOS Test) en espermatozoides de semen fresco de llama, incubados a 37 °C con diferentes porcentajes de PS (0, 10, 50 y 100%) durante 0; 1,5 y 3 horas (media \pm DE) ($n=6$, $r=3$).

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas dentro de un tratamiento a lo largo de la incubación ($p < 0,05$). ^{A,B} Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en un mismo tiempo de incubación ($p < 0,05$).

Acrosoma espermático

No se observó interacción entre los factores porcentaje de PS y tiempo de incubación. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma presente en cada tratamiento a lo largo del tiempo. Solo se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos a las 3 hs de incubación, observándose menores porcentajes de espermatozoides con acrosoma presente en las muestras sin PS (0%) *versus* el resto de los tratamientos (10, 50 y 100%). El porcentaje de espermatozoides con acrosoma presente puede observarse en la **Figura 20**.

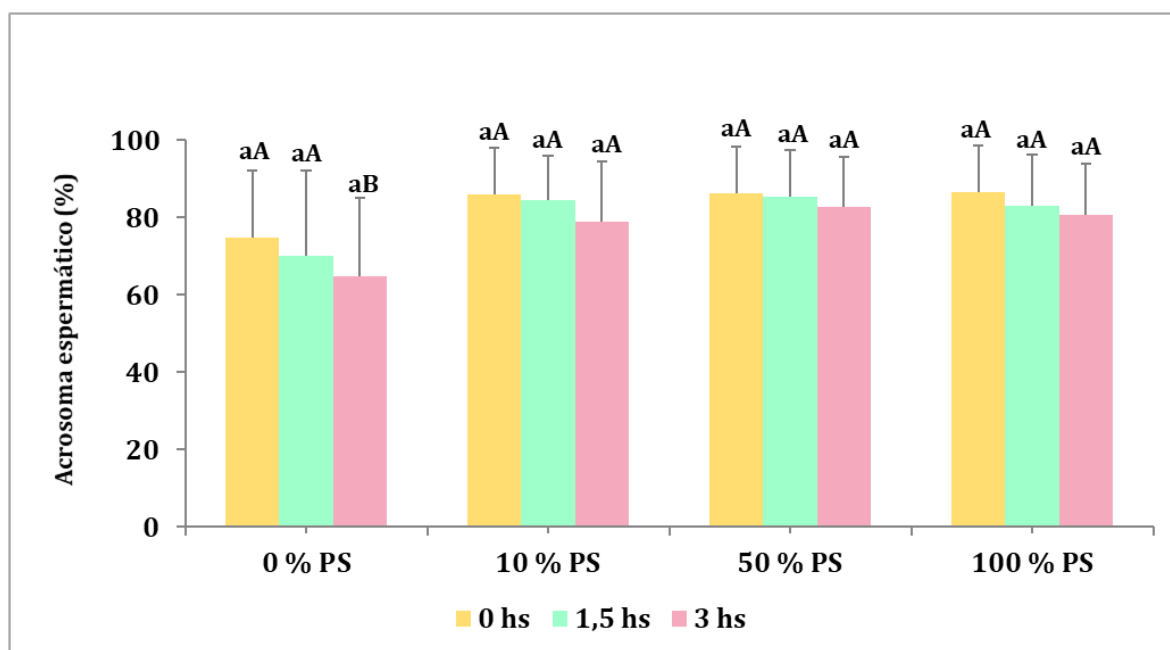


Figura 20. Porcentaje de presencia de acrosoma (tinción CB) en espermatozoides de semen fresco de llama, incubados a 37 °C con diferentes concentraciones de PS (0, 10, 50 y 100%) durante 0; 1,5 y 3 horas (media \pm DE) ($n=6$, $r=3$).

^a Indica ausencia de diferencias significativas dentro de un tratamiento a lo largo de la incubación ($p < 0,05$). ^{A,B} Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos en un mismo tiempo de incubación ($p < 0,05$).

Para determinar si era factible la implementación de una técnica dual de campo claro que permitiera evaluar simultáneamente la viabilidad y el estado acrosomal de los espermatozoides de llama, que además facilitara los tiempos de evaluación y disminuyera la cantidad de muestras a analizar se realizó la siguiente actividad:

Puesta a punto de la Técnica de la Triple Tinción para la evaluación del acrosoma y viabilidad del espermatozoide de llama.

La Triple Tinción (TT) es una técnica de microscopía de campo claro capaz de determinar simultáneamente el estado acrosomal y la viabilidad espermática (Kovacs y Foote, 1992). Esta técnica ha sido utilizada en espermatozoides de equino (Kútvölgyi y col., 2006), toro (Kovacs y Foote 1992), verraco (Kovacs y Foote, 1992) y diferentes roedores (Kovacs y col., 1992; Somfai y col., 2002), no habiendo reportes de su uso en espermatozoides de llama.

El objetivo de esta puesta a punto fue determinar si era posible observar, en espermatozoides de llama, los patrones característicos de la TT para evaluar simultáneamente la viabilidad y el estado acrosomal.

Materiales y métodos

Se evaluaron un total de 10 eyaculados de 5 machos de llama ($n=5$; $r= 2$) obtenidos mediante electroeyaculación bajo anestesia general, según Director y col. (2007). Con el objetivo de disminuir la filancia, las muestras se incubaron con colagenasa al 0,1% en medio HT (Giuliano y col., 2010). Posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm y los pellets obtenidos fueron resuspendidos en PBS para disminuir la tinción de fondo. Las técnicas de evaluación utilizadas fueron: tinción con CB según Giuliano y col. (2012b) para evaluar el estado acrosomal, cuyos patrones son: acrosoma presente (CB positivo, acrosoma teñido) y acrosoma ausente (CB negativo, acrosoma sin teñir) y la técnica de TT según Kovacs y Foote (1992) para evaluar la viabilidad espermática y el estado acrosomal. Para esta última tinción se realizó un extendido de la muestra con azul tripán 0,2% en partes iguales, luego del secado al aire se realizó la fijación con rojo neutro-ácido clorhídrico durante 2 a 3 minutos y finalmente se realizó una tinción con Giemsa durante 90 minutos como mínimo.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa R 2.2.1. Los patrones de las técnicas de CB y TT fueron correlacionados a través del test de Pearson.

Resultados

Con la TT se identificaron los siguientes patrones: 1- espermatozoides vivos con membranas íntegras y acrosoma presente (región posacrosomal celeste o azul claro y

acrosoma rosado); 2- espermatozoides vivos con acrosoma dañado o suelto (región posacrosomal celeste o azul claro y acrosoma violeta claro o violeta oscuro); 3- espermatozoides muertos con acrosoma presente (región posacrosomal azul oscuro y acrosoma rosado); 4- espermatozoides muertos con acrosoma dañado o suelto (región posacrosomal azul oscuro y acrosoma violeta claro o violeta oscuro) (**Figura 21**). No se observaron espermatozoides con la región acrosomal color gris, que en otras especies representa la pérdida del acrosoma. Se determinó una correlación positiva ($r=0,63$; $p=0,04$) entre el porcentaje de espermatozoides con acrosoma presente determinado a través de CB y el porcentaje de espermatozoides viables y acrosoma presente determinados con la TT.

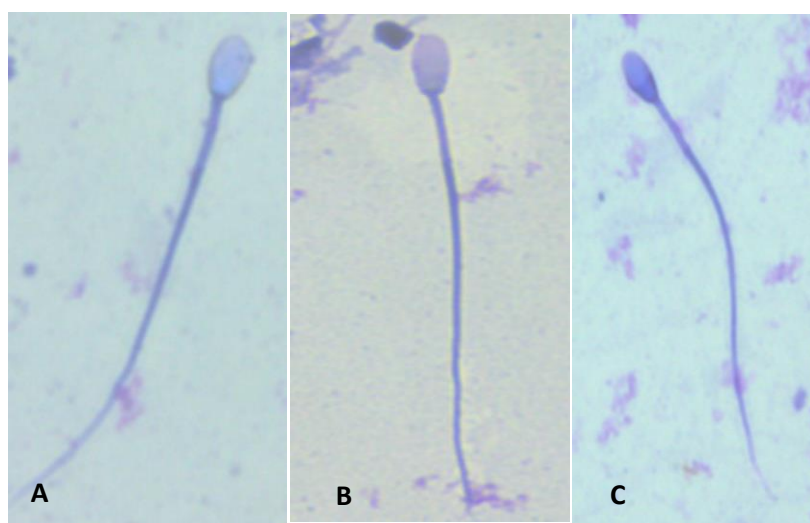


Figura 21. Espermatozoides de llama teñidos con la técnica de triple tinción. **A-** Espermatozoide vivo con acrosoma presente. **B-** Espermatozoide muerto con acrosoma presente y **C-** Espermatozoide muerto con acrosoma dañado o suelto.

Conclusiones

Se pudo implementar la técnica de Triple Tinción para evaluar muestras de espermatozoides de semen fresco de llama. Se observaron la mayoría de los patrones espermáticos de dicha técnica, aunque, a diferencia de otras especies, no se observaron espermatozoides con la región acrosomal de color gris (pérdida de acrosoma). Aunque esta técnica permite evaluar viabilidad y estado acrosomal en un mismo espermatozoide mediante microscopía de campo claro, el excesivo/amplio número de categorías a evaluar, la dificultad en la diferenciación de los patrones y la evaluación subjetiva de la misma no permitiría una amplia aplicación de la misma.

Objetivo particular 2

Evaluar in vitro el efecto de agregar plasma seminal a espermatozoides post-descongelados de llama.

En vistas de que en el presente objetivo particular del plan de tesis se debía implementar la prueba de dispersión de la cromatina espermática para evaluar grado de fragmentación del ADN y con el fin de agilizar los tiempos de trabajo se desarrolló la siguiente actividad:

“Simplificación de la técnica de dispersión de la cromatina espermática para evaluar el grado de fragmentación del ADN en espermatozoides de llama”

La integridad del ADN espermático es considerada un factor de suma importancia para la calidad seminal, para la fertilidad de los machos y también es necesaria para el desarrollo embrionario temprano. Las pruebas de evaluación del ADN espermático no se encuentran dentro de las técnicas que comúnmente se utilizan para determinar la calidad de un eyaculado, generalmente por la complejidad de las mismas. El **objetivo** de este trabajo fue simplificar la técnica de dispersión de la cromatina espermática para evaluar la fragmentación del ADN en espermatozoides de llama, mediante la comparación de la técnica descrita que utiliza dos soluciones de lisis versus una adaptación de un nuevo protocolo que sólo utiliza una solución de lisis.

Materiales y métodos

Se evaluaron un total de 15 eyaculados provenientes de 5 machos de *Lama glama* ($n=5$; $r=3$) obtenidos mediante electroeyaculación bajo anestesia general (Director y col., 2007). En cada muestra se evaluó: volumen, movilidad, concentración, filancia, funcionalidad e integridad de membrana y estado acrosomal. Se realizó la prueba de SCD utilizando el protocolo con dos soluciones de lisis (Carretero y col., 2012) y otro con una sola solución de lisis. En ambos se utilizó como control positivo la incubación del semen con 0,3 M de NaOH.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa R 2.2.1. Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de una prueba t de Student apareada. El nivel de significancia, en todos los análisis fue del 0,05.

Resultados

Las características seminales de rutina fueron (media \pm DE): volumen: $2,1 \pm 1,7$ ml, concentración: $27,9 \pm 17,8 \times 10^6$ espermatozoides/ml, movilidad total: $20,6 \pm 13,6\%$, viabilidad espermática: $49,8 \pm 18,2\%$, funcionalidad de membrana: $27,8 \pm 7,6\%$ e integridad acrosomal: $85,4 \pm 17,9\%$. Todos los eyaculados evaluados presentaron filancia. En ambos protocolos se observaron los mismos patrones: espermatozoides con HG (halo grande), espermatozoides con HM (halo mediano), con HP (halo pequeño) y espermatozoides SH (sin halo). Los patrones HG y HM corresponden a espermatozoides con ADN intacto, mientras que HP y SH corresponden a espermatozoides con ADN fragmentado. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los diferentes patrones entre ambos protocolos (**Figura 22**). Tampoco se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las categorías ADN intacto (HG + HM) y ADN fragmentado (HP + SH) entre los protocolos utilizados. La incubación de las muestras con NaOH fue efectiva para inducir la fragmentación del ADN en ambos protocolos (100% de espermatozoides SH).

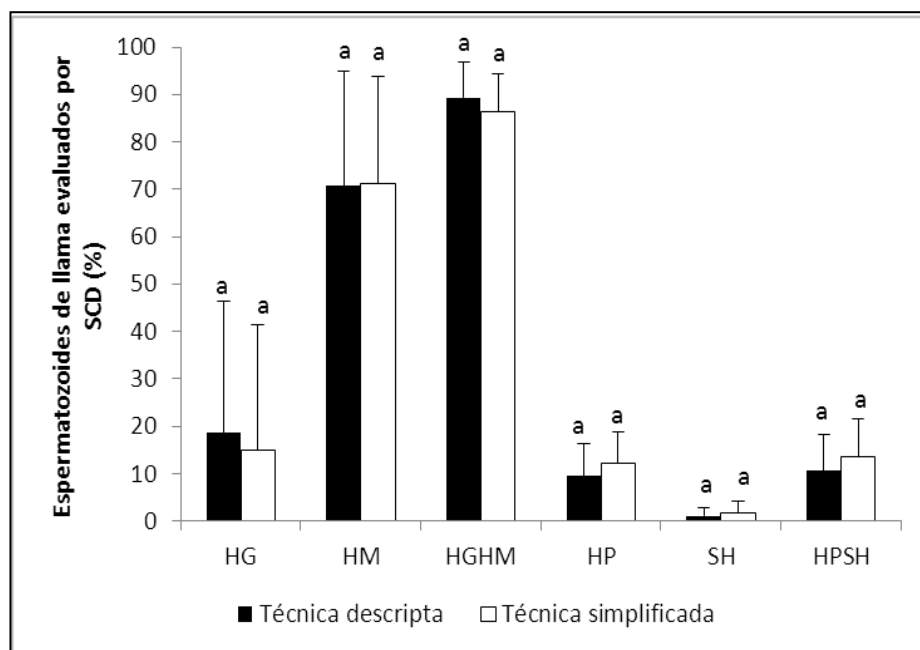


Figura 22. Porcentajes de espermatozoides de llama evaluados mediante la prueba del halo (SCD) con la técnica descripta (2 soluciones de lisis) y la técnica simplificada (1 solución de lisis).

HG: halo grande. **HM:** halo mediano. **HGHM:** sumatoria de HG y HM. **HP:** halo pequeño. **SH:** sin halo. **HPSH:** sumatoria de HP y SH. ^a ($p > 0,05$).

Conclusiones

Se logró simplificar la técnica de SCD para evaluar la fragmentación del ADN en espermatozoides de semen fresco de llama, permitiendo acortar los tiempos de realización de la misma y reducir los insumos a utilizar. Esto permitió incorporar la técnica simplificada a las pruebas de rutina para una evaluación más completa de los eyaculados en los *objetivos particulares 2 y 3*.

Diseño experimental del objetivo particular 2

Se evaluaron un total de 16 eyaculados provenientes de 4 machos adultos de llama ($n=4$; $r=4$). Luego de la evaluación de las características seminales de cada eyaculado, se prosiguió con la incubación del mismo en una solución de colagenasa al 0,1% (Tipo I, Sigma Chemicals®) en HT a 37 °C durante 8 minutos (Giuliano y col., 2010). Esto se realizó con la finalidad de reducir la filancia y separar los espermatozoides del PS. Luego las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y los pellets así obtenidos fueron resuspendidos en el diluyente de criopreservación (**Tabla 5**). Luego de la resuspensión, las muestras fueron llevadas a un rango de concentración espermática final entre 16,5 a 55,0 x 10⁶ espermatozoides/ml y se equilibraron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se envasaron en pajuelas de 0,5 ml y se realizó la curva de congelamiento profundo según la técnica desarrollada en equinos por Miragaya y col. (2001) y adaptada en llamas por Carretero y col. (2015a) (**Figura 23**). La curva de descenso de la temperatura se realizó en tres fases colocando las pajuelas en una mezcla refrigerante de alcohol - acetona con un sensor (termocupla) dentro de un canastillo de bronce. El mismo fue introducido dentro de un termo de nitrógeno de 10 litros, sobre los vapores de nitrógeno líquido. En la primera fase la temperatura descendió desde temperatura ambiente hasta los - 15 °C a una velocidad de entre 10 a 12 °C por minuto. En la segunda fase el descenso de temperatura fue desde los -15 °C a los -120 °C a una velocidad de 25 a 40 °C por minuto. En la tercera y última fase el descenso de la temperatura fue de -120 °C a -196 °C, pasando las pajuelas de la mezcla de alcohol-acetona directamente al nitrógeno líquido. Las mismas se almacenaron a - 196 °C hasta su evaluación. El descongelamiento de las muestras se realizó en un baño térmico a 37 °C durante 60 segundos. Luego del mismo, cada muestra se dividió en tres alícuotas y a cada una de ellas se le agregó diferentes porcentajes de PS proveniente del “pool”: **1-** 0%; **2-** 10% y **3-** 50% de PS (porcentajes finales). Las muestras se incubaron en estufa a 37 °C durante 0; 1,5 y 3 hs; evaluando en cada tiempo la movilidad espermática, funcionalidad de membrana, viabilidad, estado acrosomal y condensación de la cromatina espermática. La morfología espermática y el grado de fragmentación del ADN se evaluaron sólo a tiempo 0 hs. El diseño experimental del *objetivo particular 2* se encuentra a continuación en la **Figura 24**.

Tabla 5. Composición del diluyente de criopreservación utilizado para el congelamiento de espermatozoides de llama, preparación de 100 ml.

Componente	Cantidad (ml)	Marca
Lactosa al 11%	50	Sigma- Aldrich®
EDTA-Glucosa	22,5	Mallinckrodt AR® - Merck®
Yema de huevo	20	Huevos frescos del día
Equex	0,5	Orvus WA Paste® PA
Dimetilformamida	7	Sigma- Aldrich®

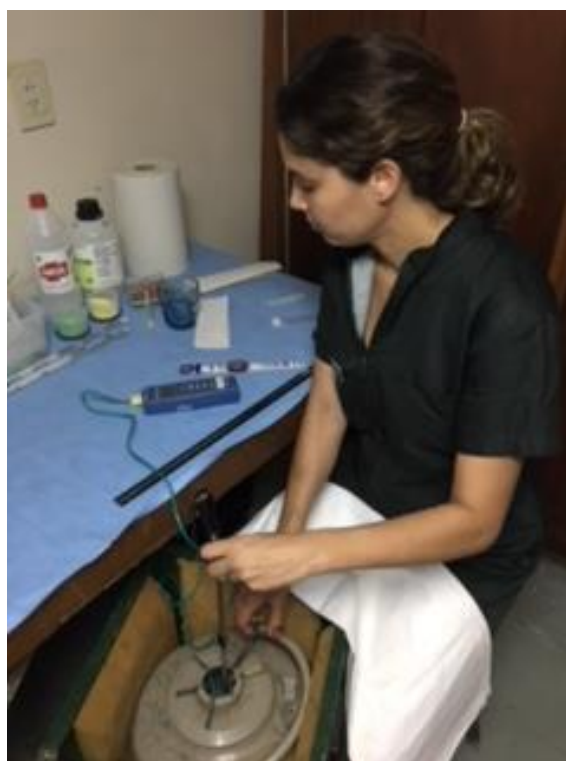


Figura 23. Congelamiento de semen de llama mediante protocolo adaptado de Miragaya y col. (2001)

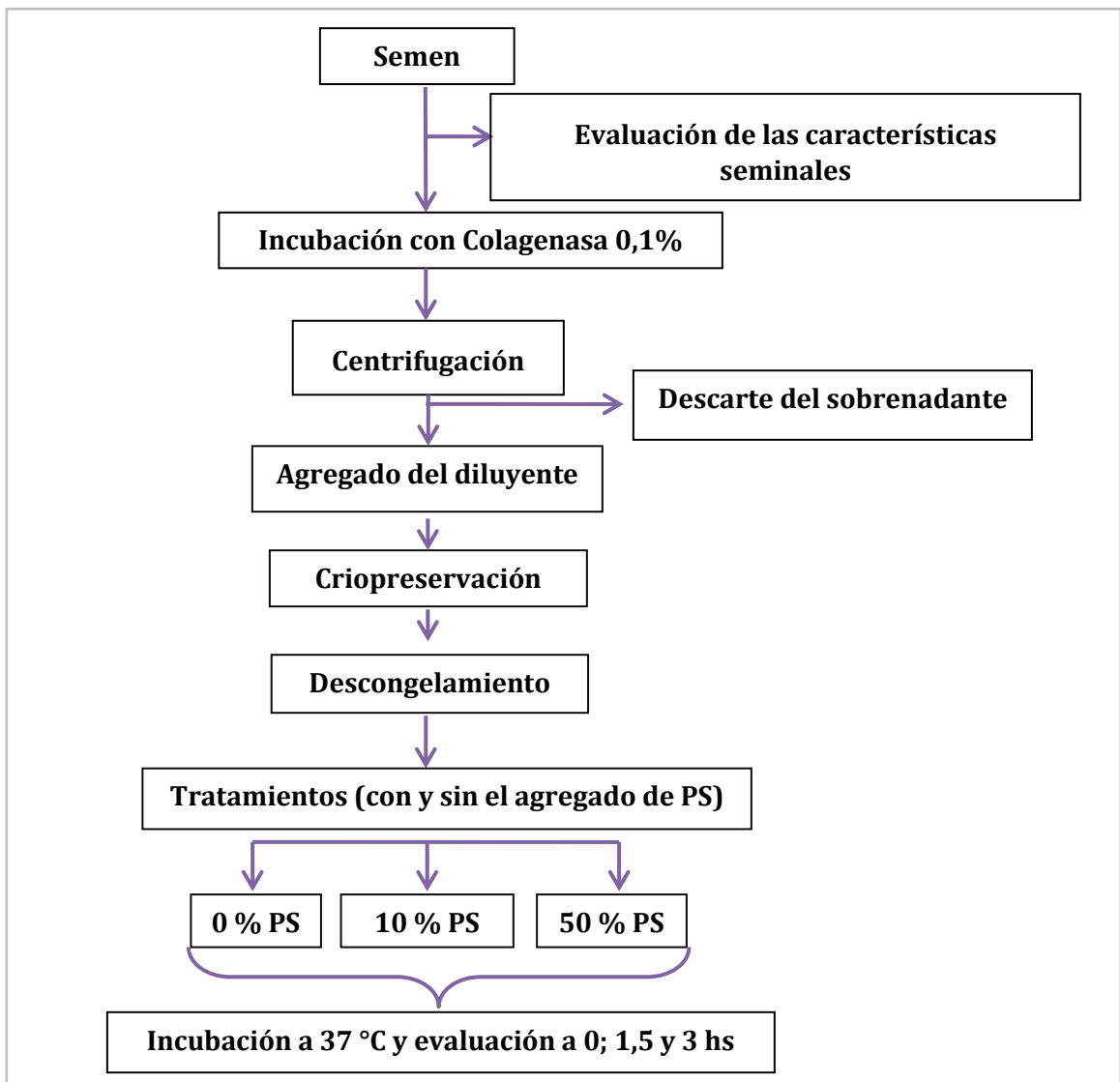


Figura 24. Diseño experimental del *objetivo particular 2*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa R 2.2.1. En todos los casos se comprobó la normalidad de las variables mediante el test de Kolmogorov. El nivel de significancia utilizado en todos los análisis fue del 0,05.

Para analizar la movilidad espermática (oscilatoria, progresiva y total) debido a la falta de normalidad de dichos parámetros se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis entre el porcentaje de PS (0; 10 y 50%) y los tiempos de incubación (0; 1,5 y 3 hs). Para analizar los resultados de viabilidad espermática, funcionalidad de membrana, estado acrosomal y calidad del ADN espermático (condensación y fragmentación) se utilizó un diseño factorial ANOVA de

parcelas divididas en el tiempo (*Split-plot* design) de dos factores con 3 niveles cada uno (el factor porcentaje de PS con los niveles: 0; 10 y 50% de PS; y el factor tiempo de incubación con los niveles: 0; 1,5 y 3 hs), tomando al macho como bloque. El diseño del experimento fue un diseño en bloques completamente aleatorio. También se utilizó un diseño factorial de un factor con cuatro niveles (semen fresco, descongelado 0% PS, descongelado 10% PS y descongelado 50% PS) para comparar las diferentes características seminales entre el semen fresco y el descongelado a tiempo 0 hs.

Resultados Objetivo particular 2

Evaluación del semen fresco

Las características seminales de los eyaculados que se utilizaron para formar el “pool” de PS presentaron valores normales para la especie (media \pm DE): volumen: $3,1 \pm 1,2$ ml; movilidad espermática oscilatoria: $58,0 \pm 8,3\%$; concentración espermática: $57,0 \pm 34,9 \times 10^6$ espermatozoides/ml; funcionalidad de membrana: $28,0 \pm 5,3\%$; integridad de membrana (CFDA/PI): $65,9 \pm 7,7\%$ y estado acrosomal (CB): $96,7 \pm 1,2\%$. Todos los eyaculados presentaron filancia.

Los valores de las características seminales de los eyaculados utilizados en el diseño experimental del objetivo fueron (media \pm DE): volumen: $1,9 \pm 1,5$ ml; movilidad oscilatoria: $57,9 \pm 17,4\%$; funcionalidad de membrana: $31,8 \pm 10,6\%$; integridad de membrana (CFDA/PI): $56,9 \pm 11,8\%$; condensación de la cromatina espermática (AT negativos): $92,3 \pm 7,8\%$ e integridad del ADN (ADN intacto): $92,3 \pm 7,8\%$. La morfología del semen fresco fue (media \pm DE): espermatozoides normales: $40,6 \pm 14,8\%$; espermatozoides con cabezas anormales: $7,3 \pm 6,7\%$; cabezas sueltas: $9,3 \pm 9,1\%$; espermatozoides con cola anormal: $10,4 \pm 2,5\%$; espermatozoides con gota citoplasmática: $27,0 \pm 18,4\%$ y espermatozoides con pieza intermedia anormal: $5,4 \pm 3,3\%$. No todos los eyaculados utilizados en este objetivo presentaron filancia, sin embargo, en los eyaculados sin filancia el patrón de movilidad espermática observado fue oscilatorio. Luego de la incubación de las muestras con colagenasa al 0,1 % los valores de movilidad fueron los siguientes: **MO**: $36,2 \pm 11,0\%$; **MP**: $25,8 \pm 14,8\%$ y **MT**: $62,0 \pm 9,7\%$ (media \pm DE).

Luego de centrifugar las muestras y descartar el sobrenadante (PS + Colagenasa), la movilidad del pellet de espermatozoides resuspendido en el diluyente de criopreservación fue: **MO**: $0,6 \pm 1,2\%$; **MP**: $66,4 \pm 2,9\%$ y **MT**: $67,0 \pm 3,4\%$ (media \pm DE) no existiendo diferencias significativas en la movilidad espermática total con respecto a la observada en semen fresco ($p > 0,05$).

En el **objetivo particular 2** estaba originalmente planteada la realización de la técnica de CB para la determinación de la presencia o ausencia del capuchón acrosomal de las muestras descongeladas. La aplicación de dicha técnica se vio imposibilitada debido a que, en las muestras descongeladas se observaron no sólo los patrones característicos de dicha tinción (acrosoma presente/ausente), sino otros patrones no establecidos, a saber: espermatozoides con puntillado en acrosoma, acrosoma con tinción en zona ecuatorial, acrosomas con tinción intermedia en intensidad del colorante, etc. Esto podría deberse a la interacción de alguno de los componentes del diluyente utilizado con el colorante CB, que imposibilitaría la llegada del mismo a la membrana acrosomal. Debido a que la tinción fluorescente de FITC-PNA/PI ya estaba estandarizada en la especie y en semen descongelado, se utilizó la misma para determinar el estado acrosomal de los espermatozoides de llama en las muestras (0, 10 y 50% de PS) a lo largo de los tiempos de incubación (0; 1,5 y 3 hs).

Comparación del semen fresco y descongelado (0, 10 y 50 % PS) a tiempo 0 hs

Se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) en los porcentajes de movilidad espermática, viabilidad (CFDA/PI y FITC-PNA/PI) y funcionalidad de membrana en los tratamientos (0, 10 y 50% de PS) con respecto al semen fresco. Se pudo observar, mediante FITC-PNA/PI, que el descenso de la viabilidad en las muestras descongeladas ocurrió a expensas de un incremento en el porcentaje de espermatozoides muertos, encontrándose los mismos mayormente reaccionados ($p < 0,05$). A su vez, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado en el semen descongelado (0, 10 y 50% de PS) comparado con los valores hallados en semen fresco. La condensación de la cromatina espermática y la morfología espermática no se vieron modificadas, no existiendo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el semen fresco y las tres concentraciones de PS evaluadas.

Comparación de las muestras descongeladas

Movilidad espermática

No se observaron espermatozoides con un patrón oscilatorio de movilidad al momento del descongelado de las muestras y agregado de PS (0, 10 y 50% PS). Esto también sucedió a lo largo de los tiempos de incubación (0; 1,5 y 3 hs) donde se mantuvieron prácticamente nulos los espermatozoides con MO. Con respecto a la MP y MT, se observó un descenso en todos los tratamientos a lo largo del tiempo, siendo éste significativo entre la hora 0 y 3 de incubación ($p=0,001$). No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en los porcentajes de espermatozoides con MP y MT entre las diferentes concentraciones de PS evaluadas en cada tiempo de incubación (0; 1,5 y 3 hs) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Porcentajes de movilidad oscilatoria (MO), progresiva (MP) y total (MT) en espermatozoides descongelados de llama, incubados a 37 °C con diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) durante 0; 1,5 y 3 horas. Los valores expresados son media \pm DE ($n=4$, $r=4$).

PS (%)	Tiempo (hs)	MO (%)	MP (%)	MT (%)
0	0	0 \pm 0 ^a	29,5 \pm 5,7 ^{a,A}	29,5 \pm 5,7 ^{a,A}
	1,5	0 \pm 0 ^a	16,1 \pm 5,5 ^{ab,A}	16,1 \pm 5,5 ^{ab,A}
	3	0 \pm 0 ^a	8,7 \pm 4,6 ^{b,A}	8,7 \pm 4,6 ^{b,A}
10	0	0 \pm 0 ^a	28,0 \pm 12,3 ^{a,A}	28,0 \pm 12,3 ^{a,A}
	1,5	0 \pm 0 ^a	17,2 \pm 11,4 ^{ab,A}	17,2 \pm 11,4 ^{ab,A}
	3	0 \pm 0 ^a	8,4 \pm 4,4 ^{b,A}	8,4 \pm 4,4 ^{b,A}
50	0	0 \pm 0 ^a	18,9 \pm 12,6 ^{a,A}	19,1 \pm 12,7 ^{a,A}
	1,5	0 \pm 0 ^a	10,0 \pm 10,5 ^{ab,A}	10,0 \pm 10,5 ^{ab,A}
	3	0,2 \pm 1,8 ^a	4,7 \pm 1,7 ^{b,A}	4,9 \pm 2,2 ^{b,A}

^{a,b} Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas dentro de cada tratamiento a lo largo del tiempo de incubación ($p<0,05$). ^A Indica ausencia de diferencias significativas entre tratamientos en cada tiempo de incubación ($p>0,05$).

Filancia

Ninguna de las muestras descongeladas (0, 10 y 50% PS) presentaron filancia en los tiempos de incubación evaluados (0; 1,5 y 3 hs).

Viabilidad espermática

Al momento de descongelar las muestras (hora cero), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los porcentajes de espermatozoides viables (CFDA/PI y FITCPNA/PI) entre los diferentes porcentajes de PS evaluados (0, 10 y 50% PS). A su vez dicho parámetro se conservó a lo largo del tiempo sin modificaciones ($p > 0,05$) (0; 1,5 y 3 hs) (**Figura 25**). A pesar de que no se observaron diferencias significativas, con ambas técnicas se observó una tendencia a una disminución de la cantidad de espermatozoides viables a lo largo del tiempo en todos los porcentajes de PS utilizados (0, 10 y 50%) (**Figura 25**).

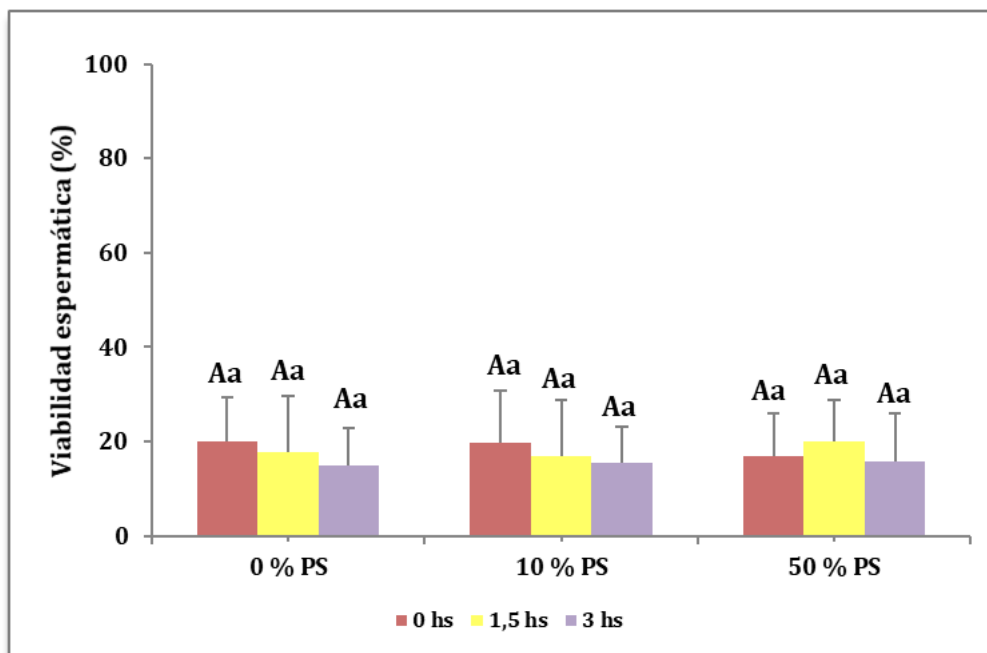


Figura 25. Porcentaje de viabilidad espermática (CFDA/PI) en espermatozoides descongelados de llama, incubados a 37 °C con diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) durante 0; 1,5 y 3 horas (media + DE) ($n=4$, $r=4$).

^a Indica ausencia de diferencias significativas dentro de un tratamiento a lo largo de la incubación ($p > 0,05$).

^A Indica ausencia de diferencias significativas entre tratamientos en un mismo tiempo de incubación ($p > 0,05$).

Funcionalidad de membrana

Al momento de descongelar las muestras (hora cero), no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de espermatozoides con funcionalidad de membrana entre los diferentes porcentajes de PS evaluados (0, 10 y 50% PS). Tampoco se observaron diferencias entre tratamientos en los otros periodos de incubación (1,5 y 3 hs) (**Figura 26**). Sin embargo, se observó una disminución significativa en los porcentajes de espermatozoides con membranas funcionales a lo largo del tiempo de incubación en cada uno de los tratamientos.

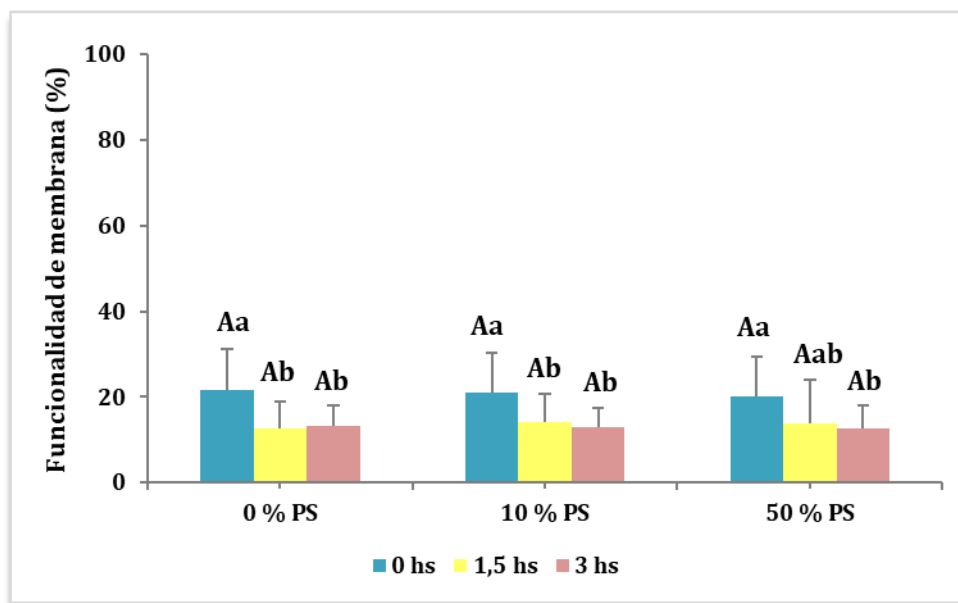


Figura 26. Porcentaje de funcionalidad de membrana (HOS positivos) en espermatozoides descongelados de llama, incubados a 37 °C con diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) durante 0; 1,5 y 3 horas (media + DE) ($n=4$, $r=4$).

^{a,b} Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de un tratamiento a lo largo de la incubación ($p>0,05$). ^A Indica ausencia de diferencias significativas entre tratamientos en un mismo tiempo de incubación ($p>0,05$).

Integridad acrosomal

No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en los diferentes patrones de FITC-PNA/PI entre los tratamientos (0, 10 y 50%) ni en los diferentes tiempos de incubación evaluados (0; 1,5 y 3 hs) (**Tabla 7**). A pesar de ello, se observó una tendencia a una disminución del porcentaje de espermatozoides viables y con acrosomas intactos en todos los tratamientos a través del tiempo.

Tabla 7. Porcentajes de viabilidad y estado acrosomal (FITC-PNA/PI) en espermatozoides de llama descongelados, con el agregado de diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) evaluados en distintos tiempos de incubación (0; 1,5 y 3 hs). Los valores son expresados como media \pm DE ($n=4$, $r=4$).

PS (%)	Tiempo (hs)	Vivos intactos (%)	Vivos reaccionados (%)	Vivos totales (%)	Muertos intactos (%)	Muertos reaccionados (%)	Intactos totales (%)
0	0	20,1 \pm 12,7 ^{a,A}	0,2 \pm 0,4 ^{a,A}	20,3 \pm 12,8 ^{a,A}	22,2 \pm 3,5 ^{a,A}	57,4 \pm 11,9 ^{a,A}	42,3 \pm 11,9 ^{a,A}
	1,5	20,0 \pm 14,1 ^{a,A}	0,1 \pm 0,3 ^{a,A}	20,1 \pm 14,2 ^{a,A}	17,6 \pm 7,5 ^{a,A}	62,3 \pm 14,4 ^{a,A}	37,6 \pm 14,4 ^{a,A}
	3	15,5 \pm 11,1 ^{a,A}	0,5 \pm 1,1 ^{a,A}	16,0 \pm 11,3 ^{a,A}	17,5 \pm 3,9 ^{a,A}	66,4 \pm 11,9 ^{a,A}	33,0 \pm 11,8 ^{a,A}
10	0	20,5 \pm 14,4 ^{a,A}	0,2 \pm 0,6 ^{a,A}	20,7 \pm 14,7 ^{a,A}	28,0 \pm 17,4 ^{a,A}	51,3 \pm 20,0 ^{a,A}	48,5 \pm 19,9 ^{a,A}
	1,5	18,1 \pm 13,3 ^{a,A}	0,1 \pm 0,3 ^{a,A}	18,2 \pm 13,2 ^{a,A}	18,0 \pm 7,3 ^{a,A}	63,7 \pm 15,8 ^{a,A}	36,1 \pm 15,9 ^{a,A}
	3	13,2 \pm 10,9 ^{a,A}	0,1 \pm 0,3 ^{a,A}	13,3 \pm 10,8 ^{a,A}	20,4 \pm 5,6 ^{a,A}	66,2 \pm 10,5 ^{a,A}	33,6 \pm 10,5 ^{a,A}
50	0	20,3 \pm 13,2 ^{a,A}	0,6 \pm 1,5 ^{a,A}	20,9 \pm 13,8 ^{a,A}	21,3 \pm 4,8 ^{a,A}	57,7 \pm 14,5 ^{a,A}	41,6 \pm 14,0 ^{a,A}
	1,5	16,9 \pm 12,4 ^{a,A}	0,1 \pm 0,3 ^{a,A}	17,0 \pm 12,5 ^{a,A}	21,5 \pm 7,7 ^{a,A}	61,4 \pm 12,5 ^{a,A}	38,4 \pm 12,5 ^{a,A}
	3	17,2 \pm 12,7 ^{a,A}	0,1 \pm 0,3 ^{a,A}	17,3 \pm 12,8 ^{a,A}	18,7 \pm 5,3 ^{a,A}	63,9 \pm 14,9 ^{a,A}	35,9 \pm 14,8 ^{a,A}

^a Indica ausencia de diferencias significativas dentro de un tratamiento a lo largo de la incubación ($p>0,05$).

^A Indica ausencia de diferencias significativas entre tratamientos en un mismo tiempo de incubación ($p>0,05$).

ADN espermático

No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con condensación normal de la cromatina (AT negativos) entre los diferentes porcentajes de PS utilizados ni tampoco en los tiempos de incubación (**Tabla 8**). Tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con ADN intacto (no fragmentado) entre las diferentes muestras luego del descongelamiento (**Tabla 9**).

Tabla 8. Porcentaje de espermatozoides de llama de los diferentes patrones de azul de toluidina (AT negativos, intermedios y positivos) en muestras descongeladas de llama, incubadas a 37 °C con diferentes concentraciones de PS (0, 10 y 50%) durante 0; 1,5 y 3 horas ($n=4$, $r=4$).

PS (%)	Tiempo (hs)	AT negativos (%)	AT intermedios (%)	AT positivos (%)
0	0	92,8 ± 6,7 ^{Aa}	6,5 ± 5,9 ^{Aa}	0,7 ± 0,8 ^{Aa}
	1,5	96,2 ± 1,0 ^{Aa}	3,0 ± 1,1 ^{Aa}	0,8 ± 0,6 ^{Aa}
	3	91,5 ± 9,4 ^{Aa}	7,8 ± 8,6 ^{Aa}	0,7 ± 0,8 ^{Aa}
10	0	92,1 ± 6,9 ^{Aa}	6,4 ± 5,2 ^{Aa}	1,5 ± 1,7 ^{Aa}
	1,5	96,8 ± 1,2 ^{Aa}	2,9 ± 1,1 ^{Aa}	0,3 ± 0,2 ^{Aa}
	3	92,1 ± 7,3 ^{Aa}	6,7 ± 6,0 ^{Aa}	1,2 ± 1,3 ^{Aa}
50	0	93,1 ± 6,4 ^{Aa}	5,9 ± 5,3 ^{Aa}	1,0 ± 1,3 ^{Aa}
	1,5	96,1 ± 2,6 ^{Aa}	3,3 ± 1,8 ^{Aa}	0,6 ± 0,8 ^{Aa}
	3	91,9 ± 9,0 ^{Aa}	6,7 ± 6,2 ^{Aa}	1,4 ± 2,8 ^{Aa}

^a Indica ausencia de diferencias significativas dentro de un tratamiento a lo largo de la incubación ($p>0,05$).^A Indica ausencia de diferencias significativas entre tratamientos en un mismo tiempo de incubación ($p>0,05$).

Tabla 9. Patrones de espermatozoides de llama evaluados mediante la técnica de SCD (HG: halo grande, HM: halo mediano, HP: halo pequeño, SH: sin halo) en muestras descongeladas tratadas con diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%). Los valores son expresados como media \pm DE ($n=4$; $r=4$).

Integridad del ADN (%)	0 % PS	10 % PS	50 % PS
HG	32,7 \pm 24,7 ^a	30,5 \pm 22,8 ^a	27,2 \pm 22,6 ^a
HM	40,9 \pm 11,5 ^a	45,6 \pm 14,7 ^a	49,7 \pm 18,7 ^a
HG + HM	73,6 \pm 16,8 ^a	76,1 \pm 21,0 ^a	76,9 \pm 23,4 ^a
HP	23,5 \pm 14,8 ^a	19,8 \pm 18,4 ^a	21,2 \pm 21,4 ^a
SH	2,9 \pm 2,4 ^a	4,1 \pm 3,7 ^a	1,9 \pm 2,4 ^a
HP + SH	26,4 \pm 16,8 ^a	23,9 \pm 21,0 ^a	23,1 \pm 23,4 ^a

^a Indica ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$).

Morfología espermática

El agregado de diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) a las muestras descongeladas no modificó la morfología espermática ($p>0,05$) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Morfología de espermatozoides de llama congelados-descongelados tratados con diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%). Los valores son expresados en media \pm DE ($n=4$; $r=4$).

Morfología espermática (%)	0 % PS	10 % PS	50 % PS
Espermatozoides normales	38,4 \pm 16,3 ^a	41,0 \pm 20,6 ^a	38,3 \pm 17,0 ^a
Espermatozoides con cabezas anormales	9,3 \pm 8,4 ^a	9,5 \pm 6,9 ^a	11,3 \pm 7,8 ^a
Espermatozoides con cabezas sueltas	12,9 \pm 11,8 ^a	11,5 \pm 10,5 ^a	11,7 \pm 8,7 ^a
Espermatozoides con colas anormales	14,2 \pm 7,5 ^a	12,7 \pm 4,4 ^a	11,0 \pm 6,7 ^a
Espermatozoides con gotas citoplasmáticas	19,6 \pm 14,4 ^a	18,8 \pm 13,7 ^a	17,8 \pm 13,9 ^a
Espermatozoides con piezas intermedias anormales	5,6 \pm 3,2 ^a	6,5 \pm 2,1 ^a	9,9 \pm 6,4 ^a

^a Indica ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$).

Objetivo particular 3

Evaluar in vitro el efecto del agregado de plasma seminal previo al proceso de criopreservación sobre espermatozoides post-descongelados de llama.

Diseño experimental

Se evaluaron un total de 15 eyaculados provenientes de 5 machos adultos de llama ($n=5$; $r=3$). Luego de la evaluación de las características seminales de cada eyaculado se prosiguió con la incubación en una solución de colagenasa al 0,1% en HT a 37 °C durante 8 minutos (Giuliano y col., 2010), con la finalidad de reducir la filancia y poder separar a los espermatozoides del PS. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y los pellets así obtenidos fueron resuspendidos en el diluyente de criopreservación (**Tabla 5**) con diferentes porcentajes de PS: **1-** 0% PS (solo diluyente); **2-** 10% PS (90 % de diluyente) y **3-** 50% PS (50% de diluyente). Las muestras fueron llevadas a un rango de concentración espermática final entre 12,5 a 50,0 x 10⁶ espermatozoides/ml y en cada muestra se respetó la misma concentración para cada uno de los tratamientos. Luego, se equilibraron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente, se envasaron en pajuelas de 0,5 ml y se realizó la misma curva de congelamiento profundo que se empleó en el objetivo particular 2. El descongelamiento se realizó en un baño térmico a 37 °C durante 60 segundos. Posteriormente, se evaluaron las características espermáticas previamente descriptas en los diferentes tratamientos (10 y 50% de PS). El diseño experimental del objetivo se encuentra a continuación en la **Figura 27**.

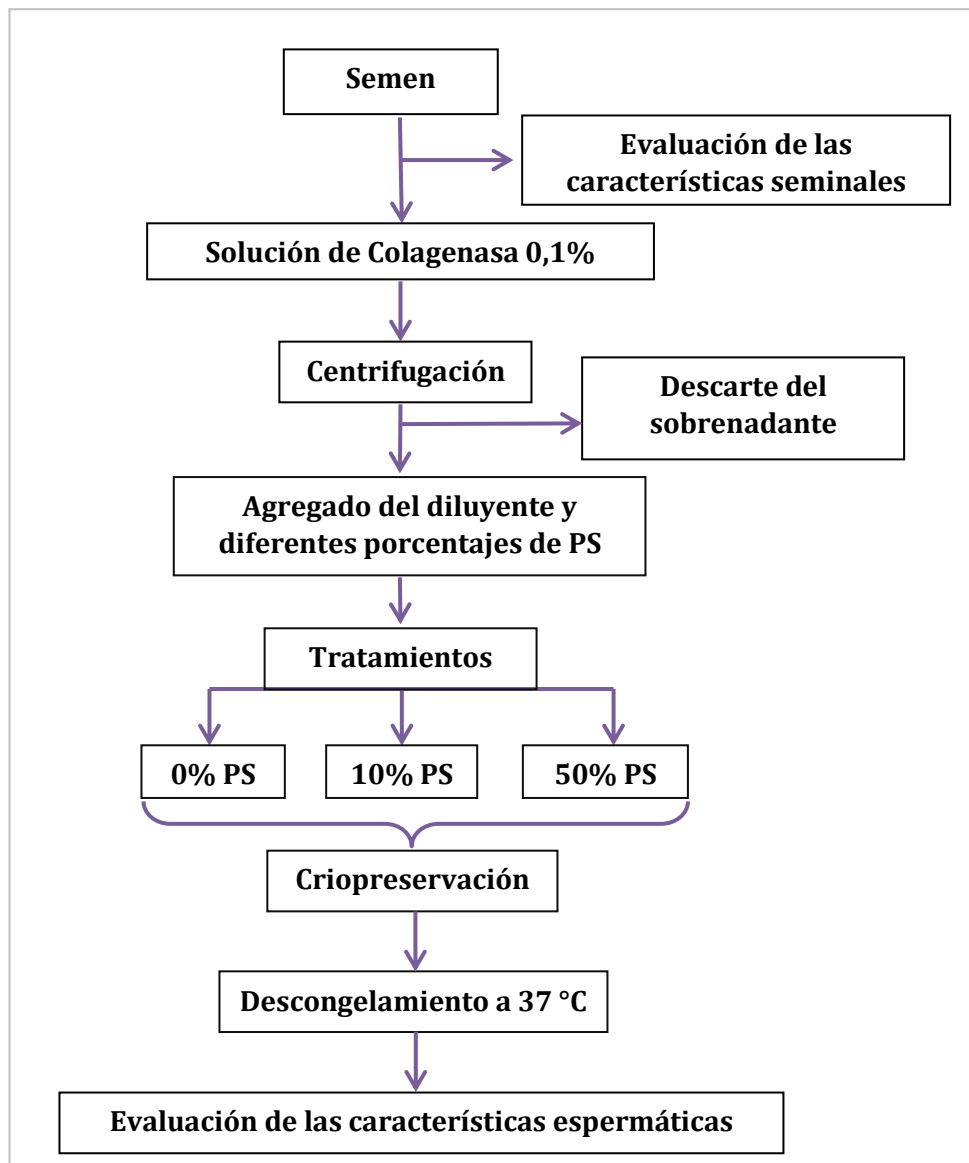


Figura 27. Diseño experimental del *objetivo particular 3*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa R 2.2.1. En todos los casos se comprobó la normalidad de las variables mediante el test de Kolmogorov. El nivel de significancia utilizado en todos los análisis fue del 0,05. El diseño del experimento fue un diseño en bloques completamente aleatorio (tomando al macho como bloque). Las variables espermáticas movilidad total, funcionalidad de membrana y condensación de la cromatina espermática dieron normales mediante el test de Kolmogorov; para los resultados de estas variables se utilizó un diseño factorial ANOVA de cuatro niveles (fresco, 0% PS, 10% PS y 50%

PS). Para el resto de las variables analizadas (movilidad oscilatoria, movilidad total, viabilidad espermática, morfología e integridad del ADN) se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis debido a que estas variables no tuvieron una distribución normal.

Resultados Objetivo particular 3

Evaluación del semen fresco

Las características seminales de los eyaculados que se utilizaron para formar el pool de PS del presente objetivo presentaron valores normales para la especie (media \pm DE): volumen: $2,2 \pm 0,9$ ml; movilidad oscilatoria: $20,6 \pm 19,5\%$; concentración: $47,5 \pm 44,3 \times 10^6$ espermatozoides/ml; funcionalidad de membrana: $30,0 \pm 9,8\%$; integridad de membrana (viabilidad): $51,1 \pm 20,2\%$ y estado acrosomal (CB): $91,9 \pm 16,0\%$. Todos los eyaculados presentaron filancia.

Los valores de las características seminales de los eyaculados utilizados en el diseño experimental del *objetivo particular 3* fueron (media \pm DE): volumen: $1,3 \pm 1,2$ ml; movilidad oscilatoria: $37,0 \pm 13,8 \%$; movilidad progresiva: $4,3 \pm 9,0\%$; movilidad total (MO + MP): $40,3 \pm 16,7\%$; funcionalidad de membrana: $40,6 \pm 16,5\%$; integridad de membrana (viabilidad): $66,3 \pm 11,5\%$; condensación de la cromatina espermática (AT negativos): $96,1 \pm 2,9\%$ e integridad del ADN (no fragmentados): $92,1 \pm 4,7\%$. La morfología del semen fresco fue (media \pm DE): espermatozoides normales: $28,8 \pm 14,8 \%$; espermatozoides con cabezas anormales: $6,9 \pm 5,9\%$; cabezas sueltas: $11,6 \pm 9,4 \%$; espermatozoides con colas anormales: $15,7 \pm 7,2\%$; espermatozoides con gotas citoplasmáticas: $31,9 \pm 18,1\%$ y espermatozoides con piezas intermedias anormales: $5,1 \pm 3,4\%$. No todos los eyaculados utilizados en el estudio presentaron filancia. Con respecto a la tinción fluorescente de FITC-PNA/PI, los valores observados en el semen fresco fueron (media \pm DE): vivos intactos: $63,5 \pm 12,8\%$; vivos reaccionados: $1,9 \pm 2,5\%$; vivos totales (intactos + reaccionados): $65,4 \pm 11,1\%$; muertos intactos: $11,8 \pm 4,3\%$; muertos reaccionados: $22,8 \pm 12,2\%$ e intactos totales (vivos con acrosomas intactos + muertos con acrosomas intactos): $75,3 \pm 14,9\%$.

Previo al proceso de criopreservación de las muestras se evaluó nuevamente la movilidad espermática de cada una de las concentraciones finales de PS (0, 10 y 50%), los valores observados se encuentran en la **Tabla 11**. La movilidad de las muestras diluidas previo

a congelar fue principalmente progresiva, mientras que en el semen fresco se observaron mayormente espermatozoides que se movían de forma oscilatoria. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en la MT de las muestras diluidas con los diferentes porcentajes de PS previo al congelamiento con respecto a los valores observados en semen fresco ($p>0,05$). Tampoco se observaron diferencias significativas en cada patrón de movilidad (MO, MP y MT) al comparar los diferentes tratamientos previo al proceso de criopreservación (0, 10 y 50% PS).

Similar al *objetivo particular 2*, en el presente objetivo fue necesario reemplazar la tinción de CB por la técnica de FITC-PNA/PI.

Tabla 11. Movilidad espermática en el semen fresco y en las muestras diluidas con diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) previo al proceso de criopreservación. **MO:** movilidad oscilatoria; **MP:** movilidad progresiva y **MT:** movilidad total (media \pm DE) ($n=5$; $r=3$).

	MO (%)	MP (%)	MT (%)
Fresco	37,0 \pm 13,8 ^a	4,3 \pm 9,0 ^a	40,3 \pm 16,7 ^a
0 % PS	0 \pm 0 ^b	50,6 \pm 9,1 ^b	50,6 \pm 9,1 ^a
10 % PS	1,0 \pm 3,8 ^b	50,6 \pm 9,0 ^b	51,6 \pm 7,9 ^a
50 % PS	5,3 \pm 11,7 ^b	40,7 \pm 17,2 ^b	46,0 \pm 14,4 ^a

^{a,b} Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de un patrón de movilidad espermática ($p<0,05$).

Comparación del semen fresco y descongelado (0, 10 y 50 % de PS)

Se observó un descenso significativo ($p<0,05$) en los porcentajes de movilidad espermática, viabilidad (CFDA/PI y FITC-PNA/PI) y funcionalidad de membrana en las muestras descongeladas (0, 10 y 50% PS) respecto al semen fresco. A partir de la evaluación con FITC-PNA/PI se determinó que el descenso en el porcentaje de espermatozoides vivos ocurrió a expensas de un incremento en el porcentaje de espermatozoides muertos reaccionados ($p<0,05$). También, se observó un aumento significativo ($p<0,05$) en el

porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado en todas las muestras descongeladas con respecto a los valores del semen fresco. Por otro lado, la condensación de la cromatina no se vio afectada por el proceso de congelamiento-descongelamiento en ninguno de los tratamientos ($p>0,05$) y tampoco se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en la morfología espermática entre el semen fresco y el semen descongelado (0, 10 y 50% PS).

Comparación de las muestras descongeladas

Sólo las muestras que fueron congeladas con 50% de PS presentaron MO al descongelamiento, aunque los porcentajes fueron muy bajos (0 – 5%). Al descongelamiento, las muestras congeladas con 0 y 10 % de PS presentaron porcentajes de MP y MT significativamente mayores ($p<0,05$) que las muestras congeladas con 50% de PS (**Figura 28**). No se observó filancia al descongelar las muestras que fueron congeladas sin PS, mientras que algunas de las muestras a las que se agregó PS antes del congelamiento conservaron la capacidad de formar un hilo. Alrededor del 6% (1/15) de las muestras tratadas con 10% de PS mostraron filancia, mientras que alrededor del 46% (7/15) de las muestras tratadas con 50% de PS presentaron dicha característica al descongelado. Aunque se observó un menor porcentaje de espermatozoides vivos (CFDA/PI y FITC-PNA/PI) y con sus membranas funcionales en las muestras congeladas con 50% de PS, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en dichas características espermáticas entre las tres concentraciones de PS utilizadas (**Figura 29 – Tabla 12**). En cuanto a la calidad del ADN espermático, tanto en la condensación de la cromatina como en la integridad del mismo, no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre las muestras descongeladas. La morfología espermática fue similar ($p>0,05$) entre los tres tratamientos (0, 10 y 50% de PS) para todas las categorías analizadas (**Tabla 13**).

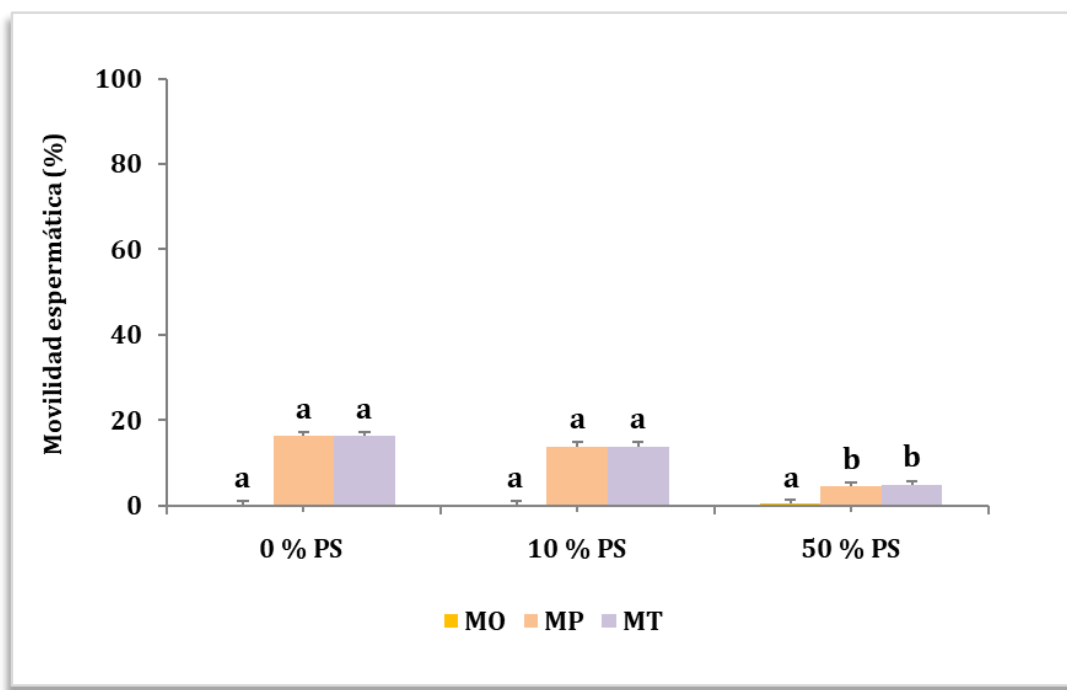


Figura 28. Porcentaje de movilidad espermática oscilatoria (MO), progresiva (MP) y total (MT) en espermatozoides descongelados de llama congelados con diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) (media \pm DE) ($n=5$, $r=3$).

^{a,b} Letras diferentes indican diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (0, 10 y 50% PS) dentro de cada variable (MO, MP y MT) ($p < 0,05$).

Tabla 12. Porcentajes de viabilidad y estado acrosomal (FITC-PNA/PI) en espermatozoides descongelados de llama con el agregado de diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) previo al congelamiento de las muestras. Los valores son expresados como media \pm DE ($n=5$; $r=3$).

<i>Categoría espermática (%)</i>	0 % PS	10 % PS	50 %PS
<i>Vivos intactos</i>	13,8 \pm 6,4 ^a	11,1 \pm 4,9 ^a	8,7 \pm 5,6 ^a
<i>Vivos reaccionados</i>	0,1 \pm 0,2 ^a	-	0,1 \pm 0,2 ^a
<i>Vivos totales</i>	13,9 \pm 6,4 ^a	11,1 \pm 4,9 ^a	8,8 \pm 5,6 ^a
<i>Muertos intactos</i>	26,7 \pm 8,5 ^a	29,7 \pm 11,8 ^a	31,9 \pm 13,0 ^a
<i>Muertos reaccionados</i>	59,4 \pm 11,2 ^a	59,2 \pm 13,8 ^a	59,3 \pm 15,9 ^a
<i>Intactos totales</i>	40,5 \pm 11,1 ^a	40,8 \pm 13,8 ^a	40,6 \pm 16,0 ^a

^a Indica ausencia de diferencias significativas entre tratamientos en los diferentes patrones de FITC-PNA/PI evaluados ($p > 0,05$)

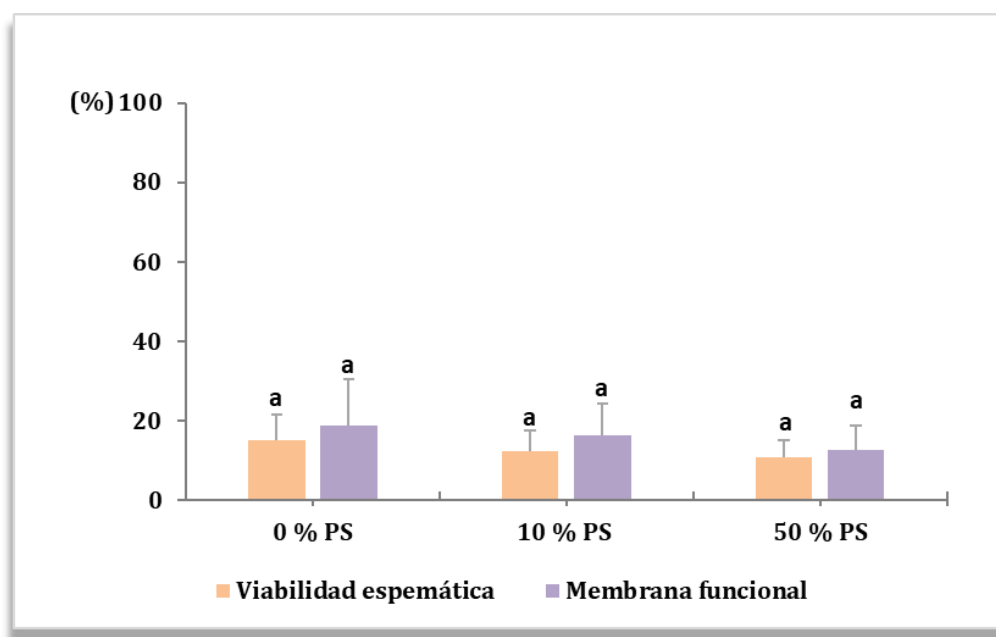


Figura 29. Porcentaje de espermatozoides viables (CFDA/PI) y con funcionalidad de membrana (HOS positivo) en semen descongelado de llama, congelado con diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) (media \pm DE) ($n=5$, $r=3$).^a Indica ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$).

Tabla 13. Variables espermáticas (condensación de la cromatina, integridad del ADN y morfología) evaluadas en espermatozoides descongelados de llama, con el agregado de diferentes porcentajes de PS (0, 10 y 50%) previo a la congelación de las muestras. Los valores son expresados como media \pm DE ($n=5$; $r=3$).

Variables espermáticas (%)	0% PS	10% PS	50% PS
<i>AT negativo</i>	94,9 \pm 2,9 ^a	94,6 \pm 2,4 ^a	94,8 \pm 2,5 ^a
<i>ADN intacto (SCD)</i>	85,0 \pm 6,6 ^a	80,0 \pm 11,7 ^a	87,0 \pm 8,5 ^a
Morfología (%)			
<i>Normales</i>	39,5 \pm 14,9 ^a	38,3 \pm 14,9 ^a	36,0 \pm 14,9 ^a
<i>Cabezas anormales</i>	9,7 \pm 7,2 ^a	8,7 \pm 5,4 ^a	9,9 \pm 5,7 ^a
<i>Cabezas sueltas</i>	6,4 \pm 7,4 ^a	6,9 \pm 6,3 ^a	9,4 \pm 10,3 ^a
<i>Colas anormales</i>	16,0 \pm 9,5 ^a	16,5 \pm 9,7 ^a	14,9 \pm 9,1 ^a
<i>Gotas citoplasmáticas</i>	24,2 \pm 15,6 ^a	26,1 \pm 16,7 ^a	25,8 \pm 18,0 ^a
<i>Piezas intermedias anormales</i>	4,2 \pm 2,6 ^a	3,5 \pm 1,8 ^a	4,0 \pm 2,0 ^a

^a Indica ausencia de diferencias significativas entre los tratamientos para cada variable evaluada ($p>0,05$).

Objetivo particular 4

Obtener preñez con semen congelado de llama

Diseño Experimental

Congelamiento de espermatozoides para IA

Debido a que ninguno de los protocolos de criopreservación desarrollados en la presente tesis (*objetivos particulares 2 y 3*) demostró ser superior frente a los otros en la evaluación *in vitro*, para la IA se decidió utilizar el protocolo de congelamiento que posee mayor practicidad y que permite acortar los tiempos de trabajo: sin el agregado de plasma seminal ni previo ni posterior al descongelado (0% PS). Para ello se obtuvieron un total de 16 eyaculados provenientes de 4 machos adultos de llama de fertilidad probada ($n=4$; $r=4$). Luego de la evaluación de las características seminales de cada eyaculado y determinando que se encontraban dentro de los valores normales para la especie, se prosiguió con la incubación de los mismos en una solución de colagenasa al 0,1% en HT a 37 °C durante 8 minutos (Giuliano y col., 2010), con la finalidad de reducir la filancia y separar a los espermatozoides del PS. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y los pellets así obtenidos se resuspendieron en el diluyente de criopreservación (**Tabla 5**). Inmediato a la resuspensión se evaluó la movilidad espermática de la muestra diluida. Luego de 20 minutos de equilibramiento a temperatura ambiente las muestras se envasaron en pajuelas de 0,5 ml y se procedió a realizar la curva de congelamiento profundo según técnica desarrollada en equinos por Miragaya y col. (2001) y adaptada en llamas por Carretero y col. (2015a), similar a la utilizada en los *objetivos particulares 2 y 3*. Las muestras fueron descongeladas a una temperatura de 37 °C durante 60 segundos en el momento que se realizó la IA de las hembras.

Seguimiento de las hembras para IA

Para realizar la IA se utilizaron 10 hembras *Lama glama* entre 3 y 12 años de edad con fertilidad probada, en las cuales la dinámica folicular fue monitoreada por palpación y ultrasonografía transrectal. La revisión se realizó hasta detectar un folículo en crecimiento, momento en que las hembras comenzaron a ser revisadas en forma diaria. Ante la presencia

de un folículo dominante (≥ 7 mm de diámetro), se administró una única dosis de 8 μ g de busserelina (Receptal®, Intervet) vía endovenosa para inducir la ovulación (Giuliano y col., 2012a). A partir de las 24 hs de la inducción cada hembra fue revisada nuevamente mediante palpación y ultrasonografía transrectal cada 2 hs hasta determinar la desaparición del folículo dominante y consecuentemente la ovulación, momento en el cual se procedió a descongelar el eyaculado. La calidad de los espermatozoides descongelados fue evaluada simultáneamente a la preparación de la hembra para la realización de la IA. La inseminación se realizó por vía transcervical depositando la muestra lo más cercano posible a la unión uterotubárica del cuerno uterino ipsilateral al ovario en el que se detectó la ovulación (Giuliano y col., 2012a) **(Figura 30 y 31).**

Para realizar la IA, se conformaron dos grupos de hembras. Por un lado, 7 llamas fueron inseminadas cada una con un eyaculado completo congelado-descongelado proveniente de un macho de llama. Con el objetivo de alcanzar el número mínimo de espermatozoides viables reportado en la especie para lograr preñez con semen criopreservado (Giuliano y col., 2012), en el segundo grupo, 3 hembras fueron inseminadas cada una con un “pool” de tres eyaculados de llama congelados-descongelados. Para ello, previo a la IA de cada hembra, se descongelaron 3 eyaculados en forma individual y, posteriormente, se unieron para realizar la inseminación mediante un único enhebrado cervical.



Figura 30. A- Materiales utilizados para la IA con semen congelado, **B-** Pistolette Cassou y vaina de inseminación.



Figura 31. Procedimiento de IA con semen criopreservado en la llama. **A-** Armado del pistolete Cassou y la vaina de inseminación. **B-** Carga de la vaina de inseminación con la muestra congelada-descongelada. **C-** Enhebrado transcervical con ayuda transrectal.

El diagnóstico de la gestación se realizó en todas las hembras por ultrasonografía transrectal, 21 días pos-ovulación mediante la visualización de la vesícula embrionaria. A los 24 días se repitió la revisión para determinar la viabilidad embrionaria mediante la presencia de latido cardíaco. Los protocolos utilizados con las hembras de llama fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), identificado con el número 2015/27. En la **Figura 32** se detalla el diseño experimental del *objetivo particular 4*.

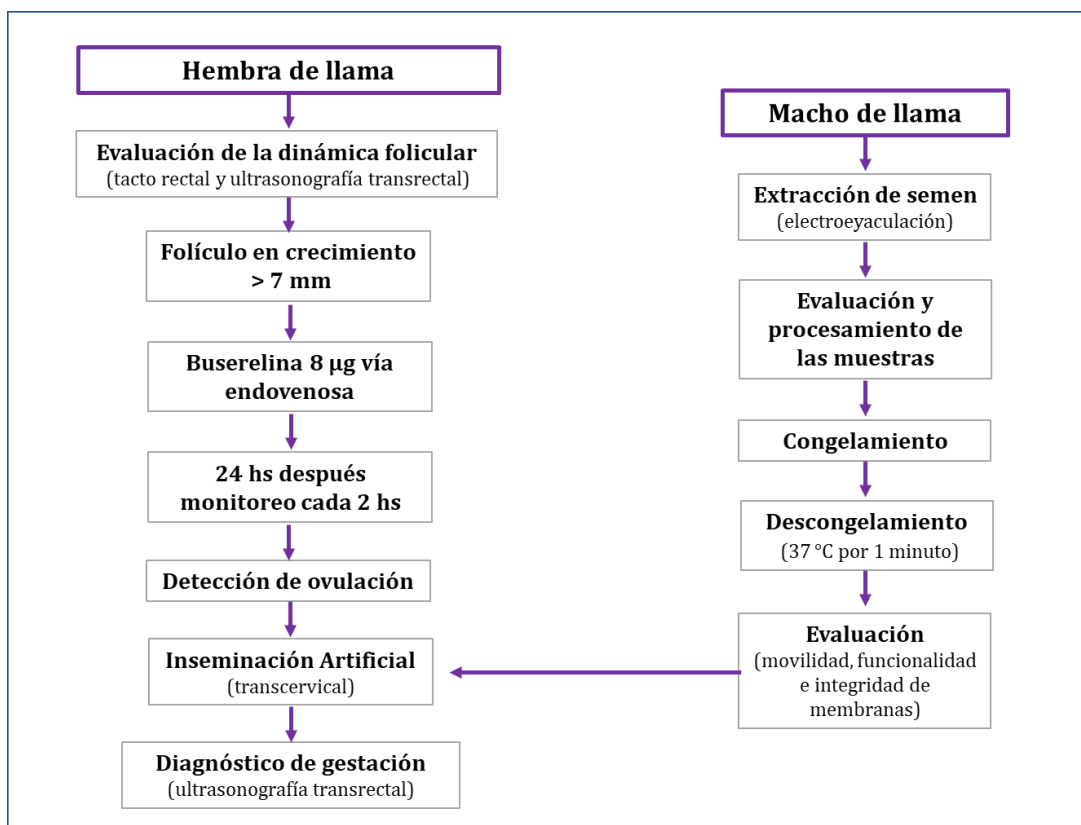


Figura 32. Diseño experimental del *objetivo particular 4*.

Resultados Objetivo particular 4

Debido a que los reportes que obtuvieron preñez con semen criopreservado en la llama realizaron la IA luego de la detección de la ovulación (Giuliano y col., 2012a), en la presente tesis se comenzó a trabajar con el *grupo B* de hembras planteado en el plan de tesis (IA luego de detectada la ovulación). En las 7 hembras que fueron inseminadas cada una con un eyaculado completo el valor medio de la dosis inseminante fue de 9,4 millones de espermatozoides viables. Los valores medios de las características espermáticas de dichos eyaculados al descongelado se encuentran en la **Tabla 14**.

Como se mencionó previamente, debido a que los valores de viabilidad espermática de las muestras congeladas-descongeladas sin PS no llegaron a los valores preestablecidos en la especie para obtener preñez con semen criopreservado se procedió a unir varios eyaculados con la finalidad de alcanzar la misma. Con este protocolo la media de espermatozoides viables que conformaron la dosis fue de 12,3 millones de espermatozoides. Los valores de las variables

espermáticas medias de las dosis conformadas por los múltiples eyaculados se encuentran a continuación en la **Tabla 14**.

En ambos protocolos de IA el intervalo desde la inducción de la ovulación hasta la detección de la ovulación fue de $28,8 \pm 1,0$ hs (media \pm DE). En la **Figura 33** se pueden observar imágenes ultrasonográficas de folículos de llama momentos previos a la ovulación.

No se obtuvieron preñeces con ambos protocolos de criopreservación de espermatozoides de llama aplicado, tanto cuando se utilizó un eyaculado completo como cuando se utilizaron varios eyaculados para conformar la dosis inseminante (**Figura 34 y 35**). Debido a estos resultados, el *Grupo A* de hembras de llama en las cuales se realizaría la IA a tiempo fijo 24 hs después de la inducción de ovulación (confirmando mediante ultrasonografía que no hubieran ovulado) no se realizó.

Tabla 14. Valores de las características espermáticas en muestras descongeladas para la inseminación artificial de las hembras de llama (media \pm DE).

Protocolo IA	Volumen (ml)	Movilidad progresiva (%)	Viabilidad espermática (%)	Funcionalidad de membrana (%)	Vivos totales (10^6 esp.)
Un eyaculado	$1,1 \pm 0,5$	$25,0 \pm 10,0$	$22,8 \pm 12,8$	$26,7 \pm 13,4$	$9,4 \pm 7,6$
Múltiples eyaculados	$3,5 \pm 1,7$	$15,3 \pm 6,4$	$17,3 \pm 15,1$	$22,6 \pm 15,1$	$12,3 \pm 0,4$

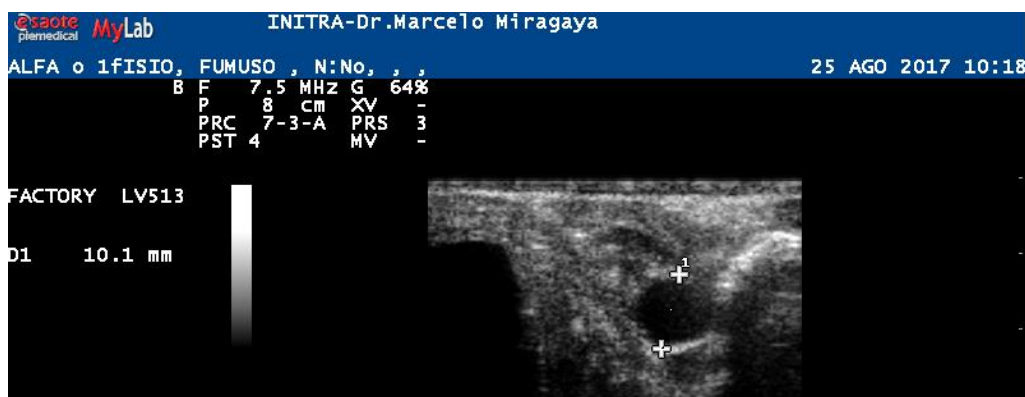


Figura 33. Imagen de un folículo preovulatorio en una hembra de llama, obtenida mediante ultrasonografía transrectal momentos previos a la ovulación.



Figura 34. Procedimiento de diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía transrectal en la llama, utilizando un transductor lineal de 5 MHz.

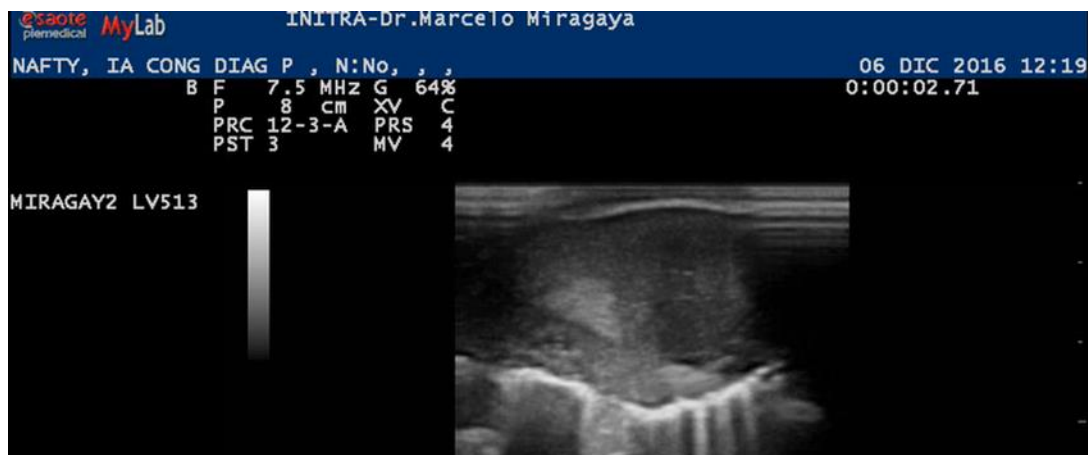


Figura 35. Imagen de un corte longitudinal del cuerpo uterino de una hembra de llama en el momento de diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía transrectal en el día 21 luego de la IA (ausencia de preñez).

Discusión

Efecto del plasma seminal en espermatozoides de semen fresco de llama

El PS es un fluido complejo que está compuesto por iones inorgánicos, sales orgánicas, diferentes azúcares, proteínas y diversas hormonas. Parte de este fluido proviene de los túbulos seminíferos y del epidídimo y, al momento de la eyaculación se une con las secreciones de las glándulas accesorias del macho. El PS cumple diferentes funciones en la fisiología reproductiva; es un medio de nutrición y protección para los espermatozoides, permite el transporte de los mismos a través del tracto reproductor del macho y de la hembra, y particularmente, en los CSA posee componentes proteicos involucrados en el proceso de ovulación (Ratto y col., 2005; Adams y Ratto., 2013 *review*; Tribulo y col., 2015; Silva y col., 2015; Berland y col., 2016). Por otro lado, el PS de los CSA posee características reológicas particulares. Dentro de ellas se puede citar su elevada viscosidad estructural (Casaretto y col., 2012) y su capacidad de formar hilo, que disminuye con la incubación en presencia de enzimas proteolíticas (Giuliano y col., 2010; Kershaw-Young y col., 2013; 2017). En los últimos años, se ha demostrado la compleja interacción que el PS posee con el epitelio oviductal en la llama, permitiendo la formación de reservorios espermáticos (Apichela y col., 2014). Sin embargo, a pesar de las diferentes funciones atribuidas al PS, todavía quedan muchas incógnitas a dilucidar en lo que respecta al rol que cumple el mismo sobre la fisiología espermática de los CSA. Se ha establecido que el efecto que ejerce el PS sobre los espermatozoides difiere según la especie e incluso, es diferente entre individuos de una misma especie (*Rumiantes*: Graham J.K., 1994; Domínguez y col., 2008; Leahy y col., 2010; *Equinos*: Aurich y col., 1996; Moore y col., 2005; Morrel y col., 2010; *Camélidos*: Kershaw-Young y Maxwell 2011; Carretero y col., 2015c; 2016; 2017b).

Una de las particularidades de los eyaculados de los CSA es que sólo se observa en ellos movilidad espermática oscilatoria, con muy baja o nula cantidad de espermatozoides con movilidad progresiva en el semen fresco (0 a 1% MP) (Giuliano y col., 2008; 2010). A su vez, se demostró que la cantidad de espermatozoides con MO en semen fresco no correlaciona con la cantidad de espermatozoides viables y con membranas funcionales, descartando el uso de este parámetro como indicador de calidad seminal (Giuliano y col., 2008). Para facilitar la

manipulación de los eyaculados de los CSA se han desarrollado diversos tratamientos enzimáticos (Giuliano y col., 2010; Kershaw-Young y col., 2013; 2017), que permiten reducir la filancia de los eyaculados y así utilizarlos para biotecnologías reproductivas como la *FIV* (Trasorras y col., 2014). Además de reducir la filancia, el tratamiento del semen fresco de llama con colagenasa permite que los espermatozoides adquieran movilidad progresiva sin alteración evidente de la calidad espermática (Giuliano y col., 2010). Un estudio preliminar realizado durante la presente tesis por Carretero y col. (2015c) en semen fresco de llama, evidenció que el PS está involucrado en el patrón de movilidad de los espermatozoides. En este estudio observamos que cuando se resuspendía el pellet de espermatozoides con PS, luego de que hayan adquirido un patrón progresivo de movilidad a partir de una incubación enzimática, los mismos retomaban el patrón de MO característico del semen fresco. En cambio, si se utilizaba un medio diferente al PS, como el HT, la movilidad espermática era mayormente progresiva. En el *objetivo particular 1* se validaron dichos resultados, probando no sólo la incubación de los espermatozoides con 0 y 100% de PS, sino también con porcentajes intermedios (10 y 50% de PS). Los resultados demostraron que según el porcentaje de PS agregado a los espermatozoides de semen fresco de llama varía el patrón de movilidad que predomina en las muestras. Es así como, las muestras incubadas con mayores porcentajes de PS presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con un patrón de MO. A su vez, las muestras con menores porcentajes de PS presentaron mayores porcentajes de espermatozoides con MP, siendo estadísticamente superiores a la observada en el tratamiento de 100% de PS. El patrón de movilidad espermático oscilatorio característico de los CSA ha sido atribuido a las características seminales de estas especies. Hay autores que proponen que se debe a un efecto mecánico que ejercería el PS sobre el espermatozoide y que estaría dado por las diferentes características reológicas (alta filancia y viscosidad) que presentan los eyaculados de CSA (Lichtenwalner y col., 1996; Von Baer y Helleman 1998; Bravo y col., 2000; Brown B.W., 2000). Sin embargo, podrían existir interacciones más complejas entre el espermatozoide de estas especies y el PS, donde diversos componentes del mismo podrían actuar a nivel molecular sobre la membrana y/o incluso tener una acción bloqueando la movilidad de los espermatozoides. Un estudio realizado en semen humano evaluó la composición del PS de hombres con normozoospermia (movilidad >40%), *versus* hombres cuyos eyaculados se clasificaban como astenozoospermicos (movilidad <40%), determinando

una significativa menor concentración de magnesio, cobre y hierro en los eyaculados astenozoospermicos (Hashemi y col., 2018). Incluso, observaron una correlación negativa entre la cantidad de hierro (mg/dl) presente en el PS y los parámetros de movilidad espermática en los hombres normozoospermicos evaluados por un sistema computarizado de análisis de semen. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que la composición del PS estaría íntimamente ligada con la movilidad espermática y a su vez, con las características de la misma. Por otra parte, en los CSA se ha observado que la simple dilución de los eyaculados de llama no induce a los espermatozoides a adquirir MP. Contrariamente, se observó que el uso de medios de criopreservación con yema de huevo, permiten que los espermatozoides de llama adquieran MP, aun cuando las muestras diluidas conservan las características reológicas propias de los eyaculados de los CSA (filancia) (Bravo y col., 1996; Giuliano S.M., observación personal). En un estudio reciente, logramos separar espermatozoides de semen fresco de llama no tratado enzimáticamente, del PS mediante el pasaje a través de una columna de Androcoll-E™ (Bertuzzi y col., 2018). Interesantemente, en dicho estudio los espermatozoides conservaron la movilidad oscilatoria a pesar de que se eliminó el PS a través del coloide. Estas observaciones (Bravo y col., 1996; Giuliano S.M, observación personal; Bertuzzi y col., 2018) se respaldan con los presentes resultados, en los que se observó MO en muestras con ausencia de filancia (50% de PS a las 3 hs) e incluso también se observaron espermatozoides que se movieron con un patrón oscilatorio en las muestras sin PS (0% de PS a las 0; 1,5 y 3 hs), reforzando una hipótesis de tipo molecular más que mecánica para la acción del PS sobre la movilidad de los espermatozoides de llama. Existe un único reporte en camélidos que evalúa el efecto de la adición de PS a espermatozoides de semen fresco de alpacas (Kershaw-Young y Maxwell, 2011). Sin embargo, estos autores no evaluaron la formación de hilo ni diferenciaron los patrones de movilidad de los espermatozoides.

En cuanto a la capacidad del PS de preservar la movilidad espermática a lo largo del tiempo de incubación, observamos que la MT se conservó luego de 3 hs de incubación tanto en las muestras sin PS (0% PS) como en las muestras tratadas con 10 y 50% de PS, mientras que hubo un descenso significativo de la misma en las muestras resuspendidas sólo con PS (100%). Similar a nuestro trabajo, en espermatozoides de semen fresco de alpaca, Kershaw-Young y Maxwell (2011) observaron menores porcentajes de movilidad en muestras tratadas con 100% de PS a las 3 hs de incubación comparado con una dilución final de 10% de PS. Incluso,

cuando los mismos autores compararon otros porcentajes de PS (10, 25, 50 y 100% PS) diluidos en PBS observaron que las concentraciones finales de 10 y 25% presentaban mejor capacidad para conservar la movilidad espermática a lo largo del tiempo (4 hs) con respecto al resto de los tratamientos. En este reporte no se diferenciaron los patrones de movilidad espermática, es decir aquellos que se movían con MP y aquellos con MO, presentando los resultados como movilidad espermática total. Contrario a nuestro estudio, Castellini y col. (2000) observaron una caída significativa de la movilidad en espermatozoides de conejo incubados con bajos o nulos porcentajes de PS (0 - 1%) dentro de la primera hora y a las 3 hs de incubación, mientras que con 100% de PS la movilidad se conservó durante un período de 6 hs. Las diferencias observadas entre estos estudios (Castellini y col., 2000; Kershaw-Young y Maxwell., 2011) y el nuestro podrían deberse a las diferencias entre especies, tanto en lo que respecta a la fisiología espermática como a la composición del PS (Kershaw-Young y Maxwell., 2012). Incluso se ha establecido que diferencias en la composición proteica del PS entre machos de una misma especie está vinculada al porcentaje de espermatozoides móviles observado en semen fresco (*carneros*: Rodrigues y col., 2013). Por otra parte, el medio utilizado para diluir los espermatozoides y el PS varía entre los estudios y esto, podría ser otro de los factores implicados en la diferencia de los resultados. En nuestro trabajo utilizamos HT como medio para diluir los espermatozoides en el PS, mientras que Kershaw-Young y Maxwell (2011) utilizaron PBS y Castellini y col. (2000) diluyeron con un medio a base de Tris. En nuestro caso, la elección del medio HT se basó en estudios previos en los que los parámetros espermáticos no fueron alterados utilizando el mismo tratamiento que en esta tesis (Giuliano y col., 2010). Además, se han obtenido embriones de llama por *FIV* a partir del mismo protocolo que el utilizado en este objetivo para separar los espermatozoides del PS (tratamiento enzimático, centrifugación y resuspensión de los pellets en HT) (Trasorras y col., 2014).

Por otro lado, en la incubación con 100% de PS no sólo se determinó un descenso de la movilidad a las 3 hs de evaluación sino también se observó una caída significativa de la funcionalidad de membrana y de la viabilidad espermática, efecto no observado en el resto de los tratamientos con menores porcentajes de PS (10 y 50%) ni en el control (0% PS), los que preservaron dichas características a lo largo de la incubación. Resultados similares fueron reportados por Kershaw Young y Maxwell (2011) en espermatozoides de semen fresco de alpaca, donde la viabilidad de las muestras diluidas con 100% de PS se redujo

significativamente con respecto a muestras con 10% de PS a las 3 hs de incubación. Además, en dicho estudio, la caída de la viabilidad en las muestras con 10% de PS fue de alrededor un 50% a las 3 hs de incubación, mientras que, en la presente tesis utilizando los mismos porcentajes de PS (10%) la viabilidad no se alteró a lo largo de la incubación. Como se mencionó previamente, estas diferencias podrían deberse a los diferentes medios utilizados (PBS vs. HT). El HT es una solución salina tamponada que posee una osmolaridad similar a la de los eyaculados y, además, contiene sustratos metabólicos para los espermatozoides, mientras que el PBS es una solución salina tamponada. Contrario a nuestros resultados, en semen de conejo Castellini y col. (2000) observaron una caída significativa de la viabilidad en espermatozoides incubados con bajos o nulos porcentajes de PS (0 o 1%) dentro de la hora 1 y a las 3 hs de incubación, mientras que con 100% de PS la viabilidad se conservó durante las 3 hs. Nuevamente, la diferencia entre estos resultados puede deberse a la variabilidad que hay en las composiciones del PS entre especies, lo que podría modificar su interacción con los espermatozoides (Jujeya y col., 2012, *review*; Kershaw-Young y Maxwell., 2012). A su vez, distintos trabajos que estudian esta temática han demostrado resultados disímiles en cuanto al efecto del PS sobre los espermatozoides, incluso entre individuos de una misma especie (*rumiantes*: Leahy y de Graaf, 2012; *equinos*: Morrell y col., 2014).

No es posible la comparación de los cambios observados a nivel de la funcionalidad de la membrana debido a que no se hallaron reportes que hayan evaluado dicha característica seminal.

Con respecto a la integridad acrosomal, se observó que indistintamente de la proporción de PS, se conservó el estado acrosomal a lo largo del tiempo de incubación. Sin embargo, a las 3 hs de incubación el porcentaje de espermatozoides con acrosoma presente presentó un descenso significativo en las muestras sin PS (0%) respecto del resto de los tratamientos (10, 50 y 100% de PS). En las últimas décadas se ha investigado en forma intensiva la composición proteica del PS en diferentes especies (Manjunath y col., 1987; Kareskoski y col., 2011; Druart y col., 2013; Sarsaifi y col., 2015). Se sabe que, el PS posee diversas proteínas que están involucradas en los procesos fisiológicos de maduración espermática a lo largo del tránsito epididimario y en la capacitación de los espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra (Manjunath y col., 2002; Juyena y col., 2012, *review*). Es así que, cuando el PS toma contacto con los espermatozoides en el momento de la eyaculación,

diferentes agentes decapacitantes se adhieren a la membrana del espermatozoide (Maxwell y col., 2007). En porcinos, el agregado de un 10% de PS al medio de fertilización *in vitro* impide la penetración espermática del ovocito y esto podría deberse a una acción inhibitoria de la capacitación que ejercerían componentes presentes en el PS del verraco (Suzuki y col., 2002). Estos hallazgos, podrían vincularse a los resultados observados en la presente tesis, en la que, las muestras incubadas en ausencia de PS presentaron los mayores porcentajes de espermatozoides con acrosomas ausentes con respecto al resto de los tratamientos (10, 50 y 100% PS), siendo estas diferencias estadísticamente significativas a las 3 hs de incubación. De forma similar, Carretero y col. (2016) observaron que espermatozoides de semen fresco de llama incubados con altas concentraciones de PS (50 y 100%) presentaron mayores porcentajes de espermatozoides viables y con acrosomas intactos que los espermatozoides incubados con nulas o bajas concentraciones de PS (0 y 10%). Esto fue observado también en un trabajo realizado en equinos por Heise y col. (2010) donde vieron que los espermatozoides de epidídimo expuestos a PS conservaban mejor su capacidad fertilizante que los espermatozoides epididimarios que nunca habían tomado contacto con el PS. También, en espermatozoides de epidídimo de alpaca incubados en ausencia de PS, se observaron menores porcentajes de acrosomas intactos con respecto a las muestras incubadas con un 10 y 100% de PS (Kershaw-Young y Maxwell, 2011). Estos estudios y nuestros resultados estarían reforzando la idea de que los factores decapacitantes que posee el PS pueden inhibir reversiblemente el proceso de capacitación y que en ausencia de los mismos puede ocurrir la capacitación espontánea y la consiguiente reacción acrosomal.

La caída significativa de la movilidad, integridad y funcionalidad de membrana en las muestras incubadas durante 3 hs con 100% de PS podría deberse al agotamiento de nutrientes, acúmulo de desechos y/o aumento de las especies reactivas del oxígeno, como ha sido observado en otros CSA (*alpacas*: Morton y col., 2010). Por otro lado, las muestras con 0, 10 y 50% de PS, al contener HT, podrían tener mayor disponibilidad de nutrientes, mejor respuesta buffer del medio conservando el pH óptimo y así, prolongar la sobrevivencia de los espermatozoides en el tiempo.

Conclusiones objetivo particular 1

El plasma seminal modifica el patrón de movilidad y empleado en ciertos porcentajes (10 y 50%) preserva la viabilidad, la funcionalidad de membrana y la integridad acrosomal del espermatozoide fresco de llama.

1. *En este estudio se observó que el patrón de movilidad del espermatozoide de semen fresco de llama está influenciado por el PS y por la proporción en que éste se encuentra presente en el medio.*
2. *El uso de 100% de PS no es capaz de mantener a los espermatozoides de semen fresco de llama móviles, viables y con sus membranas funcionales durante 3 hs, por lo que es necesario incorporar un medio de sostén a los espermatozoides de llama además del PS para mantener a los mismos viables y funcionales en el tiempo.*
3. *El menor porcentaje de espermatozoides con acrosoma presente en las muestras incubadas en ausencia de PS (0%) estaría indicando la posible necesidad de incluir un cierto porcentaje de PS en el medio de dilución, ejerciendo un rol decapacitante que evite la reacción acrosomal espontánea de los espermatozoides.*

Efecto del plasma seminal en espermatozoides criopreservados de llama

En algunas especies de interés productivo, como por ejemplo el asno, el verraco y los camélidos, la IA con semen congelado presenta índices de preñez bajos. En el caso de los CSA, estos valores son menores al 26% (Bravo y col., 2000; Vaughan y col., 2003; Aller y col., 2003), haciendo que esta biotecnología no pueda utilizarse en forma rutinaria ni de manera masiva en el manejo reproductivo de estas especies. Por esta razón, existe en la actualidad, una investigación muy activa en la temática, para dilucidar donde podría radicar el problema en dicha biotecnología. En los CSA, el PS tiene una implicancia elevada sobre la fisiología espermática y conocer como éste interacciona con el espermatozoide podría abrir camino al desarrollo de nuevos protocolos de IA con semen criopreservado. A pesar de los múltiples roles que se le han atribuido al PS en la fisiología reproductiva de estas especies (Ratto y col., 2005; Adams y Ratto 2013, *review*; Apichela y col., 2014; Tribulo y col., 2015; Silva y col., 2015; Berland y col., 2016) existen muy pocos estudios que evalúen el efecto del mismo sobre espermatozoides criopreservados de CSA (Zea y col., 2015; Carretero y col., 2017b). En estas especies, la mayoría de los protocolos de criopreservación de semen no remueven el PS durante el procesamiento de los eyaculados, es decir el diluyente es agregado al eyaculado completo (Bravo y col., 2000; Aller y col., 2003; Vaughan y col., 2003; Santiani y col., 2005; Giuliano y col., 2012a; Carretero y col., 2015a). Existen reportes que mencionan la dificultad en la homogeneización de las muestras diluidas y a su vez, el problema en el envasado de las pajuelas debido a las características inherentes a los eyaculados de los CSA, como la alta filancia y elevada viscosidad estructural. Los bajos índices de preñez obtenidos hasta el momento con semen criopreservado en estas especies podrían deberse, en parte, a que dichas características reológicas podrían interferir en la llegada de los crioprotectores a los espermatozoides, así como, impedir una efectiva homogeneización del eyaculado con el diluyente pudiendo impactar negativamente en la calidad espermática al descongelado de las muestras.

En los *objetivos 2 y 3* de la presente tesis, el PS propio del eyaculado obtenido fue removido mediante tratamiento enzimático y posterior centrifugación de las muestras. Hasta hace poco tiempo, los únicos procedimientos efectivos para remover el PS de los eyaculados de CSA eran la centrifugación a baja velocidad de muestras incubadas con enzimas (Giuliano y col., 2010) o la centrifugación a alta velocidad (Kershaw-Young y Maxwell 2011; Fumuso y col., 2018). Recientemente, logramos separar espermatozoides de semen fresco de llama del PS

utilizando una columna de Androcoll-E™ mediante centrifugación a baja velocidad prescindiendo del uso de enzimas. Sin embargo, la recuperación espermática fue baja como para permitir obtener un adecuado pellet espermático para su criopreservación (Bertuzzi y col., 2018). Por lo tanto, en ambos protocolos de criopreservación utilizados en esta tesis, se procedió a la incubación de los eyaculados con colagenasa para remover el PS y así, poder criopreservar muestras en ausencia del mismo. Por otra parte, según el objetivo particular realizado, se agregaron distintas cantidades de PS en diferentes etapas del procesamiento y se realizó la evaluación posterior de las muestras, tanto en presencia como en ausencia de PS.

En el *objetivo particular 2* se criopreservaron espermatozoides en ausencia de PS y diferentes porcentajes del mismo fueron agregados luego del descongelamiento (0, 10 y 50%). Estas muestras se incubaron durante 3 horas a 37 °C, con el fin de determinar el efecto de la incubación del PS sobre espermatozoides descongelados de llama, evaluando diferentes parámetros en el tiempo. Ninguna de las concentraciones finales de PS probadas fueron capaces de preservar la movilidad espermática, observándose un descenso significativo tanto en la MP como en la MT a lo largo del tiempo. Sabatini y col. (2014) añadieron PS a espermatozoides descongelados de asno y observaron que, la movilidad espermática, tanto progresiva como total, disminuía significativamente luego de 4 hs de incubación cuando agregaban porcentajes de 5 y 20 % de PS. Sin embargo, estos autores no observaron este fenómeno en las muestras incubadas sin PS (0%). A su vez, evaluaron el efecto de la adición de mayores porcentajes de PS (70%) y vieron que, en este caso, el impacto negativo sobre la movilidad era inmediato (0 hs). Nuestros resultados a tiempo cero, también evidenciaron un menor porcentaje de espermatozoides móviles en las muestras con mayor porcentaje de PS (50%) comparada con las tratadas con 0 y 10% de PS, pero esta diferencia no fue significativa. La falta de diferencia significativa podría adjudicarse a los elevados valores de los desvíos estándares, que responden no sólo a la gran variabilidad seminal entre machos sino también entre eyaculados de un mismo macho, reportada previamente en la especie (Giuliano y col., 2008). Contrario a nuestros resultados Ledesma y col., (2016) observaron un incremento en la MP y MT, en el carnero, cuando adicionaban 20% de PS luego del descongelamiento e incubaban las muestras durante 1 h a 37 °C, respecto a las muestras sin PS. También observaron otros efectos positivos sobre el espermatozoide de carnero, detectando menor producción de especies reactivas del oxígeno (EROs) y mayores valores de actividad

mitocondrial espermática cuando el PS era adicionado al semen descongelado versus el control (sin agregado de PS). Las diferencias entre estos estudios y los resultados del presente objetivo podrían deberse a la distinta fisiología espermática entre especies y, por ende, a los diferentes requerimientos energéticos y metabólicos de los espermatozoides en cada una de ellas. Además, tanto en el estudio realizado en carneros como en el realizado en espermatozoides de asnos los porcentajes de PS agregados fueron diferentes a los adicionados en este objetivo (*carnero*: 20% PS; *asno*: 5, 20 y 70%). A su vez, el medio utilizado para lograr las diferentes concentraciones finales de PS fue diferente en cada estudio. Sabatini y col., (2014) utilizaron un diluyente comercial (INRA96®) mientras que, Ledesma y col. (2016) utilizaron un medio a base de PBS y 0,5% de fructosa, *versus* el diluyente a base de lactosa al 11%, yema de huevo, DMF y EDTA-glucosa, utilizado en la presente tesis. En nuestro caso, la elección del diluyente se basó en un estudio previo en el que se observó mayor movilidad, integridad y funcionalidad de la membrana en semen de llama refrigerado con lactosa-yema de huevo con respecto al resto de los medios (Giuliano y col., 2012a). A su vez, se ha demostrado que los componentes del PS de los CSA difieren de los encontrados en otras especies (Kershaw-Young y Maxwell, 2012; Druart y col., 2013), pudiendo también este factor estar involucrado en los diferentes resultados observados.

Un resultado inesperado fue que el patrón de movilidad de las muestras descongeladas e incubadas con 50% de PS fue mayormente progresivo. En estas muestras, se observó MO, pero en porcentajes muy bajos a las 3 hs de incubación. Esta reportado en diferentes especies, que la criopreservación modifica la membrana plasmática espermática a nivel estructural, alterando tanto la fluidez como la composición bioquímica de la misma y que, muchos de los cambios que ocurren serían irreversibles (Bailey y col., 2000; Watson P.F., 2000). Es posible que existan otros cambios estructurales o bioquímicos de la membrana espermática durante la criopreservación que podrían afectar la posible acción del PS mencionada previamente, evidenciándose en parte con la falta de movilidad espermática oscilatoria. También, el diluyente de criopreservación utilizado podría estar involucrado en la casi nula MO, debido a que contiene yema de huevo, componente que induciría la MP de los espermatozoides como se mencionó en forma previa en la discusión del *objetivo particular 1*. Esto se refuerza al comparar los resultados de movilidad de las muestras previo a la criopreservación (muestras diluidas con lactosa – yema de huevo sin PS) con aquellos valores observados en el *objetivo 1* (muestras

diluidas en HT sin PS). En las muestras diluidas con HT los valores de MO fueron entre un 8,8 y un 10%, mientras que, cuando la yema de huevo estuvo presente en el medio de dilución la MO fue casi nula.

Se observó una disminución significativa de la funcionalidad de membrana de los espermatozoides en todas las muestras a lo largo de la incubación, sin observar diferencias significativas entre ellas en cada uno de los tiempos de evaluación. Zea y col. (2015) evaluaron el efecto de la adición de PS a espermatozoides congelados-descongelados de alpaca provenientes de la desviación conducto deferente. Al igual que nuestro estudio, estos autores observaron una disminución significativa en los porcentajes de espermatozoides móviles junto con un descenso en la funcionalidad de membrana de los mismos tanto en las muestras en las que se adicionó PS, como a las que no se adicionó el mismo (0% PS). Sin embargo, no mencionan la proporción PS/espermatozoides utilizada ni tampoco los tiempos de incubación de las muestras. Por otra parte, al tratarse de muestras obtenidas por desviación del conducto deferente, son espermatozoides que no tuvieron contacto con los fluidos de las glándulas anexas, pudiendo por lo tanto responder de forma diferente a los espermatozoides obtenidos de eyaculados. También, contrario a nuestros resultados, Sabatini y col., (2014) observaron que la funcionalidad de membrana fue significativamente menor en semen descongelado de asno tratado con elevados porcentajes de PS (20 y 70%) *versus* la muestra sin PS o con bajos porcentajes (0 y 5% de PS).

La viabilidad y el estado acrosomal (CFDA/PI y FITC-PNA/PI) no se vieron comprometidos en el tiempo en los distintos tratamientos y tampoco se determinó que alguno de ellos fuera más eficiente para preservar estas características en los espermatozoides descongelados de llama. A diferencia del presente estudio, Torres y col. (2016) observaron un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides muertos con acrosoma dañado en muestras congeladas-descongeladas de verraco e incubadas durante 1 h a 37 °C con PS obtenido de la porción rica en espermatozoides *versus* muestras incubadas sin la adición de PS de dicha fracción. Estos autores evaluaron la integridad de membrana y el estado acrosomal con Isotiocianato de Fluoresceína conjugado con la aglutinina de *Pisum sativum* en combinación con Ioduro de propidio (FITC-PSA/PI). La falta de un descenso significativo en cuanto a los resultados de la presente tesis en la cantidad de espermatozoides vivos y con el acrosoma intacto puede deberse a una mayor tolerancia del espermatozoide criopreservado

de llama o a la necesidad de tiempos de incubación más prolongados en la especie para evidenciar dicho efecto. Por otro lado, el descenso de la movilidad espermática, sin compromiso de la viabilidad, funcionalidad de membrana o del estado acrosomal a lo largo del tiempo, podrían deberse a la disminución del metabolismo espermático sin comprometer otras características en forma significativa.

La calidad del ADN espermático (condensación y grado de fragmentación) no se vio afectada por la cantidad de PS agregada al medio luego del descongelamiento de las muestras, ni tampoco fueron variables espermáticas que se modificaron a lo largo del tiempo con la incubación a 37 °C. De manera semejante a este objetivo, Sabatini y col. (2014) evaluaron el efecto del agregado de PS sobre la calidad del ADN (fragmentación) en semen descongelado de burro, sin observar un impacto significativo sobre la misma al tiempo cero utilizando 0, 5 y 20% de PS. En cuanto a la morfología espermática, no hubo efecto de los diferentes tratamientos evaluados (0, 10 y 50% de PS) y no se encontraron publicaciones en otras especies que evalúen la morfología espermática en semen descongelado y su relación con el PS.

En el *objetivo particular 3* se congelaron espermatozoides de llama con diferentes concentraciones finales de PS adicionado al medio previo al congelamiento de las muestras (0, 10 y 50%). Al descongelamiento de las mismas se observó menor movilidad espermática (progresiva y total), en el tratamiento de 50% de PS, no habiendo diferencia entre los tratamientos de 0 y 10% de PS. En estudios previos, en semen refrigerado de llama, Carretero y col. (2017b) observaron que el porcentaje de movilidad de muestras refrigeradas con PS fue significativamente menor al porcentaje observado en muestras refrigeradas en ausencia de PS. La dilución utilizada por estos autores fue de 2:1 (diluyente:semen) siendo el porcentaje final de PS evaluado alrededor del 30%. A pesar de que observaron diferencias significativas en la MT, no observaron diferencias al evaluar los patrones de MO y MP en forma individual. Resultados similares fueron observados en este objetivo en cuanto a la presencia de MO, estando presente sólo en las muestras congeladas con un 50% de PS, aunque los valores fueron bajos (0-5%) y sin diferencia significativa con el resto de las muestras (0 y 10% de PS). Las razones de la ausencia de movilidad espermática oscilatoria en las muestras congeladas con un 50% de PS al descongelado podrían ser las mismas que las planteadas en el *objetivo particular 2*: la posible acción de la yema de huevo del diluyente de criopreservación sobre la

relación del PS en el patrón de movilidad espermática así como, el impacto propio del proceso de criopreservación que podría modificar sitios blancos de acción del PS en la membrana espermática que estarían relacionados con el patrón de movilidad del espermatozoide de llama.

Con respecto a la viabilidad y funcionalidad de membrana espermática, sucedió lo mismo que en la movilidad, obteniéndose menores porcentajes para dichas características en las muestras con 50% PS, aunque los resultados no fueron significativamente diferentes a los otros dos tratamientos evaluados (0 y 10% PS). La cantidad de espermatozoides vivos fue superior al número de espermatozoides móviles en las muestras tratadas con 50% PS, es decir había espermatozoides vivos e inmóviles. Esta característica ya fue reportada en semen fresco de llama donde se observó una población de espermatozoides inmóviles y con sus membranas funcionales e intactas (Giuliano y col., 2005). Ledesma y col. (2015) observaron que la adición de PS previo al proceso de congelamiento no tenía un efecto protector sobre la movilidad, funcionalidad de membrana e integridad de los espermatozoides de carnero, por ende, concluyeron que la adición de PS no proveía mayor resistencia al daño por congelamiento. En dicho trabajo, reportan que el volumen de PS agregado corresponde a la media del volumen que se observa en los eyaculados para la especie, es decir no se informa el porcentaje final de PS utilizado. En el reporte de Zea y col. (2015) realizado en espermatozoides criopreservados de alpaca provenientes de la desviación del conducto deferente, se probaron tres tratamientos diferentes: sin PS, con PS agregado antes de la criopreservación y con PS agregado luego del descongelamiento de las muestras. Estos autores no observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la movilidad, viabilidad y funcionalidad de la membrana espermática entre las muestras con y sin agregado de PS previo al proceso de congelamiento. Nuevamente, estos autores no mencionan la proporción de PS, tipo de diluyente y espermatozoides utilizados en su estudio. En humanos, el uso de PS autólogo previo al proceso de congelación de semen logró mejores resultados de supervivencia y movilidad espermática al descongelado de las muestras, comparado con muestras criopreservadas en ausencia de PS (Grizard y col., 1999). Estos autores utilizaron 50% PS en el medio de criopreservación, similar a una de las concentraciones finales evaluadas en el *objetivo particular 3* de la presente tesis. La presencia de este efecto crioprotector del PS que observaron estos autores, independientemente de la calidad seminal original de las muestras (normal o baja fertilidad), puede deberse a diferencias

en la fisiología espermática de la especie o a la composición particular que puede poseer el PS en el humano. Está demostrado que los componentes proteicos del PS varían entre especies, no solo en su estructura sino también, en su abundancia y efecto sobre la fisiología espermática (Calvete y col., 2007).

Similar a los resultados observados en el *objetivo particular 2*, en este objetivo tampoco hubo diferencias significativas entre las tres concentraciones de PS evaluadas, en cuanto a la calidad de ADN espermático (condensación y fragmentación), morfología, viabilidad y estado acrosomal (CFDA/PI y FITC-PNA/PI). Es decir, ninguno de los tres tratamientos evaluados (0, 10 y 50% PS) mostró superioridad frente a los otros para conservar mejor las características espermáticas con el protocolo de congelamiento profundo evaluado en este estudio.

Finalmente, en ambos objetivos (2 y 3), se observó que la calidad seminal de las muestras descongeladas disminuyó a más del 50% con respecto al semen fresco. En semen criopreservado de varias especies se han evidenciado cambios similares a los de la capacitación espermática luego de la refrigeración y del congelamiento profundo, efecto que se ha llamado “criocapacitación” (ratón: Fuller y Whittingham, 1996; carnero: Pérez y col., 1996; Gillan y col., 1997; cerdo: Maxwell y Johnson, 1997; toro: Cormier y col., 1997; equino: Neild y col., 1999; 2003). En la presente tesis, se observó un elevado porcentaje de espermatozoides muertos con sus acrosomas reaccionados en las muestras descongeladas con respecto al semen fresco, evidenciando que el protocolo de congelamiento utilizado posiblemente “criocapacitaría” los espermatozoides de llama, de forma similar a lo observado en otras especies. Dicho fenómeno, modificaría la estabilidad de la membrana espermática acortando a su vez, la sobrevivencia luego del descongelamiento debido a la mayor susceptibilidad de los espermatozoides a sufrir procesos que culminan con la muerte.

Conclusiones objetivos particulares 2 y 3

La adición de plasma seminal (10 y 50%) en forma previa o posterior al congelamiento de espermatozoides de llama no mejora la supervivencia espermática al descongelado.

- 1. El protocolo de congelamiento aplicado en ambos objetivos generó un descenso significativo de los espermatozoides móviles, viables con acrosoma íntegro y con membrana funcional. A su vez comprometió la calidad del ADN espermático, incrementando la fragmentación del mismo en los espermatozoides descongelados.*
- 2. Por otro lado, la curva de congelamiento utilizada y el diluyente base empleado, similares en ambos objetivos, no comprometieron el grado de condensación de la cromatina ni la morfología espermática.*
- 3. La adición post-descongelación de 10% y 50% de plasma seminal fue incapaz de preservar la movilidad espermática o mejorar la supervivencia de los espermatozoides congelados-descongelados de llama.*
- 4. La pérdida rápida de movilidad de los espermatozoides de llama después del descongelamiento, manteniendo al mismo tiempo otras características seminales, parecería ser importante de destacar y requiere más estudios.*
- 5. La adición de PS (10 y 50%) previo al proceso de criopreservación de espermatozoides de llama, con el diluyente base utilizado y la curva de congelamiento profundo empleada, no tendría un efecto protector frente al daño por congelamiento.*

Inseminación artificial con semen criopreservado

En los CSA, el uso de la IA con semen criopreservado es una BTR escasamente utilizada debido a los bajos índices de preñez que se obtienen con la misma, limitando su aplicación a campo. A su vez, existen pocos reportes que evalúen la calidad seminal luego de la criopreservación de semen en estas especies y que, además de las pruebas de diagnóstico *in vitro* realicen pruebas biológicas a través de la IA. Como se mencionó anteriormente la mayoría de las curvas y CP utilizados en la criopreservación de semen en CSA han sido adaptados de aquellos utilizados en bovinos y en pequeños rumiantes, utilizando curvas de congelamiento lentas y principalmente glicerol como CP (Aller y col., 2003; Bravo y col., 1996; Santiani y col., 2005; 2013).

Debido a que ninguno de los protocolos de criopreservación utilizados en esta tesis, mostró superioridad sobre el otro al evaluar las características espermáticas *in vitro*, se decidió inseminar con el protocolo más sencillo (0% de PS). Por otra parte, debido a que la IA se realizó una vez confirmada la ovulación y, a que la dosis inseminante se depositó en la cercanía de la papila uterina, se decidió no incorporar PS durante la IA, porque no sería necesario que se formara un reservorio espermático oviductal. Los porcentajes de preñez utilizando dicha metodología fueron del 0%. Vaughan y col., (2003) tampoco observaron preñez al inseminar alpacas con semen congelado utilizando dos diluyentes comerciales (Green/clear camel buffer® y Biladyl A&B®), ambos con GL al 7 %. Estos autores realizaron la IA a tiempo fijo 24 a 30 hs posteriores a la inducción de la ovulación con busserelina, confirmando la misma en la totalidad las hembras por la presencia del cuerpo lúteo 7 días después de la inducción. A su vez, la dosis inseminante se depositó en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con la presencia de folículo dominante, de forma similar a la metodología del *objetivo particular 4* de esta tesis. Al descongelar las muestras con ambos diluyentes la movilidad espermática observada fue similar a los valores obtenidos en el *presente estudio*: un eyaculado $25,0 \pm 10,0\%$ y múltiples eyaculados $15,3 \pm 6,4\%$ versus Green/clear camel buffer® $17,4 \pm 7,1\%$; y Biladyl A&B® $21,3 \pm 3,3\%$ (media \pm DE). Dichos autores sólo informan la cantidad total de espermatozoides de la dosis inseminante sin especificar la viabilidad espermática de las muestras al descongelado, además de ser bastante dispar la cantidad total de espermatozoides utilizada entre ambos

protocolos (Green/clear camel buffer®: 50 x 10⁶ espermatozoides y Biladyl A&B® 300 x 10⁶ espermatozoides).

Otro reporte realizado en la Puna Argentina logró un 7,9% de preñez al inseminar a 38 hembras de llama a tiempo fijo con semen congelado (24 hs posinducción de la ovulación) (Aller y col., 2003). Similar a nuestros resultados, estos autores observaron un descenso significativo en la movilidad y la viabilidad espermática al comparar las muestras descongeladas con el semen fresco (movilidad: 20,4 ± 7,5% versus 54,3 ± 10,5%; viabilidad 32,4 ± 10,5% *versus* 68,5 ± 12,3%, respectivamente (media ± DE)). El diluyente utilizado en este estudio estaba compuesto por yema de huevo, citrato, glucosa y antibióticos, agregando como crioprotectores GL al 6% y DMSO al 8%. Cabe destacar que, en este estudio se indujo la ovulación de las hembras de llama (8 µg de buserelina), sin la previa determinación de la presencia de un folículo dominante por evaluación transrectal, ni por palpación ni ultrasonografía. Por lo tanto, no se conocía el estado ovárico y por ende, la capacidad de respuesta a la inducción de la ovulación. Además, utilizaron una dosis de 25 millones de espermatozoides totales con una movilidad del 20 al 25%, reportando una dosis inseminante de 8,4 ± 3,2 millones de espermatozoides viables (media ± DE). Dichos valores son algo menores a los utilizados en el protocolo de la presente tesis, donde el rango de espermatozoides viables totales inseminados fue de 9,4 ± 7,6 x 10⁶ cuando se inseminó con un eyaculado completo y de 12,3 ± 0,4 x 10⁶ cuando se inseminó con múltiples eyaculados (media ± DE).

Otros autores publicaron preñeces en alpaca utilizando semen congelado-descongelado (Bravo y col., 1996), logrando un 26,3% de preñez utilizando también, un medio a base de yema de huevo, glucosa, citrato y GL al 7% como CP. Estos autores al igual que Aller y col. (2003) utilizaron una curva lenta de congelamiento con periodos de equilibramiento desde 45 minutos hasta 2 horas de duración a 4-5 °C.

Se desconoce la cantidad de espermatozoides viables necesarios para lograr preñeces en CSA con semen congelado. Como se mencionó previamente, en este estudio las dosis de espermatozoides vivos inseminados fueron similares a las reportadas por Aller y col. (2003), sin embargo, no se logró preñez. En semen fresco de llama diluido con lactosa, yema de huevo y una dosis inseminante de 12 x 10⁶ de espermatozoides vivos totales son suficientes para lograr preñez (Giuliano y col., 2012a). Sin embargo, en este objetivo al inseminar la misma

cantidad de espermatozoides vivos congelados/descongelados (12,3 millones de espermatozoides vivos totales) no se obtuvieron preñeces. Lo mismo fue observado en semen refrigerado de llama (Giuliano y col., 2012a). Estos autores reportan que para lograr preñez con semen refrigerado de llama es necesario utilizar una dosis \geq a 76 millones de espermatozoides vivos totales. En la presente tesis, aún utilizando un eyaculado completo no se logró la dosis inseminante reportada para la llama con semen refrigerado, probablemente por el efecto deletéreo del proceso de congelado/descongelado. Por ello, a pesar de la poca practicidad, se decidió unir eyaculados con el objetivo de alcanzar la dosis de espermatozoides viables al descongelado, pero tampoco se logró una preñez. Las próximas investigaciones estarán enfocadas a estudiar el efecto de la combinación de CP penetrantes y una curva de congelamiento lento postulando que dicha combinación y/o curva tendrán un efecto benéfico sobre la supervivencia pos-descongelamiento y la capacidad fecundante del espermatozoide de llama mejorando la eficiencia de la inseminación artificial con semen congelado en la especie.

Conclusiones objetivo particular 4

No se obtuvieron preñeces en llama mediante inseminación artificial sobreovulación utilizando semen congelado sin plasma seminal, con una curva rápida y utilizando un diluyente a base de lactosa, yema de huevo y dimetilformamida al 7%.

Conclusiones finales

1. *El patrón de movilidad en los espermatozoides de llama está influenciado por el plasma seminal, tanto por su presencia como por su cantidad.*
2. *La presencia de movilidad oscilatoria en muestras sin filancia indicarían una acción preferentemente de tipo molecular más que mecánica del PS sobre la movilidad de los espermatozoides de llama.*
3. *La ausencia de plasma seminal en los medios de incubación produce la reacción acrosomal espontánea de los espermatozoides de llama. Mientras que, el plasma seminal como único medio de sostén no es capaz de conservar los espermatozoides de llama viables y con sus membranas funcionales en el tiempo.*
4. *La adición de plasma seminal (10 y 50%) luego del descongelamiento de los espermatozoides de llama no es capaz de mejorar la supervivencia espermática en el tiempo, con el protocolo de criopreservación desarrollado en esta tesis.*
5. *El agregado de plasma seminal (10 y 50%) previo al proceso de congelación de los espermatozoides de llama no es capaz de proteger a los mismos frente a los daños producidos por el protocolo de criopreservación utilizado en esta tesis.*
6. *La curva rápida de criopreservación de espermatozoides de llama utilizada en la presente tesis no sería un protocolo efectivo para la preservación de este gameto.*
7. *No se logró preñez al inseminar hembras de llama sobreovulación con semen congelado en ausencia de plasma seminal, utilizando una curva rápida de congelamiento con dimetilformamida al 7% como crioprotector permeable.*

Referencias bibliográficas

1. Aba M.A., Forsberg M. 1995. *Heterologous radioimmunoassay for llama and alpaca luteinizing hormone with a monoclonal antibody, an equine standard and a human tracer.* Acta Vet Scand. 36:367-75.
2. Adams G.P, Ratto M.H. 2013. *Ovulation-inducing factor in seminal plasma: A review.* Anim. Reprod. Sci. 136: 148-156.
3. Alarcón V., García W., Bravo W.P. 2012. *Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y por vagina artificial.* Rev. Inv. Vet. Perú 23: 58-641.
4. Aller J.F., Rebuffi G.E., Cancino A.K., Alberio R.H., 2003. *Influencia de la criopreservación sobre la movilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (Lama glama).* Arch. Zootec. 52: 15-23.
5. Aller J.F., Rebuffi G.E., Cancino A.K., Alberio R. 2002. *Successful transfer of vitrified llama (Lama glama) embryos.* Anim. Reprod. Sci. 73: 121-127.
6. Apichela S., Argañaraz M.E., Giuliano S., Zampini R., Carretero I., Miragaya M., Miceli D.C. 2014. *Llama oviductal sperm reservoirs: involvement of bulbourethral glands.* Andrologia 46: 290-5.
7. Apichela S., Chaves G., Trasorras V., Carretero M.I., Pinto M., Rutter B., Jiménez Diaz M., Agüero A., Miceli D.C. 2006. *Participación de las secreciones de las glándulas bulbouretrales en la formación de reservorios espermáticos en el oviducto de llama.* XXIII Jornadas Científicas. Asociación de Biología de Tucumán. Tafí del Valle, Tucumán, Argentina.
8. Aurich J.E., Kühne A., Hoppe H., Aurich C. 1996. *Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation.* Theriogenology 46: 791-797.

9. Bailey J.L., Biloudeu J.F., Cormier N. 2000. *Semen cryopreservation in domestic animals. A damaging and capacitating phenomenon.* J. Androl. 21: 1-7.
10. Barrier-Battut I., Bonnet C., Giraud A., Dubois C., Caillaud M., Vidament M. 2013. *Removal of seminal plasma enhances membrane stability on fresh and cooled stallion spermatozoa.* Reprod. Dom. Anim. 48: 64-71.
11. Berland M.A., Ulloa-Leal C., Barría M., Wright H., Dissen G.A., Silva M.E., Ojeda S.R., Ratto M.H. 2016. *Seminal plasma induces ovulation in llamas in the absence of a copulatory stimulus: role of nerve growth factor as an ovulation-inducing Factor.* Endocrinology 157: 3224-32.
12. Berland M.A., von Baer A., Ruiz J., Parraguez V., Morales P., Adams G.P., Ratto M.H. 2011. *In vitro fertilization and development of cumulus oocyte complexes collected by ultrasound-guided follicular aspiration in superstimulated llamas.* Theriogenology 75: 1482-1488.
13. Bertuzzi M., Fumuso F., Arraztoa C., Neild D., Miragaya M., Carretero M.I. 2018. *The use of Androcoll-E™ permits separation of raw llama sperm without the need for enzymatic treatment. Preliminary results.* 5th Conference of the International Society of Camelid Research and Development. ISOCARD-2018. November 12-15. Laâyoune, Morocco.
14. Bourke D.A., Adam C.L., Kyle C.E., McEvoy T.G., Young P., 1992. *Ovulation, superovulation and embryo recovery in llamas.* Proc. 12th Int. Cong. Anim. Repr. 1: 193-195.
15. Bravo P.V., Callo P., Garnica J. 2000. *The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas.* Small Rum. Res. 38: 91-95.

16. Bravo, P.W., Pacheco, C., Quispe, G., Vilcapaza, L., Ordoñez, C., 1999. *Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome*. Arch. Androl. 43: 239-246.
17. Bravo, P.W., Ordoñez, C., Alarcón, V., 1996. *Semen processing and freezing of alpacas and llamas*. In: 13th International Congress on animal Reproduction (ICAR), Sydney, Australia.
18. Brogliatti G.M., Palasz A.T., Rodriguez-Martinez H., Mapletoft R.J., Adams G.P. 2000. *Transvaginal collection and ultrastructure of llama (Lama glama) oocytes*. Theriogenology 54: 1269-1279.
19. Brogliatti G.M., Palasz A.T., Adams G.P. 1996. *Ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration and oocyte collection in llamas (Lama glama)*. Theriogenology 45: 249.
20. Brown B.W. 2000. *A review on reproduction in South American camelids*. Anim. Reprod. Sci. 58: 169-195.
21. Calvete J.J., Sanz L. 2007. *Insights into structure-function correlations of ungulate seminal plasma proteins*. Soc. Reprod. Fertil. 65: 201-15.
22. Carretero M.I., Fumuso F.G., Chaves M.G., Miragaya M.H., Neild D.M., Cetica P., Giuliano S.M. 2017a. *Comparison of two freeze thawing protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. Preliminary results*. InVet 19: 57.
23. Carretero M.I., Giuliano S.M., Arraztoa C.C., Santa Cruz R.C., Fumuso F.G., Neild D.M. 2017b. *Comparison of two cooling protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium*. Andrologia 49:e12691. <https://doi.org/10.1111/and.12691>

24. Carretero M.I., Fumuso F.G., Miragaya M.H., Neild D.M., Cetica P., Giuliano S.M. 2016. *Effect of different concentrations of seminal plasma on sperm viability and acrosomal status in llama*. 18th International Congress on animal Reproduction (ICAR). Lugar: Francia, Tours.
25. Carretero M.I., Neild D., Ferrante A., Caldevilla M., Arraztoa C., Fumuso F., Giuliano S. 2015a. *Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on Lama glama sperm cryopreservation*. *Andrologia* 47: 685-93.
26. Carretero M.I., Fumuso F.G., Neild D.M., Giuliano S.M., Cetica P., Miragaya M.H. 2015b. *Evaluation of the acrosomal status in Lama glama sperm incubated with acrosome reaction inducers*. *Anim. Reprod. Sci.* 160: 1-11.
27. Carretero M.I., Fumuso F., Miragaya M., Herrera C., Giuliano S. 2015c. *Effect of seminal plasma in Lama glama sperm*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 27: 223.
28. Carretero M.I., Lombardo D., Arraztoa C.C., Giuliano S.M., Gambarotta M.C., Neild D.M. 2012. *Evaluation of DNA fragmentation in llama (Lama glama) sperm using the sperm chromatin dispersion test*. *Anim. Reprod. Sci.* 131: 63-71.
29. Carretero M.I., Arraztoa C.C., Casaretto C.I., Huanca W., Neild D.M., Giuliano S.M. 2010a. *Alpaca sperm chromatin evaluation using Toluidine Blue*. In: *Fibre production in South American camelids and other fibre animals*. Lieke Boersma Editor, Wageningen Academic Publishers pp. 141-144.
30. Carretero M.I., Giuliano S., Agüero A., Pinto M., Miragaya M., Trasorras V., Egey J., von Thungen J., Neild D. 2010b. *Guanaco sperm chromatin evaluation using toluidine blue*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 22(1): 310.

31. Carretero M.I., Miragaya M., Chaves M.G., Gambarotta M., Agüero A. 2010c. *Embryo production in superstimulated llamas pre-treated to inhibit follicular growth*. Small Rum. Res., 88: 32-37.
32. Carretero M.I., Giuliano S.M., Casaretto C.I., Gambarotta M.C., Neild D.M. 2009. *Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina*. InVet 11: 55-63.
33. Casaretto C., Martínez Sarrasague M., Giuliano S., Rubin de Celis E., Gambarotta M., Carretero I., Miragaya M.. 2012. *Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer*. Andrologia 44: 335-341.
34. Castellini C., Lattaioli P., Moroni M., Minelli A. 2000. *Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa*. Anim. Reprod. Sci. 63: 275-82.
35. Chaves M.G., Alba M., Agüero A., Egey J., Berestin V., Rutter B. 2002. *Ovarian follicular wave pattern and the effect of exogenous progesterone on follicular activity in non-mated llamas*. Anim. Reprod. Sci. 69: 37-46.
36. Cifuni G.F., Napolitano F., Riviezzi A.M., Braghieri A., Girolami A. 2004. *Fatty acid profile, cholesterol content and tenderness of meat from Podolian young Bulls*. Meat Science 67: 289-297.
37. Conde P.A., Herrera C., Trasorras V.L., Giuliano S.M., Director A., Miragaya M.H., Chaves M.G., Sarchi M.I., Stivale D., Quintans C., Agüero A., Rutter B., Pasqualini S. 2008. *In vitro production of llama (Lama glama) embryos by IVF and ICSI with fresh semen*. Anim. Reprod. Sci. 109: 298-308.
38. Cormier S., Sirard M.A., Bailey J.L. 1997. *Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation*. J. Androl. 18: 461-468.

39. Costa R.G., Malveira A.S., de Azevedo P.S., Ramos do Egipto R.C., Madruga M.S., de Araújo J.T. 2009. *Lipid profile of lamb meat from different genotypes submitted to diets with different energy levels*. Rev. Bras. Zoot. 38: 532-538.
40. Del Campo M.R., Del Campo C.H., Donoso M.X., Berland M., Mapletoft R.J. 1994. *In vitro fertilization and development of llama (Lama glama) oocytes using epididymal spermatozoa and oviductal cell co-culture*. Theriogenology 41: 1219-29.
41. Director A., Giuliano S., Carretero M., Pinto M., Trasorras V., Miragaya M., 2007. *Electroejaculation and seminal characteristics in llama (Lama glama)*. J. Cam. Prac. Res. 14: 203-206.
42. Director A., Giuliano S., Miragaya M., 2004. *Extracción de semen de llama mediante métodos alternativos*. Informe de beca estímulo Universidad de Buenos Aires.
43. Domínguez M.P., Falcinelli A., Hozbor F., Sánchez E., Cesari A., Alberio R.H. 2008. *Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm*. Theriogenology 69: 564-573.
44. Dunn P.F., Picologlou B.F. 1977. *Variation in human semen viscoelastic properties with respect to time post ejaculation and frequency of ejaculation*. Int. J. Fertil. 22: 217-24.
45. Druart, X., Rickard, J. P., Mactier, S., Kohnke, P. L., Kershaw-Young, C. M., Bathgate, R., Gibb, Z., Crossett, B., Tsikis, G., Labas, V., Harichaux, G., Grupen, C. G., de Graaf, S. P. 2013. *Proteomic characterization and cross species comparison of mammalian seminal plasma*. J Proteomics 95: 13-22.

46. El-Bahrawy K.A. 2017. *The influence of caffeine supplementation and concerted utilization of enzymatic and mechanical semen liquefaction on freezability of dromedary camel spermatozoa*. Int J Vet Sci Med 5:121-127.
47. El-Badry D. A., Mohamed R. H., El-Metwally H. A., Abo Al-Naga T. R. 2017. *The effect of some cryoprotectants on dromedary camel frozen-thawed semen*. Reprod Domest Anim 52: 522-525.
48. El-Bahrawy K. A. 2017. *The influence of caffeine supplementation and concerted utilization of enzymatic and mechanical semen liquefaction on freezability of dromedary camel spermatozoa*. Int J Vet Sci Med 5: 121-127.
49. England, B.G.; Foote, W.C.; Matthews, D.H.; Cardozo, A.G.; Riera, S., 1969. *Ovulation and corpus luteum function in the llama (Lama glama)*. J. Endocrinol. 45: 505-513.
50. FAO, Manual. 2005. Situación actual de los Camélidos Sudamericanos en Argentina. Organización de la Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación.
51. Fernández-Gago R., Domínguez J.C., Martínez-Pastor F. *Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study*. 2013 Theriogenology 80: 400-410.
52. Fowler M. Medicine and Surgery of South American Camelids. 1998. 2nd ed. Cap. 17: 382-386.
53. Frank E.N. 2017. *Comercialización de fibras de Camélidos sudamericanos*. Documento Interno SUPPRAD N°5. <http://www.uccor.edu.ar/sites/supprad>. Acceso 11/2018.

54. Frank E.N. 1999. *Producción de fibra de camélidos domésticos. Perspectivas para el mejoramiento genético*. Sitio Argentino de Producción Animal. Curso de producción de camélidos sudamericanos: 1 a 7.
55. Fuller S.J., Whittingham D.G. 1996. *Effect of cooling mouse spermatozoa to 4° C on fertilization and embryonic development*. J. Reprod. Fertil. 108: 139-145.
56. Fumuso F.G., Giuliano S.M., Chaves M.G., Neild D.M., Miragaya M.H., Carretero M.I. 2018. *Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa*. Anim. Reprod. Sci. 192: 99-106.
57. Garnica J., Achata R., Bravo P.W., 1993. *Physical and biochemical characteristics of alpaca semen*. Anim. Reprod. Sci. 32, 85-90.
58. Gibbons A., Cueto M.I., Iovannitti B., Lanuza G. 1996. *Determinación laparoscópica de la ovulación por inducción hormonal exógena en guanaco (Lama guanicoe)*. Rev. Arg. Prod. Anim. 16 (4): 341-342.
59. Gillan L., Evans G., Maxwell W.M. 1997. *Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa*. Reprod. Fert. Dev. 9: 481-487.
60. Giuliano S.M., Bisiau C., Carretero M.I., Arraztoa C.C., Neild D. 2012b. *Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results*. Invet (1): 279.
61. Giuliano S.M., Chaves M.G., Trasorras V.L., Gambarotta M., Neild D., Director A., Pinto M., Miragaya M.H. 2012a. *Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen*. Anim. Reprod. Sci. 131; 204-210.

62. Giuliano S., Carretero M., Gambarotta M., Neild D., Trasorras V., Pinto M., Miragaya M., 2010. *Improvement of llama (Lama glama) seminal characteristics using collagenase*. Anim. Reprod. Sci. 118: 98-102.
63. Giuliano S., Carretero I., Pinto M., Trasorras V., Egey J., von Thungen J., Agüero A., Miragaya M. 2009. *Electroeyaculación y características seminales del guanaco*. Proceedings V Congreso Mundial sobre Camélidos. Riobamba, Ecuador.
64. Giuliano S., Director A., Gambarotta M., Trasorras V., Miragaya M. 2008. *Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (Lama glama)*. Anim. Reprod. Sci. 104: 359-69.
65. Giuliano S., Director A., Trasorras V., Maizon D., Miragaya M. 2005. *Pruebas de funcionalidad e integridad de membrana plasmática en semen fresco y refrigerado de Lama glama*. IV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Especialistas em Pequeños Ruminantes y Camélidos Sud-Americanos. Curitiba, Brasil.
66. Grizard G., Chevalier V., Griveau J.F., Le Lannou D., Boucher D. 1999. *Influence of seminal plasma on cryopreservation of human spermatozoa in a biological material-free medium: study of normal and low-quality semen*. Int. J. Androl. 22: 190-196.
67. Graham J.K. 1994. *Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process*. Theriogenology 41: 1151-1162.
68. Hashemi M.M., Behnampour N., Nejabat M., Tabandeh A., Ghazi-Moghaddam B., Joshaghani H.R. 2018. *Impact of seminal plasma trace elements on human sperm motility parameters*. Rom. J. Iner. Med. 56:1-15.

69. Heise A., Kähn W., Volkmann D.H., Thompson P.N., Gerber D. 2010. *Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa*. Anim. Reprod. Sci. 118: 48-53.
70. Heise A., Thompson P.N., Gerber D. 2011. *Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa*. Anim. Reprod. Sci. 123: 192-201.
71. Huanca W., Cordero A., Huanca T., Adams G., 2007. *Biotechnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas*. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15 (1): 195-201.
72. Huanca W.F., Turín J., Machaca M., Villanueva J., Huanca W. 2015. *Efecto del tratamiento de semen de alpaca (vicugna pacos), con métodos no enzimáticos, sobre las características seminales, a diferentes tiempos de evaluación*. VII Congreso Mundial en Camelidos Sudamericanos, At Puno, Perú.
73. Johnson L.W. 1989. *Llama Reproduction*. In: Johnson, L.W (ed). Vet. Clinic of North America. Food Animal Practice W.B. Saunders Co. Philadelphia PA, 37-54 y 159-182.
74. Juyena N.S. Stelletta C. 2012. *Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa Review*. J. Androl. 33: 536-551.
75. Kareskoski A.M., del Alamo M.M., Güvenc K., Reilas T., Calvete J.J., Rodriguez-Martinez H., Andersson M., Katila T. 2011. *Protein composition of seminal plasma in fractionated stallion ejaculates*. Reprod Domest Anim. 46:79-84.
76. Kershaw C. M., Evans G., Rodney R., Maxwell W. M. C. 2017. *Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm function and improve post-thaw motility rates*. Reprod. Fertil. Dev. 29: 1107-1114.

77. Kershaw-Young C.M., Stuart C., Evans G., Maxwell W. 2013. *The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function*. Anim. Reprod. Sci.138: 261–267.
78. Kershaw-Young C.M., Druart X., Vaughan J., Maxwell W.M. 2012a. *β -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas*. Reprod Fertil Dev. 24:1093-7.
79. Kershaw-Young C.M., Evans G., Maxwell W.M.C. 2012b. *Glycosaminoglycans in the accessory sex glands, testes and seminal plasma of alpaca and ram*. Reprod. Fertil. Dev. 24: 362-369.
80. Kershaw-Young C.M., Maxwell W.M.C. 2012c. *Seminal plasma components in Camelids and Comparisons with other species*. Reprod. Dom. Anim. 47: 369-375.
81. Kershaw-Young C.M. and Maxwell W.M.C. 2011. *The effect of seminal plasma on alpaca sperm function*. Theriogenology 76: 1197-1206.
82. Kovacs A., Foote R.H., 1992. *Viability and Acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa*. Biotech. Histochem. 67: 119-124.
83. Kútvölgyi G., Stefler J., Kóvacs A. 2006. *Viability and acrosome staining of stallion spermatozoa by Chicago sky blue and Giemsa*. Biotech. Histochem. 81: 109-117.
84. Leahy T., de Graaf S.P. 2012. *Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing*. Reprod. Dom. Anim. 47: 207-13.
85. Leahy T., Marti J.I., Evans G., Maxwell W.M. 2010. *Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa*. Anim. Reprod. Sci. 119: 147-153.

86. Ledesma A., Fernández-Alegre E., Cano A., Hozbor F., Martínez-Pastor F., Cesari A. 2016. *Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm*. Anim. Reprod. Sci. 173: 35-41.
87. Ledesma A., Manes J., Ríos G., Aller J., Cesari A., Alberio R., Hozbor F. 2015. *Effect of Seminal Plasma on Post-Thaw Quality and Functionality of Corriedale Ram Sperm Obtained by Electroejaculation and Artificial Vagina*. Reprod. Dom. Anim. 50: 386-392.
88. Leon J.B., Smith B.B., Timm K.I., LeCren G. 1990. *Endocrine changes during pregnancy, parturition and the early post-partum period in the llama (Lama glama)*. J. Reprod. Fert. 88: 503-511.
89. Lichtenwalner A., Woods G.L., Weber J.A. 1996. *Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas*. Theriogenology 46: 293-305.
90. Madruga M.S., Lacerda de Medeiros E.J., Hauss de Sousa W., Gomes M.G., Pereira J.M., Ramos do Egypto Queiroga R.C. 2009. *Chemical composition and fat profile of meat from crossbred goats reared under feedlot systems*. Rev. Bras. Zootecnia 38: 547-552.
91. Malo C., Elwing B., Soederstroem L., Lundeheim N., Morrell J. M., Skidmore J. A. 2019. *Effect of different freezing rates and thawing temperatures on cryosurvival of dromedary camel spermatozoa*. Theriogenology 125: 43-48.
92. Malo C., Crichton E. G., Morrell J. M., Pukazhenthil B. S., Johannisson A., Splan R., Skidmore J. A. 2018. *Colloid centrifugation of fresh semen improves post-thaw quality of cryopreserved dromedary camel spermatozoa*. Anim Reprod Sci 192: 28-34.

93. Malo C., Crichton E. G., Skidmore J. A. 2017. *Optimization of the cryopreservation of dromedary camel semen: Cryoprotectants and their concentration and equilibration times.* Cryobiology 74: 141-147.
94. Malo C., Morrell J.M., Crichton E.G., Pukazhenthil B.S., Skidmore J.A., 2016. *Use of colloid single layer centrifugation for dromedary camel semen: effect of initial dilution and comparison of two colloid sperm quality parameters.* Anim. Reprod. Sci. 169: 123.
95. Mamani-Linares L.W., Cayo F., Gallo C. 2014. *Características de canal, calidad de carne y composición química de la carne de llama: una revisión.* Rev. Inv. Vet. Perú 25: 123-150.
96. Mamani-Linares L.W., Gallo C.B. 2013. *Meat quality attributes of the Longissimus lumborum muscle of the Kh'ara genotype of llama (Lama glama) reared extensively in northern Chile.* Meat Science 94: 89-94.
97. Manjunath P., Sairam M.R. 1987. *Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma.* Biochem. J. 241: 685-692
98. Manjunath P., Thérien I. 2002. *Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation.* J. Reprod. Imm. 53: 109-19
99. Maxwell W.M.C., Johnson L.A. 1997. *Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation.* Mol. Reprod. Dev. 46: 408-418.
100. Maxwell W.M., de Graaf S.P., Ghaoui Rel-H., Evans G. 2007. *Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility.* Soc. Reprod. Fertil. 64:13-38.

101. Meza A., Caldeira C., Valverde A., Ordóñez C., Ampuero E., Cucho H., Soler C. 2018. *Sperm kinematic characterization of alpaca (Vicugna pacos L.) during the reproductive season*. *Reprod. Dom. Anim.* 53: 1415-1423.
102. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, “Los Camélidos Sudamericanos en Argentina y en América”, 2011. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_de_camelidos/camelidos_general/07-CAMELIDOS_miniagri.pdf
103. Miragaya M.H., Chaves M.G., Capdevielle E.F., Ferrer M.S., Pinto M., Rutter B., Neild D.M., Agüero A. 2002. *In vitro maturation of llama (Lama glama) oocytes obtained surgically using follicle aspiration*. *Theriogenology* 57: 731.
104. Miragaya M.H, Chaves M., Neild D., Berretta C., Agüero A., 2001. *Artificial insemination using stallion semen cryopreserved with a simple manual method*. *Fertil. Steril.* 68(3-4): 336-337.
105. Monaco D., Fatnassi M., Padalino B., Hammadi M., Khorchani T., Lacalandra G. M. 2016. *Effect of alpha-Amylase, Papain, and Spermfluid treatments on viscosity and semen parameters of dromedary camel ejaculates*. *Res Vet Sci* 105: 5-9.
106. Moore A.I., Squires E.L., Graham J.K. 2005. *Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa*. *Theriogenology* 63: 2372-2381.
107. Morrell J.M., Georgakas A., Lundeheim N., Nash D., Davies Morel M.C., Johannisson A. 2014. *Effect of heterologous and homologous seminal plasma on stallion sperm quality*. *Theriogenology* 82:176-83.

108. Morrell J.M., Rodriguez-Martinez H., Johannisson A. 2010. *A Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing*. *Reprod. BioMed. Online* 21: 429-436.
109. Morton K.M., Evans G., Maxwell W.M. 2010. *Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm*. *Theriogenology* 74: 311-316.
110. Morton K.M., Bathgate R., Evans G., Maxwell W.M. 2007. *Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws*. *Reprod. Fertil. Dev.* 19: 792-6.
111. Mueller J.P., Rigalt F., Cacino A.K., Lamas H. 2010. *Calidad de las fibras de Camélidos Sudamericanos en Argentina*. International Simposium on Fiber South American Camelids. Huancavelica, Perú.
112. Niasari-Naslaji A., Mosaferi S., Bahmani N., Gerami A., Gharahdaghi A. A., Abarghani A., Ghanbari A. 2007. *Semen cryopreservation in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) using SHOTOR diluent: effects of cooling rates and glycerol concentrations*. *Theriogenology* 68: 618-625.
113. Niasari-Naslaji A., Mosaferi S., Bahmani N., Gharahdaghi A. A., Abarghani A., Ghanbari A., Gerami A. 2006. *Effectiveness of a tris-based extender (SHOTOR diluent) for the preservation of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) semen*. *Cryobiology* 53: 12-21.
114. Neild D.M., Bart M., Gadella M., Chaves G., Miragaya M.H., Colenbrander B., Aguero A., 2003. *Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation*. *Theriogenology* 59: 1693-1705.

115. Neild D.M., Chaves M.G., Flores M., Mora N., Beconi M.T., Agüero A. 1999. *Hypoosmotic test in equine spermatozoa*. Theriogenology 51: 721-727.
116. Pérez L.J., Valcárcel A., de las Heras M.A., Moses D., Baldassare H. 1996. *Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay*. Theriogenology 46: 131-140.
117. Pinto Jiménez, C. E., Martín Espada C., y Cid Vázquez M.D. 2010. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 4:23-36
118. Ratto M.H., Gomez C., Berland M., Adams G.P. 2007. *Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas*. Anim. Reprod. Sci. 97: 246-256.
119. Ratto M.H., Huanca W., Singh J., Adams G.P. 2005. *Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas*. Reprod. Biol. Endocr. 3:29.
120. Ratto M.H., Berland M., Adams G.P. 2002. *Ovarian superstimulation and ultrasound-guided oocyte collection in llamas*. Theriogenology 57: 590.
121. Rodrigues M.A.M., Souzaa C.E.A., Martins J.A.M., Regoa J.P.A., Oliveira J.T.A., Domont G., Nogueira F.C.S., Mouraa A.A. 2013. *Seminal plasma proteins and their relationship with sperm motility in Santa Ines rams*. Small Rum. Res. 109: 94-100.
122. Sabatini C., Mari G., Mislei B., Love C., Panzani D., Camillo F., Rota A. 2014. *Effect of post-thaw addition of seminal plasma on motility, viability and chromatin integrity of cryopreserved donkey jack (Equus asinus) spermatozoa*. Reprod. Dom. Anim. 49: 989-994.
123. San Martin M., Copaira M., Zuniga J., Rodreguez R., Bustinza G., Acosta, L. 1968. *Aspects of reproduction in the alpaca*. J. Reprod. Fertil. 16: 395-399.

124. Santa Cruz C.R., Arraztoa C.C., Carretero M.I., Ferrante A., Caldevilla M., Moncalvo E., Giuliano S. 2012. *Use of 2 and 4 % of dimethylformamide as cryoprotectant to freeze llama semen*. *Invet*, 14(1): 297.
125. Santiani A., Evangelista Vargas S., Valdivia Cuya M., Risopatrón González J., Sánchez Gutiérrez R., 2013. *Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation*. *Theriogenology* 79: 842-846.
126. Santiani A., Huanca W., Sapana R., Huanca T., Sepúlveda N., Sánchez N. 2005. *Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (Lama pacos) semen using two different cryoprotectants and extenders*. *Asian J. Androl.* 7: 303–309.
127. Sarsaifi K., Vejayan J., Haron A.W., Yusoff R., Hani H., Rasoli M., Omar M.A., Othman A.M. 2015. *Protein profile and functionality of spermatozoa from two semen collection methods in Bali bulls*. *Livestock Sci.* 172: 96-105.
128. Sari L.M., Zampini R., Argañaraz M.E., Carretero M.I., Fumuso F.G., Barraza D.E., Ratto M., Apichela S.A. "Expression of β -NGF and high affinity HNF receptors (TrKA) in Llama (*Lama glama*). Male reproduction tract and spermatozoa" *Mol. Reprod. Dev.* 85: 934-944.
129. Silva M., Fernández A., Ulloa-Leal C., Adams G.P., Berland M.A., Ratto M.H. 2015. *LH release and ovulatory response after intramuscular, intravenous, and intrauterine administration of β -nerve growth factor of seminal plasma origin in female llamas*. *Theriogenology* 84: 1096-1102.
130. Skindmore J. A., Billah M. 2006. *Comparison of pregnancy rates in dromedary camels (Camelus dromedarius) after deep intra-uterine versus cervical insemination*. *Theriogenology* 66: 292-296.

131. Somfai T., Bodó S., Nagy S., Gócza E., Iváncsics J., Kóvacs A. 2002. *Simultaneous evaluation of viability and acrosome integrity of mouse spermatozoa using light microscopy*. Biotech. Histo. 77: 117-120.
132. Sumar J. 2013. *Embryo transfer in domestic South American camelids*. Anim. Reprod. Sci. 136: 170-177.
133. Sumar J. 1991. Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. In: Fernández-Baca, S. (Ed.). *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*. Editorial FAO. Santiago de Chile: 111-147.
134. Suzuki K., Asano A., Eriksson B., Niwa K., Nagai T., Rodriguez-Martinez H. 2002. *Capacitation status and in vitro fertility of boar spermatozoa: effects of seminal plasma, cumulus-oocyte-complexes-conditioned medium and hyaluronan*. Androl. 25: 84-93.
135. Taylor P., Taylor S., Sansinena M., Godke R. 2006. *Llama (Lama glama) pregnancies from vitrified/warmed blastocysts using a novel coaxial cryoprotectant microinjection system*. Reprod. Fertil. Dev. 18: 164.
136. Tibary A., Vaughan J. 2006. *Reproductive physiology and infertility in male South American Camelids: A review and clinical observations*. Small Rum. Res. 61: 283-298.
137. Torres M.A., Ravagnani G.M., Leal D.F., Martins S.M., Muro B.B., Meirelles F.V., Papa F.O., Dell'aqua J.A., Alvarenga M.A., Moretti A.S., De Andrade A.F. 2016. *Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing*. J. Anim. Sci. 94: 1906-12.
138. Trasorras V., Baca Castex C., Alonso A., Giuliano S., Santa Cruz R., Arraztoa C., Chaves G., Rodríguez D., Neild D., Miragaya M. 2014. *First llama (Lama glama) pregnancy obtained*

- after in vitro fertilization and in vitro culture of gametes from live animals. Anim. Reprod. Sci.* 148: 83-89.
139. Trasorras V., Giuliano S., Miragaya M. 2013. *In vitro production of embryos in South American camelids. Anim. Reprod. Sci.* 136: 187-193.
140. Trasorras V., Giuliano S., Chaves G., Neild. D., Agüero A., Carretero M.I., Santa Cruz R., Baca Castex C., Alonso A., Pinto M., Morrell M., Miragaya M. 2012. *In vitro embryo production in llamas (Lama glama) from in-vivo matured oocytes with fresh semen processed with Androcoll- ETM using defined embryo culture media. Reprod. Dom. Anim.* 47: 562-567.
141. Trasorras V.L., Chaves M.G., Miragaya M.H., Pinto M., Rutter B., Flores M., Agüero A. 2009. *Effect of eCG superstimulation and buserelin on cumulus-oocyte complexes recovery and maturation in llamas (Lama glama). Reprod. Dom. Anim.* 44: 359-64.
142. Tribulo P., Bogle O., Mapletoft R.J., Adams G.P. 2015. *Bioactivity of ovulation inducing factor (or nerve growth factor) in bovine seminal plasma and its effects on ovarian function in cattle. Theriogenology* 83: 1394-1401.
143. Urquieta B., Hernández M., García A., Paolicchi F., Rojas J. 1995. *Efecto del análogo de GnRH (buserelina) sobre los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona, así como sobre la morfología ovárica y citología vaginal en vicuña adulta no gestante. Rev. Agro-Ciencia,* número extraordinario, 123.
144. Vaughan J., Galloway D., Hopkins D. 2003. *Artificial insemination in alpacas (Lama pacos).* RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation, Pub. N° 03/104, Kingston, Australia.

145. Vaughan J.L. 2001. *Control of ovarian follicular growth in the alpaca (Lama pacos)*. PhD Thesis. Central Queensland University.
146. Von Baer A, Del Campo M.R., Donoso D., Toro, F., von Baer L., Montecinos S., Rodríguez-Martínez H., Palasz A.T. 2002. *Vitrification and cold storage of llama (lama glama) hatched blastocysts*. Theriogenology 57: 489.
147. Von Baer, L., Hellemann, C. 1998. *Variables seminales en llama (Lama glama)*. Arch. Med. Vet. 30.
148. Watson P.F. 2000. *The causes of reduce fertility with cryopreserved semen*. Anim. Reprod. Sci. 60: 481-492.
149. Zampini R., Sari L.M., Argañaraz M. E., Fumuso F.G., Barraza D.E., Carretero M.I., Apichela S. 2018. *Mating induces production of MMP2 in the llama oviduct: Analysis of MMP2 effect on semen*. Anim. Reprod. Sci. 192: 223-232.
150. Zea F., Pérez G., Maquera Z., Pacheco J. 2015. *Restauración del plasma seminal en espermatozoides colectados del conducto deferente de alpaca (Vicugna pacos)*. Libro de resúmenes del VII congreso mundial en Camélidos Sudamericanos. Puno, Perú. Vol 7: 61.

