

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**“EFECTO DE LA ADICIÓN DE PLASMA SEMINAL ANTES Y DESPUÉS DE  
LA CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES COLECTADOS DEL  
CONDUCTO DEFERENTE DE ALPACA SOBRE ALGUNAS  
CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS”**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. EDITA YOLA TORRES MAMANI**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**PUNO – PERÚ**

**2018**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TESIS

“EFECTO DE LA ADICIÓN DE PLASMA SEMINAL ANTES Y DESPUÉS DE LA  
CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES COLECTADOS DEL CONDUCTO  
DEFERENTE DE ALPACA SOBRE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS  
ESPERMÁTICAS”

PRESENTADA POR:

Bach. EDITA YOLA TORRES MAMANI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA



APROBADA POR:

PRESIDENTE:

  
D.Sc. NATALIO LUQUE MAMANI

PRIMER MIEMBRO:

  
M.Sc. VALERIANO ZENON MAQUERA MARON

SEGUNDO MIEMBRO:

  
M.Sc. EDWIN JULIO CONDORI CARBAJAL

DIRECTOR:

  
D.Sc. MANUEL GUIDO PEREZ DURAND

ASESOR:

  
D.Sc. TEODOSIO HUANCA MAMANI

ASESOR:

  
Mg. Sc. HUGO WENCESLAO DEZA CALSIN

Área: Reproducción animal

Tema: Adición de plasma seminal en la congelación de espermatozoides en alpacas

Fecha de sustentación: 26 de diciembre del 2018

## DEDICATORIA

A mis padres Gerardo Torres Benito y Graciela Mamani Flores, mis hermanos Magali y César, Por su infinito amor y apoyo incondicional hicieron que termine mi carrera.

A mi abuelo Mariano Zenón Torres Merma. Por ser esa voz de calma, fortaleza y ahora desde el cielo mi ángel protector.

A mis mascotas Cody, Trudy, Islady y Gaspar mis perrunos y a Ballito mi corderito quienes marcaron mi sendero para esta hermosa profesión.

A los Paquis, las alpacas del laboratorio de Reproducción Animal quienes fueron partícipes de este trabajo de investigación.

A mi facultad y Universidad mi eterna gratitud.

## AGRADECIMIENTO

Primeramente, a Dios, por la vida y mis padres que me dio, por enseñarme que cada día que pasa es para superar miedos y obstáculos, aprender de ellos y crecer.

A mi querida Universidad Nacional del Altiplano y a mi Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por permitirme aprender en sus salones, a mis docentes por brindarme sus conocimientos, Al Dr. Simon Fraquita Ch. por brindarme sus orientaciones desde mi primer semestre.

Las gracias a mi director de tesis, Dr. Guido Perez Durand, A mi asesor de tesis M.sc. Hugo Beza por su ayuda, dedicación y por brindarme todas las facilidades, guiarme en la elaboración de esta investigación y apoyar en el desarrollo de la misma sin los que no hubiera sido posible la realización de esta tesis.

Al Dr. Natalio Luque Mamani, Mg. Zenón Maquera Maron y M.cs, Julio Condori Carbajal miembros del jurado de esta tesis, por colaborar con todos sus conocimientos para la redacción de la misma.

Al Dr. Vladimiro Ibáñez por su apoyo con los datos estadísticos de esta investigación.

A mis compañeros tesisistas por su ayuda incondicional en el laboratorio, por hacer más amena nuestros días de trabajo, Madeleyne, Darwin.

Agradezco profundamente a mis padres por su amor y apoyo infinito, por estar en cada sonrisa y caída a pesar de la distancia. Por enseñarme desde pequeña a respetar la naturaleza y los animales, por su esfuerzo y convicción ya que sin ustedes mis estudios, mis sueños no hubiesen sido posibles. Gracias por ser mis padres, por estar ahí siempre, por las oportunidades, por dejarme crecer, estudiar y siempre incentivarme a soñar más.

A mi hermanita Magali por tu eterna complicidad, por tu compañía y ayudarme a cuidar a los inquilinos que llegaban a la casa, al gato, al cuy, a los perros, por acompañarme en las horas de guardia en el hospital, por las veces que fueron necesarias ir a ver a Apolo el toro de mi curso de cirugía, por aguantarme en todo, Sin ti, sin las peleas, sin las risas, sin las pláticas y sin nuestro eterno debate sobre el hombre y la naturaleza... No miraría el alcance e impacto de esta mi hermosa profesión, como hoy la veo. ¡Gracias, psicóloga loca!. Y a mi hermano menor Cesar, gracias por objetar mis ñiñerías en casa y por el teléfono y recordarme que soy la hermana mayor.

Al hermano mayor que nunca tuve Samuel, por sus consejos por apoyarme en los momentos más críticos y los bonitos paseos por la orilla del lago Titicaca. Y a mi primo Abel por leer mis textos melancólicos en Messenger y whatsapp y darme sus puntos de vista y consejos.

A mis amigos Arnaldo (Nandito), Luis, Rony Dueñas, Mario (Marito), Elvio, Yordano, R. Choquenayra (Choque), J. Huaylla (Gato), por los bonitos momentos. Mis amigas Dalía, Mery, Delia, Jimena y la que me soporto en la lejanía, Janet, por vuestra amistad incondicional, vuestro apoyo en los malos momentos y por todas las grandes experiencias que me habéis hecho vivir. ¡¡¡gracias chicos!!!

Al resto de amigos, muchos para citarlos a todos, pero también muy importantes para mí, como no mencionar a mis amigos los Galácticos, Lorena, Reynaldo, Padilla, Velarde y todos ¡¡¡gracias por su amistad y hacerme reír!!!

Gracias a la vida y sus circunstancias por enseñarme a disfrutar, luchar, amar y sonreír hasta en los momentos más difíciles Total... ¡¡¡Mañana es un nuevo día!!!

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS .....	9
RESUMEN.....	10
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>12</b>
1.1 Objetivos de la investigación.....	13
1.1.1 Objetivo general .....	13
1.1.2 Objetivos específicos.....	13
<b>II REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1 Los camélidos sudamericanos.....	14
2.2 Fisiología reproductiva del macho .....	15
2.2.1 La espermatogénesis.....	15
2.2.2 Semen .....	16
2.2.2.1 El espermatozoide.....	16
2.2.2.2 Plasma seminal:.....	19
2.3 Componentes bioquímicos del plasma seminal.....	20
2.3.1 Proteínas.....	20
2.3.2 Albumina .....	20
2.3.3 Calcio.....	21
2.3.4 Lípidos .....	21
2.4 Efecto del plasma seminal .....	22
2.4.1 Estrés Oxidativo .....	22
2.4.2 Sistema antioxidante seminal.....	22
2.5 Efecto del plasma seminal en la crio preservación de espermatozoides .....	23
2.6 Dilutores del semen.....	23
2.7 Los crio protectores .....	25
2.8 Crio conservación del semen.....	26
2.8.1 Refrigeración.....	26
2.8.2 Congelación .....	27
2.8.3 Descongelación.....	27
2.9 Evaluaciones sobre el estado de los espermatozoides.....	28
2.9.1 Determinación de la motilidad .....	28
2.9.2 Determinación de la Integridad de membrana.....	28
2.9.3 Porcentaje de viabilidad espermática .....	29
2.9.4 Integridad del acrosoma.....	29
2.10 Antecedentes de la colecta dilución y descongelación de los espermatozoides...29	
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 Lugar de Ejecución.....	32
3.2 Animales.....	32
3.3 Metodología .....	33
3.3.1 Colecta de semen por vagina artificial.....	33
3.3.2 Obtención de plasma seminal.....	33

3.3.3 Preparación del dilutor .....	34
3.3.4 Preparación del crioprotector .....	35
3.3.5 Previo a la colección de espermatozoide. ....	36
3.3.6 Obtención de espermatozoides .....	37
3.3.7 Adición de espermatozoides a diferentes concentraciones de plasma seminal al momento de la colecta. ....	38
3.3.8 Adición del diluyente en las muestras espermáticas antes de la congelación...39	
3.3.9 Proceso de la congelación .....	39
3.3.10 Adición de plasma seminal al momento de la descongelación.....	40
3.3.11 Evaluación de las características espermáticas Microscópicas .....	41
3.3.11.1 Motilidad individual .....	41
3.3.11.2 Vitalidad.....	42
3.3.11.3 Integridad de acrosoma .....	43
3.3.11.4 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide (HOST) .....	44
3.3.12 Análisis estadístico.....	44
<b>IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>46</b>
4.1 Evaluación a la colección .....	46
4.1.1 Motilidad individual .....	46
4.1.2 Vitalidad.....	47
4.1.3 Integridad de Membrana .....	49
4.1.4 Integridad de Acrosoma .....	50
4.2 Evaluación a la dilución .....	52
4.2.1 Motilidad individual .....	52
4.2.2 Vitalidad .....	54
4.2.3 Integridad de Membrana al momento de la dilución .....	55
4.2.4 Integridad de Acrosoma .....	57
4.3 Evaluación a la descongelación .....	58
4.3.1 Motilidad individual: .....	58
4.3.2 Vitalidad: .....	61
4.3.3 Integridad de Membrana: .....	62
4.3.4 Integridad de Acrosoma: .....	64
<b>V CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>VII. REFERENCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>76</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura N° 1 Preparación de los tratamientos.....	89
Figura N° 2 Obtención de los espermatozoides .....	89
Figura N° 3 Fase de refrigeración .....	90
Figura N° 4 Registro de refrigeración.....	90
Figura N° 5 Empajillado del semen.....	90
Figura N° 6 Pajillas en vapores de nitrógeno líquido .....	91
Figura N° 7 Preparación de las proporciones de plasma seminal para el descongelado. .....	91
Figura N° 8 Incubación de las proporciones de plasma seminal .....	91
Figura N° 9 Secado de la pajilla después del Baño Maria.....	92
Figura N° 10 Obtención de la pajilla al azar .....	92
Figura N° 11 Motilidad al momento de la colecta .....	92
Figura N° 12 Motilidad al momento de la descongelación.....	92
Figura N° 13 Vitalidad al momento de la colecta.....	93
Figura N° 14 Vitalidad al momento de la descongelación .....	93
Figura N° 15 Integridad de membrana al momento de la colecta.....	93
Figura N° 16 Integridad de membrana al momento de la descongelación.....	94
Figura N° 17 Integridad de Acrosoma al momento de la colecta.....	94
Figura N° 18 Integridad de Acrosoma al momento de la descongelación .....	94

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Motilidad individual al momento de la colecta.....	46
Tabla N° 2 Vitalidad de espermatozoides al momento de la colecta .....	47
Tabla N° 3 Integridad de membrana al momento de la colecta. ....	49
Tabla N° 4 Integridad de Acrosoma de espermatozoides al momento de la colecta ...	50
Tabla N° 5 Motilidad individual de espermatozoides al momento de la dilución .....	52
Tabla N° 6 Vitalidad de espermatozoides al momento de la dilución .....	54
Tabla N° 7 Integridad de membrana al momento de la dilución. ....	56
Tabla N° 8 Integridad de Acrosoma al momento de la dilución .....	57
Tabla N° 9 Motilidad individual al momento de la descongelación. ....	59
Tabla N° 10 Vitalidad de espermatozoides al momento de la descongelación .....	61
Tabla N° 11 Integridad de membrana al momento de la descongelación .....	62
Tabla N° 12 Integridad de Acrosoma al momento de la descongelación.....	65



**ÍNDICE DE ACRÓNIMOS**

(CS)	Camélidos sudamericanos.
(DCD)	Desviación del Conducto Deferente
(PS)	Plasma Seminal
(SPR)(SPRs)	Espermatozoide(s)
(OIF)	Factor de Inducción a la Ovulación
(AO)	Capacidad Antioxidante
(ERO)	Especies Reactivas de Oxígeno
(EO)	Estrés Oxidativo
(RL)	Radicales Libres
(PH)	Potencial de Hidrogeniones
(VA)	Vagina Artificial.
(AMPc)	Adenosina Ciclico
(VLDL)	Lipoproteínas de Muy Baja Densidad
(ATP)	Adenosina Trifosfato
(EN)	Eosina Nigrosina
(HOST)	Prueba Hipo-Osmótica
(h)	Hora
(mEq)	Miliequivalente
(uL)	Micro Litros
(mg)	Miligramos
(dL)	Decilitros
(PI)	Yoduro de propidio
(FITC)	Isotionato de fluorescencia
(PNA)	Aglutina de hipogea de Arachis

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal (FMVZ, UNA, Puno), con el objetivo de evaluar el efecto de la adición del plasma seminal antes y después de la congelación de espermatozoides. En dos Alpacas machos Huacayo con desviación del conducto deferente, como donadores de espermatozoides y cuatro alpacas macho Suri, como donadores de plasma seminal. La colecta de semen se realizó 2 veces por semana; mientras que, la obtención de plasma seminal se realizó en una sola oportunidad. El semen fue diluido con Tris más 20% de yema de huevo y el plasma seminal fue añadido en proporción al dilutor según cada tratamiento (T10) 10% de plasma seminal, (T50) 50% de plasma seminal y (T100) 100% de plasma seminal y (T0) sin plasma seminal. No hubo efecto ( $p>0.05$ ) de la adición del plasma seminal al momento de la colecta en los parámetros seminales evaluados. Mientras que a la dilución la motilidad individual fue mejor ( $p\leq 0.05$ ) en T50 (41.83%) y T100 (43.63%) respecto de T10 (36.01) y T0 (31.27%); similar efecto se observó sobre integridad de membrana e integridad de acrosoma, siendo los tratamientos T100 y T50 los que mejor ( $p\leq 0.05$ ) preservaron la membrana (47.14% y 48.19%, respectivamente) y el acrosoma (54.03% y 50.77%, respectivamente) en comparación a los tratamientos T10 y T0. A la descongelación no hubo efecto ( $p>0.05$ ) sobre la motilidad individual y vitalidad, pero si sobre integridad de membrana siendo mejor ( $p\leq 0.05$ ) T100 (43.74%) respecto de los demás tratamientos; mientras que, para integridad de acrosoma tanto T100 (44.59%) y T50 (45.08%) fueron superiores ( $p\leq 0.05$ ) a T10 y T0. En conclusión, el plasma seminal no tendría un gran efecto sobre motilidad individual y vitalidad, al parecer jugaría un rol importante sobre el mantenimiento de la integridad de membrana e integridad de acrosoma.

**Palabras Clave:** Plasma seminal, espermatozoides, conducto deferente, congelación, alpaca.

## ABSTRACT

The present work was carried out in the Animal Reproduction Laboratory (FMVZ, UNA, Puno), with the objective of evaluating the effect of the addition of seminal plasma before and after the freezing of sperm, on individual motility, vitality, integrity of membrane and acrosome. In two Huacayo male Alpacas with deviation of the vas deferens, they were used as sperm donors and four male Suri alpacas, as donors of seminal plasma. The collection of semen was performed twice a week; whereas, obtaining seminal plasma was performed in only one opportunity. The semen was diluted with Tris plus 20% of egg yolk and the seminal plasma was added in proportion to the dilutor according to each treatment: (T10) 10% of seminal plasma, (T50) 50% of seminal plasma and (T100) 100% of seminal plasma and (T0) without seminal plasma. There was no effect ( $p > 0.05$ ) of the addition of seminal plasma at the time of collection on the evaluated seminal parameters. While at the dilution the individual motility was better ( $p \leq 0.05$ ) in T50 (41.83%) and T100 (43.63%) with respect to T10 (36.01%) and T0 (31.27%); Similar effect was observed on membrane integrity and acrosome integrity, being the T100 and T50 treatments the best ( $p \leq 0.05$ ) preserved the membrane (47.14% and 48.19%, respectively) and the acrosome (54.03% and 50.77%, respectively) compared to the T10 and T0 treatments. At thawing there was no effect ( $p > 0.05$ ) on individual motility and vitality, but on membrane integrity being better ( $p \leq 0.05$ ) T100 (43.74%) compared to the other treatments; whereas, for acrosome integrity, both T100 (44.59%) and T50 (45.08%) were higher ( $p \leq 0.05$ ) at T10 and T0. In conclusion, the seminal plasma would not have a great effect on individual motility and vitality, but apparently it would play an important role on the maintenance of membrane integrity and acrosome integrity.

**Keywords:** Seminal plasma, Spermatozoa, Deferent duct, Freezing, Alpaca.

## I. INTRODUCCIÓN

Las alpacas son una de las especies domésticas, denominados camélidos del nuevo mundo, los mismos que viven en grandes altitudes hecho que tal vez haya favorecido a la ubicación de la mayor población mundial de Camélidos Sudamericanos (SCA) en los altos Andes del Perú por encima de los 4000 metros de altura, para la mayoría de sus criadores, es la única fuente de sustento económico y la principal fuente de proteína en su dieta (Bravo y Skidmore., 2000; Huanca *et al.*, 2007). Por ello es importante mejorar el progreso genético de las alpacas utilizando biotecnologías reproductivas para elevar la eficiencia reproductiva y lograr los mejores individuos. Los avances en la crio preservación del semen en CSA están siendo muy lentos en comparación a otras especies domésticas, debido a los mayores inconvenientes como la filancia y viscosidad del semen la cual no favorece la exitosa preservación del espermatozoide (Bravo, Skidmore., 2000 y Kershaw-Young *et al.*, 2013). La técnicas desarrolla por Pérez *et al.* (2006) que consiste en la desviación quirúrgica del conducto deferente, representa una alternativa interesante, permite la colecta de espermatozoides de una manera muy sencilla, además está exento de las secreciones de las glándulas anexas. Varios trabajos se han realizado congelando semen colectado de los conductos deferentes, las tasas de recuperación tras la descongelación son bastante alentadoras; sin embargo, las tasas de fertilidad no son muy diferentes a las alcanzadas tras la inseminación artificial con semen colectado por vagina artificial, al parecer podría deberse a la ausencia de las secreciones de las glándulas anexas (Pacheco *et al.*, 2009).

Dado que las proteínas del plasma seminal de alpacas estarían involucradas en la función espermática, al parecer estas proteínas colaborarían

en la congelabilidad de los espermatozoides y posdescongelación como la observada en carneros y toros (Kershaw-Young y Maxwell., 2012), en alpacas se posee un escaso conocimiento sobre el rol del plasma seminal. Por tal razón se decidió realizar el presente trabajo de investigación con la finalidad de generar información sobre el plasma seminal en los parámetros espermáticos de alpacas como motilidad, vitalidad, integridad membrana e integridad de acrosoma y esta pueda ser utilizado para generar nuevos protocolos de crío preservación en sus diferentes fases como al momento de la colecta, de la dilución y al descongelado de los espermatozoides en esta especie.

## **1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION**

### **1.2.1 OBJETIVO GENERAL:**

Evaluar el efecto de la adición de plasma seminal antes y después de la congelación de espermatozoides colectados de los conductos deferentes en alpacas sobre algunas características espermáticas

### **1.2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- a) Evaluar el efecto de la adición de diferentes niveles de plasma seminal al momento de la colecta sobre la motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana e integridad de acrosoma de espermatozoides colectados de los conductos deferentes en alpacas.
- b) Evaluar a los espermatozoides de alpaca colectados del conducto deferente al momento de la dilución sobre la motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana e integridad de acrosoma.
- c) Evaluar el efecto de la adición de plasma seminal al momento de la descongelación sobre la motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana e integridad de acrosoma de espermatozoides colectados de los conductos deferentes en alpacas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Los camélidos sudamericanos

Los camélidos sudamericanos y los camélidos del viejo mundo se clasifican taxonómicamente en el orden Artiodactyla, suborden Tylopoda y familia Camelidae (Wheeler., 2006; Fowler., 2008). A nivel de grupo se dividen en Lamini y Camelini, y a nivel de género en Lama y Vicugna para animales del nuevo mundo y Camelus para los del viejo mundo (Stanley *et al.*, 1994).

En el Perú existen 2 especies silvestres de camélidos sudamericanos, la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*) y 2 formas domesticadas, la alpaca (*Vicugna pacos*) y la llama (*Lama glama*). Los camélidos domésticos alpaca y llama en los análisis de ADN de Camélidos Sudamericanos(CS) han permitido determinar que la alpaca procede de la vicuña y la llama del guanaco (Kadwell *et al.*, 2001; Stanley *et al.*, 1994).

Los CS resisten ambientes adversos como el del altiplano andino, donde no es posible la producción económica de otras especies de animales domésticos (Pinto *et al.*, 2010). El criador de los CS necesita satisfacer muchas de sus necesidades económicas y para ello ofrece fibra al mercado la cual no cumple las exigencias de la industria textil, por ello no se benefician tanto criadores como industrias textiles. En el Perú la población de alpacas es de 3,685516, en la región de puno se encuentra la mayor población alpaquera con 1,459903, seguido por la región Cusco con 545454 y Arequipa con 468392. (INEI., 2012). Se estima que existen cerca de siete millones de CS en los países andinos, el 51 % se encuentra en Perú y el 34 % en Bolivia.

Solo en Perú se encuentran las cuatro especies de CS (Fernández., 2005; Raggi., 2005).

## 2.2 Fisiología reproductiva del macho

### 2.2.1 La espermatogénesis:

Garner y Hafez. (2000) la espermatogénesis es el proceso por el cual se forman los gametos sexuales del macho, conformada por dos fases: la espermatogénesis y la espermiogénesis a la vez controlada hormonalmente por el eje hipófisis hipotálamo gonadal.

La espermatogénesis en la alpaca aún no se ha descrito, sin embargo, de la llama (*Lama glama*). Delhon. (1983) indico que se evidencia por la presencia de divisiones meióticas de espermatocitos primarios, las células de Sertoli están presentes y las células germinales se asocian en poblaciones celulares.

Núñez *et al.* (2007) demostraron que en épocas reproductivas los testículos muestreados de alpaca presentan el intersticio testicular con grandes acúmulos de células de Leydig rodeando vasos linfáticos y la mayoría de los túbulos seminíferos en plena actividad de espermatogénesis. Sin embargo, en algunos túbulos seminíferos hay escaso desarrollo de su epitelio germinativo y con escaso número de células de la línea germinal.

La población de las células madres emergen a las espermatogonias y se encuentra en dos categorías A y B. Espermatogonias A tienen núcleo de diferentes formas, desde esféricos a ovoides y las espermatogonias B es redondeado y pequeño, que se orientan a la formación de espermatocitos

haploides, estas a partir de moléculas señalizadoras inducen el proceso de espermiogénesis y para concluir se inicia la fase de la espermiación o liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero (Delhon., 1987; Leland *et al.*, 2010; Hafez., 2000).

### **2.2.2 Semen:**

Está compuesto en dos partes, espermatozoides y plasma seminal (PS), es necesario evaluar las características del semen ya que puede ser indicador de la fertilidad de los machos (Maxwell *et al.*, 2007; Axe *et al.*, 2000a). Los testículos proveen de componentes celulares (espermatozoides) el epidídimo y sobre todo las glándulas accesorias proveen la mayor parte de la porción líquida plasma seminal, en camélidos más del 85% del semen está constituido por PS (Garner y Hafez., 2000).

#### **2.2.2.1 El espermatozoide**

Los espermatozoides maduros son célula alargadas conformadas por una cabeza portadora del núcleo, una cola que es necesario para la motilidad celular y está cubierta en su totalidad por la membrana plasmática cuya membrana posee una composición lipídica que juega un rol importante en los procesos de maduración y de capacitación espermática (Garner y Hafez., 2000; Sanocka y Kurpisz., 2004). La composición de la morfología del espermatozoide es como sigue:



**2.2.2.1.1 La cabeza.** - Está conformada por el núcleo, el cual es aplanado y de apariencia oval y que a su vez contiene una cromatina dispuesta de manera muy compacta (Garner y Hafez., 2000).

**2.2.2.1.2 El acrosoma.** - Es la parte anterior que recubre al núcleo espermático, es un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo. En el acrosoma están contenidas varias enzimas hidrolíticas que participan en el proceso de la fecundación, como la proacrosina, hialuronidasa, esterases y ácido-hidrolasas (Mann y Lutwak-Mann, 1981).

**2.2.2.1.3 La cola.** - Está conformada por un cuello y tres segmentos, el medio, el principal y el caudal. El segmento medio está comprendido entre el cuello y el anillo citoplásmico y está conformado por el axonema, las fibras densas y numerosas mitocondrias dispuestas en un patrón helicoidal. El segmento principal continúa en sentido posterior al anillo citoplásmico y está conformado por el axonema y las fibras densas asociadas. Finalmente, el segmento caudal está conformado únicamente por el axonema y la membrana plasmática (Garner y Hafez, 2000).

**2.2.2.1.4 Procesos metabólicos de los espermatozoides.** - Aunque los espermatozoides carecen de muchas de las organelas, poseen las enzimas necesarias para realizar diversas reacciones bioquímicas como la glucólisis, el ciclo del ácido tricarbóxico, la oxidación de ácidos grasos y el transporte de

electrones (Mann, 1975). La energía requerida para la motilidad proviene de reservas intracelulares de ATP cuyo empleo está regulado por la concentración endógena del monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), compuesto que también interviene directamente sobre la motilidad de los espermatozoides (Hoskins y Casillas, 1973). El espermatozoide degrada los azúcares, glucosa, fructosa o manosa, a ácido láctico bajo condiciones anaerobias. Esta actividad glucolítica o más correctamente fructolítica, dado que la fructosa es el principal azúcar del semen, permite a los gametos sobrevivir en las condiciones anaerobias, característica que es importante de considerar durante el almacenamiento de espermatozoides para fines de inseminación artificial (Garner y Hafez, 2000).

El espermatozoides utiliza una variedad de sustratos en presencia de oxígeno, actividad respiratoria que le permite emplear el lactato y el piruvato resultantes de la fructólisis de los azúcares, generando dióxido de carbono y agua (Mann, 1975). Esta vía oxidativa, que se localiza en las mitocondrias, es mucho más eficiente que la fructólisis en producir energía. Aunque gran parte del ATP es empleado como fuente de energía para la actividad de motilidad espermática, parte de ésta es destinada al mantenimiento de la integridad de los procesos que intervienen en el transporte activo que se dan a nivel de las membranas del espermatozoide, cuya función es la de mantener la concentración de los componentes iónicos vitales para la

célula espermática. De existir ausencia de sustratos exógenos para generar energía los ESPs hacen uso de sus reservas intracelulares de plasminógeno para dicho fin, pero siendo útil sólo a corto plazo (White, 1980).

#### 2.2.2.2 Plasma seminal:

Es una secreción compleja compuestas por iones inorgánicos, azúcares, sales orgánicas, lípidos, enzimas, prostaglandinas, proteínas y varios factores producidos por los testículos, epidídimo y glándulas accesorias del macho (Maxwell *et al.*, 2007; Töpfer-Petersen *et al.*, 2005). El plasma seminal en la alpaca presenta dos características muy importantes, su capacidad de formar hilo cuando se le pipetea y de presentar viscosidad estructural alta, lo que hace difícil el manejo y procesamiento del semen en camélidos (Kershaw-Young y Maxwell., 2012; Vivanco., 2006; Bravo., 2002 y Casaretto *el at.* 2012).

El plasma seminal actúa como un medio de transporte para los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra y del macho, brinda protección buffer contra los cambios de pH, protege a los espermatozoides de los efectos deletéreos de las especies reactivas del oxígeno a través de las enzimas antioxidantes, regula la respuesta inmune del tracto reproductivo de la hembra (de Graaf *et al.*, 2014; Troedsson *et al.*, 2005). El plasma seminal participa en la maduración final del espermatozoide a través de cambios hormonales, enzimáticos y

modificación de la superficie de membrana espermática (Muiño *et al.*, 2008).

### 2.3 Componentes bioquímicos del plasma seminal

La mayoría de los componentes del plasma seminal de alpaca son comparables con los de otros machos de uso zootécnico a excepción de una menor concentración de fructuosa (4-6mg/dl) y ácido cítrico (4.3 mg/dl) esto puede ser causado por ausencia de vesículas seminales en los camélidos (Garnica., 1995; Fuentes., 1990). (Cuadro N°1)

#### 2.3.1 Proteínas

En cuanto a los componentes de las proteínas, se dividen en tres familias, las adhesinas espermáticas, las proteínas con fibronectina dominios tipos-2 y las proteínas secretorias ricas en cisteína estas son derivadas en su mayor parte por las glándulas accesorias (de Graaf S. *et al.*, 2014) y que la proteína mucina 5B es muy abundante en el PS de alpaca, es la responsable de la filancia y viscosidad del plasma seminal (Kershaw-Young y Maxwell., 2012).

Rios., (1989) identifico por primera vez el Factor de Inducción de la Ovulación (OIF) en el PS. Ratto *et al.*, (2005) demostró la presencia de OIF y su capacidad autotrófica en el PS tanto de alpacas como de llamas. Sin embargo pequeñas cantidades de este factor OIF se encontró en toros, carneros y en equinos (de Graaf *et al.*, 2014).

#### 2.3.2 Albumina

Se cree que la función de las albúminas séricas durante la capacitación in Vitro es la eliminación del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. Algunos experimentos han

demostrado que el colesterol unido a otras proteínas de transferencia de lípidos que están presentes en el líquido folicular o los fluidos de las trompas de Falopio, pueden ser reemplazados por las albúminas en la fertilización *in Vitro*; estos resultados sugieren el desarrollo en la activación en el colesterol (Dragilva *et al.*, 1999)

### 2.3.3 Calcio

Estudios de inducción de reacción acrosómica *in vitro* demostraron que este proceso depende de la presencia del calcio y de su concentración más que de la presencia de los agentes capacitantes (Birch *et al.*, 2009).

### 2.3.4 Lípidos

Los lípidos tienen la característica de promover el flujo de la membrana celular, la permeabilidad y la difusión. La presencia de altos niveles de colesterol en la membrana durante la capacitación es probablemente requerida en la prevención de la capacitación prematura y para promover la reacción acrosomal en un tiempo apropiado (James *et al.*, 1999). Se observó que las proteínas totales, lípidos, glucosa, iones cloro y calcio, presentan concentraciones similares a las observadas en el toro y en el carnero (Kershaw-Young y Maxwell., 2012). Estudios sobre lípidos demostraron que el incremento de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y los triglicéridos están correlacionados con la disminución de las características de motilidad del espermatozoide (Ergün *et al.*, 2007).

Los componentes bioquímicos del plasma seminal no muestran diferencias significativas por efecto de la congelación y

descongelación en comparación con los niveles en fresco. El único componente que muestra modificaciones en su concentración son los triglicéridos, los cuales disminuyen de 44.12% en plasma seminal fresco a 27.31% en plasma seminal descongelado (Díaz *et al.*, 2015).

## 2.4 Efecto del plasma seminal

### 2.4.1 Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo (EO) se produce cuando existe un desequilibrio bioquímico ocasionado por la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO), los cuales exceden la capacidad antioxidante(AO) de un organismo, provocando daño oxidativo a las biomoléculas conduciendo a un daño celular irreversible (Agarwal *et al.*, 2014). En el espermatozoide espermatozoides, se refiere al daño que pueden sufrir en la integridad de sus componentes estructurales y fisiológicos; cuyo efecto está directamente relacionado con la disminución de la sobrevivencia y capacidad fecundante (Córdova *et al.*, 2009). El EO afecta la motilidad de los espermatozoides debido a la peroxidación lipídica, un alto nivel de ERO inducen cambios en la motilidad de los espermatozoides debido a que influyen sobre los canales de Calcio y al agotamiento de las reservas de Adenosín Trifosfato (ATP) (Ren *et al.*, 2001).

### 2.4.2 Sistema antioxidante seminal

Al igual que otras células, los espermatozoides y el plasma seminal (PS) están equipados con sistemas AO para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS. Este sistema AO se compone por AO enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y

no enzimáticos (ascorbato, urato, vitamina E, vitamina C, etc.), proporcionando a los espermatozoides un entorno de protección contra el EO, no obstante ésta se ve influenciada por diversos factores (Garner y Hafez., 2000).

## **2.5 Efecto del plasma seminal en la crio preservación de espermatozoides**

El plasma seminal logra aumentar el porcentaje de (motilidad, integridad de membrana del acrosoma y del ADN) de los espermatozoides ejerciendo sobre ellos un efecto protector durante el proceso de crio preservación (Hernández et al., 2007). Los espermatozoides del epidídimo soportan el stress de congelación (Holt y North, 1994; Watson, 1995) debido a que estos espermatozoides están protegidos por las proteínas y demás componentes que se secretan en el epidídimo y conducto deferente de las alpacas. Además la presencia del PS durante un tiempo de retención de precongelación o refrigeración, que abarca de 2 a 7 h, permiten a los espermatozoides a desarrollar resistencia al choque frío (Pursel et al., 1973). El plasma seminal incluso puede revertir el estado de capacitación y reacción acrosomal prematura que ocurre a causa del proceso de criopreservación cuando los espermatozoides son incubados con plasma seminal (Barrios et al., 2000; García et al., 2010).

## **2.6 Dilutores del semen**

La dilución del semen se realiza para aumentar las posibilidades de utilizar el semen proporcionado un volumen conveniente para asegurar la tasa máxima de fertilización sin desperdiciar espermatozoide, además el diluyente permite la dilución de otros ingredientes que mantienen y protegen a los espermatozoide (Hafez., 2002; Axe *et al.*, 2000b).

La amplia variedad de dilutores, como los medios Citrato, Tris y PBS tienen una presión osmótica variable entre 280 a 320 mOsm/kg, pero, esta sufre cambios durante largos periodos de conservación de muestras espermáticas, debido al metabolismo de los espermatozoides, que puede afectar la sobrevivencia de los espermatozoides, esta condición puede ser más importante cuando trabajamos con muestras espermáticas obtenidas del epidídimo y conducto deferente, en las cuales no están presentes las secreciones de las glándulas anexas (Perez *et al.*, 2014b).

El porcentaje comúnmente usado de yema de huevo para semen de camello bactriano y dromedario de 10 a 20%, en CS se empleó 20% (Giuliano *et al.*, 2005). El aporte más importante del efecto de la yema de huevo en los espermatozoides es la porción del complejo de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (fosfolípidos, lecitinas y cefalinas) que protegen del choque térmico durante el proceso de refrigeración, congelación y descongelación principalmente la lecitina como fosfolípido protector de la superficie de la membrana, formando una capa protectora de la superficie de la membrana del espermatozoide formando una capa protectora contra los cristales de hielo que se forman durante la congelación (Kampschmidt y Mayer., 1953; Manafi., 2011; Moussa *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2010).



## 2.7 Los crio protectores

Purdy. (2006) menciona que el diluyente de crio preservación es para reducir el estrés fisiológico y químico que deriva del proceso de congelar y descongelar a la célula espermática y son clasificados en penetrantes y no penetrantes”

Los crio protectores penetrantes (glicerol) causan un rearrreglo en los lípidos y proteínas de la membrana plasmática, que resulta en un incremento en la fluidez de la membrana, deshidratando la célula y reduce así la formación de hielos intracelulares e incrementa la supervivencia del espermatozoides después del proceso de crio preservación (Holt., 2000; Purdy., 2006). Los crio protectores no penetrantes (leche, yema de huevo), no atraviesan la membrana plasmática, sino que actúan de manera extracelular, disminuyendo la formación de hielo extracelular (Aisén et al., 2000). El glicerol y la yema de huevo han sido los primeros crio protectores, usados en los dilutores para congelación de semen (Curry, 2000; Holt, 2000) y hoy en día muchos dilutores usan el glicerol como el mayor crio protector. El glicerol es usado a concentraciones altas, lo cual puede ser dañino para la viabilidad del espermatozoides a altas temperaturas por lo que es adicionado después de que el semen ha sido refrigerado (Fahy, 1986). Los efectos dañinos son debidos al estrés osmótico, cambios en la organización de la membrana, fluidez y permeabilidad, así como cambios en la composición lipídica.

## 2.8 Crio conservación del semen

El método de crio preservación en el ESP incluye la reducción de la temperatura o refrigeración, la deshidratación celular, el congelado y descongelado de la célula espermática; el descenso de la temperatura del espermatozoide a 5°C reduce el metabolismo celular e incrementa la vida de la célula espermática, pero al ser crio preservada detiene sus actividades celulares, las cuales son restauradas al ser descongeladas (Medeiros et al., 2002).

### 2.8.1 Refrigeración

La refrigeración provocaría en los espermatozoides un proceso de capacitación o similar a la capacitación (Giuliano et al., 2005). La conservación de semen se encuentra asegurada por una parte por la adición de sustancias nutritivas al medio los que evitan el cambio de pH por el metabolismo de los espermatozoides y otra por el descenso progresivo de la temperatura con el fin de detener la actividad espermática, hasta un límite a partir del cual puede ser revertido (Axe et al., 2000a). Está comprobado al reducir la temperatura por debajo de los 20°C, el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática (Giuliano et al, 2008). Trabajos de conservación de espermatozoides colectados del conducto deferente, en diferentes dilutores reportan sobrevivencia de espermatozoides hasta por 48h post-dilución (Quintano., 2002). El periodo de refrigeración que pasa de 37 a 4°C durante 4 horas, donde ocurre la adaptación de la célula espermática con la reducción de su metabolismo, las velocidades de

enfriamiento durante el proceso de refrigeración son lentas 0.5-1°C/min (Hafez., 2002; Barbas., 2009).

### **2.8.2 Congelación**

El proceso de congelación necesita estabilizar la integridad de las células espermáticas para que no sean destruidas durante el transcurso de la congelación, es así que se evaluaron diversos dilutores para ser usados en la crio preservación de espermatozoides, encontrándose que el mejor dilutor para este fin es el tris (hidroximetil amino metano) (Bravo., 1998; Quintano., 2002). El espermatozoides cuando se encuentra entre los 0°C y los -60°C el ESP sufre efectos de descompensación y iónica y de líquidos suficientemente graves para causar un shock térmico (Giuliano et al, 2008). Las velocidades en la fase de congelación las tasas son altas (15-60°C/min) (Hafez, 2002; Barbas, 2009)

### **2.8.3 Descongelación**

La fase de descongelación también es importante para la supervivencia de los espermatozoides, ya que también durante esta etapa el semen cruza por la temperatura crítica entre -15 y -60°C (Echegaray, 2003). La tasa de descongelación depende de si la velocidad de enfriamiento sea lo suficientemente alta para inducir la congelación intracelular o lo suficientemente baja para producir la deshidratación celular (Barbas, 2009).

## 2.9 Evaluaciones sobre el estado de los espermatozoides

### 2.9.1 Determinación de la motilidad

La motilidad es uno de los parámetros más importantes de la analítica seminal, Es el tipo de movimiento que se refleja por la forma de desplazamiento del espermatozoides, pudiendo ser movimiento progresivo rectilíneo o movimiento oscilatorio (Axe et al., 2000a Hidalgo *et al.*, 2005). En tanto en la alpaca no existe motilidad masal, por la baja concentración de espermatozoides observándose una motilidad individual progresiva poco vigorosa, existiendo más una motilidad individual oscilatoria y muy lenta en los espermatozoides, esto último debido al plasma seminal que es viscoso por lo que el movimiento es lento en comparación a otras especies (Bravo, 2002).

### 2.9.2 Determinación de la Integridad de membrana

Una prueba para detectar la funcionalidad de membrana es realizar la prueba hipo osmótica, que consiste en exponer al ESP a una solución hipo-osmótica, si la membrana plasmática es funcional y activa esto puede modular la permeabilidad del agua y como equilibrio osmótico produce una hinchazón y retorcimiento de la cola (Montovani et al., 2002). El análisis de la integridad de la membrana constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho, además no solo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción acrosómica y por tanto para la fertilidad del macho (Hidalgo et al., 2005).

### **2.9.3 Porcentaje de viabilidad espermática**

Las tinciones permiten diferenciar a los espermatozoides vivos de los muertos por coloración, la cabeza de los espermatozoides muertos tiene la propiedad de dejar fijos los colorantes por la perturbación de la membrana cefálica, mientras que en los vivos no (Kershaw - Young y Maxwell., 2011).

### **2.9.4 Integridad del acrosoma**

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación en vista que indica la capacidad de penetrar la zona pelúcida y fusionarse con la membrana plasmática del ovocito y por lo cual se debe realizar una valoración específica, los eyaculados que contienen una alta proporción de espermatozoides con acrosomas alterados o ausentes suelen tener una baja fertilidad. Para determinar el estado del acrosoma se usan, dobles y triples tinciones basadas en la combinación de azul tripán con otros colorantes (Kershaw - Young y Maxwell., 2011).

## **2.10 Antecedentes de la colecta dilución y descongelación de los espermatozoides.**

### **2.10.1 Motilidad:**

Morton et al. (2010), en alpacas encontraron un valor de 52.7% de espermatozoides con motilidad inicial obtenidos de epidídimos de alpacas. Fumuso et al. (2018), reporto 26.8 % y 27.7 % resuspendidos con plasma seminal y HEPES-TALP (HT) al 50% y 100% respectivamente en espermatozoides de llamas obtenidos mediante electro eyaculación e incubados con colagenasa al 0.1%.

Perez y et al. (2014b), al momento de las 6 h controlada a los 5°C de refrigeración obtuvo una motilidad de 58,34 % diluida en Tris más 20% de yema de huevo y suero de cría nacida de alpaca al 5%. Morton *et al.* (2010), indico un valor de motilidad de 46.30% a temperatura de 4°C colectadas de epidídimos transportadas en PBS. Jimenes et al. (2016) reporto valores de 13,4 (10% PS) recuperados de epidídimos de alpacas suspendidos adicionándose en diluyente de leche descremada una proporción del 10% de plasma seminal y se congelo.

### **2.10.2 Porcentajes de Vitalidad espermática:**

Deza. (2004), quien reporto al momento de la colecta una vitalidad de 58.25% de espermatozoides colectados del conducto deferente quien evaluó al diluir en Tris más 20% de yema de huevo. Kershaw - Young y Maxwell, (2011), reporto una vitalidad de 46.9% a partir de espermatozoides de alpaca colectados de epidídimos, suspendidos en 100% plasma seminal. En llamas Fumuso et al, (2018) reporto 56.5 % de vitalidad a la colecta adicionando plasma seminal en un 50% más HT. Calderón, (2015) indico una vitalidad a la refrigeración (5°C) según el dilutor Tris-YH con 26.45 % y Tris-YH más PS 33.90% de espermatozoides obtenidas mediante la técnica de la desviación del conducto deferente en alpacas. Fumuso et al. (2018), reporto a la dilución después de 3 horas adicionando PS en un 50% más HT un valor de 47.9 %. Jimenes et al. (2016), reporto valores de 16,58 (10% PS) recuperados de epidídimos de alpacas suspendidos en diluyente de leche

descremada más la adición 10% de plasma seminal antes de congelar.

### **2.10.3 Porcentaje de Integridad de Membrana espermática:**

Fumuso et al, (2018), reporto a la colecta adicionando PS en un 50% más HT mediante la prueba de hinchazón hipo osmótica (HOS) y empleo la tinción CFDA / PI obteniendo 43.9 % de integridad de membrana y en el mismo trabajo se reportó  $41.4 \pm 15.3$  % de vitalidad colectados en 100% de PS. Montoya et al, (2017), suplemento con 20% de plasma seminal a los espermatozoides de cinco asnos obteniendo resultados de  $63.9 \pm 6.9\%$ . Estudios realizados por Roostaei y Sharafi, (2013), quien reporto 19.37% de integridad de membrana de espermatozoides recuperados de epidídimos de carneros mediante castración.

### **2.10.4 Integridad de acrosoma**

Kershaw-Young *et al.* (2011), que colecto espermatozoides de epidídimos suspendidos en 100% de plasma seminal homologo más la adición del 0.1% de BSA se reporto 76.6%. Fumuso et al., (2018), reporto a la colecta adicionando PS en un 50% más HT un valor de 86.2 % de integridad de Acrosoma. Carretero et al, (2015) obtuvo resultados de 67.2 % de espermatozoides vivos más muertos con acrosoma reaccionadas utilizando iono foro de calcio (A23187) a las 3 horas de incubación a 38°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 100 de humedad.

### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de Ejecución.

La investigación se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, localizada en el Distrito de Puno, Provincia de Puno, Departamento de Puno, a 3820 m de altitud. a una Latitud sur 15° 49' 34.5" y Longitud oeste de 70° 00' 43.5" en la Meseta del Collao con una temperatura de día promedio 15.3°C (Senamhi, 2018), temperatura en el laboratorio (17°C). La obtención del plasma seminal se realizó en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, ubicada en el distrito de Umachiri, provincia de Melgar, Región Puno.

#### 3.2 Animales

Se usaron dos alpacas machos donadores de espermatozoides de 5 y 6 años de edad y condiciones similares de manejo, con fertilidad comprobada a través de fertilización *in vitro*, localizadas en el área de Reproducción Animal de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia estas fueron intervenidos quirúrgicamente en el año 2015, la desviación quirúrgica de los conductos deferentes (DCD) fue realizado con la técnica descrita por (Pérez y Apaza, 2006). Los espermatozoides se colectaron por el método de la DCD dos veces por semana con un periodo de descanso de 2 y 3 días.

Se utilizaron 4 alpacas suris machos de 4 a 6 años de edad como donadores de plasma seminal con similares condiciones de manejo y que son frecuentemente usados en las campañas de empadre del CIP



Chuquibambilla. La colecta de semen se realizó en una sola vez mediante la técnica de vagina artificial.

### **3.3 Metodología:**

#### **3.3.1 Colecta de semen por vagina artificial**

Se aplicó la metodología descrita por (Morton *et al.*, 2008) con algunas modificaciones.

1. Se armó el maniquí con la vagina artificial, cubierta con la frazadilla eléctrica y se colocó en su respectivo lugar.
2. Se permitió el acceso del macho al maniquí (Figura N°1, anexo)
3. Una vez colectado el semen fue transportado al laboratorio para su procesamiento.

#### **3.3.2 Obtención de plasma seminal**

Se realizó siguiendo el protocolo planteado por (Kershaw-Young y Maxwell, 2011).

1. Después de la colección el semen fue centrifugado a 1000 x g por 30 minutos.
2. El plasma seminal se decantó y el pellet de los espermatozoides fue desechado.
3. El plasma seminal fue nuevamente centrifugado a 10000 x g por 30 minutos.
4. El plasma seminal se decantado y para asegurarse de que el plasma no contenga células espermáticas alguna, se tomó una muestra de 10 uL, fue colocada sobre una lámina porta-objetos y cubierta con un cubre objetos.

5. Se visualizó la muestra en un microscopio óptico a un aumento de 100X, terminada la evaluación el plasma fue almacenado en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.3 Preparación del dilutor

Se preparó un dilutor madre en base a Tris. (Cuadro N° 46, anexo)

1. Se esterilizo los materiales a usar durante la preparación.
2. Se trajo los productos que se necesitan Ácido cítrico, fructuosa y Tris.
3. Se colocó 50 mL de agua bidestilada en la probeta graduada y se cubrió con una bolsa estéril.
4. Se inició a pesar el Ácido cítrico (2.4g), seguido de la fructuosa (1g) y finalizando con el pesado de Tris (2.42g). Todos ellos se vertieron a la probeta graduada con agua bidestilada.
5. Se enrazo con agua bidestilada hasta la marca de 75 mL.
6. Se hizo disolver los componentes del Tris en un baño María húmedo acondicionado a  $80^{\circ}\text{C}$  (ebullición) durante 8 min y eliminar algunos crecimientos bacterianos como termófilos, mesófilos, psicotrofos psicrófilos, bacterias que son susceptibles a temperaturas menores de  $80^{\circ}\text{C}$ .
7. Se hizo enfriar a temperatura ambiente para adicionar el antibiótico Tilosina, Gentamicina y Tianfenicol en (0.1ml), se homogenizo.
8. Se procedió a envasar en frascos de Penicilina a 5ml.

### 3.3.4 Preparación del crioprotector

Se utilizó la yema de huevo (20%) y glicerol (5%) la dilución se realizó en dos pasos.

1. Se utilizó Tris en 4800  $\mu\text{L}$  más el 20% de yema de huevo 1200  $\mu\text{L}$ .
2. Para obtener la yema de huevo se preparó una bandeja y se colocó dos a tres láminas de papel toalla en el fondo.
3. Se desinfecto la cascara con alcohol empapado en papel toalla.
4. Se separó la yema de la clara del huevo con sumo cuidado.
5. Se colocó en la bandeja la yema en un extremo el papel toalla y se deslizo la yema sobre el papel toalla hasta que se desprenda la totalidad de la clara.
6. Posteriormente se hizo la obtención de la yema de huevo y se depositó en un tubo cónico de 15 mL
7. seguidamente paso a ser centrifugado en 3000 rpm por 15 min se pasó a echar a otro tubo cónico evitando el ingreso del pellet de la yema de huevo centrifugado.
8. Se separó en 2 tubos de ensayo (A) 1600  $\mu\text{L}$  y (B) 4400  $\mu\text{L}$  de yema de huevo.
9. Para preparar el dilutor de congelación tubo (B), se dejó al medio ambiente y espero la cantidad definitiva del semen a congelar para su posterior cálculo de la glicerina al 5%, homogenizar e igualar la temperatura a 5°C.

### 3.3.5 Previo a la colección de espermatozoide.

Previamente se preparó:

1. Se retiró un vial de plasma seminal de la congeladora para descongelarlo a temperatura ambiente del laboratorio a 17°C.
2. Posteriormente se pasó a rotular 2 tubos de ensayo (por día de trabajo) para dos tratamientos a realizarse por día de trabajo, con la siguiente descripción T (tris puro), P10 (10% de plasma seminal), P50 (50% de plasma seminal) y P100 (100% de plasma seminal).
3. Para preparar los tratamientos y testigo fue de la siguiente manera (Figura N°2, Anexo).
  - a) T (tris puro): 100uL de Tris más 0 uL de plasma seminal
  - b) P10 (10% de PS): 90 uL de Tris más 10 uL de plasma seminal
  - c) P50 (50% de PS): 50 uL de Tris más 50 uL de plasma seminal
  - d) P100 (100% de PS): 0 uL de Tris más 100 uL de plasma seminal
4. Se incubo en baño maria a 37°C, que previamente fueron homogenizados.
5. Se preparó el termo de colecta con agua a 37°C (baño maría) en el que se colocó el tubo de ensayo para trasladar los espermatozoides del conducto deferente al laboratorio en 400 uL de dilutor Tris, se incubo en el termo por al menos 15 minutos, las puntas de colecta de semen estuvieron a temperatura controlada (37°C).
6. En una bandeja se alisto, guantes descartables, torundas de algodón, agua destilada y vaselina con antibiótico.
7. Se ubicaron a los machos en sombra para realizar la colecta de los espermatozoides.

### 3.3.6 Obtención de espermatozoides

Se realizó según la metodología descrita por (Perez et al. 2014a) con algunas modificaciones. Brevemente se describe:

1. Se derribó al macho donador (uno en uno) en sombra evitando los rayos solares sobre el espermatozoide y se sujetó en posición decúbito lateral izquierdo, se realizó la higienización del área circundante a la fístula del conducto deferente con torundas de algodón embebidas en agua destilada y algodón seco para su secado.
2. Se realizó suaves masajes desde la cola del epidídimo en dirección caudo – craneal una vez que se visualizaba la gota de semen está era rápidamente aspirada con la ayuda de una micro pipeta de 10  $\mu$ L. Para aspirar los espermatozoides primero se aspiró el dilutor presionando hasta el fondo el botón de la micropipeta y se aspiró el Tris hasta el primer golpe, sin soltar se esperó a que salga la primera gota de espermatozoides, se acercó la punta de la micro pipeta y suavemente se aspiraron (Figura N°3, Anexo), luego está fue depositada en el tubo de ensayo colector que estaba ubicado en el baño maría, se enjuago la punta con el dilutor dos veces y se repitió el proceso de colecta en el siguiente macho hasta concluir con la colección de semen en intervalos de 2 veces por semana.
3. Se hizo la limpieza del área circundante a la fistula del conducto muy suavemente con algodón empapado en agua destilada y se secó con algodón y a continuación se cubrió con vaselina sólida de manera generosa sobre la fistula del conducto deferente.

4. Se liberó al macho y se aseguró de que cuente con alimento y agua.

### **3.3.7 Adición de espermatozoides a diferentes concentraciones de plasma seminal al momento de la colecta.**

1. Se realizó dos tratamientos por día, indistintamente. T (tris puro); P10 (10% de plasma seminal); P50 (50% de plasma seminal); P100 (100% de plasma seminal).
2. Inmediatamente a la llegada de los espermatozoides al laboratorio, se distribuyó a 200  $\mu$ L a los tubos de ensayo con los tratamientos que se prepararon con anterioridad y esperaban en el baño María a 37°C
3. Se evaluó la motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana e integridad de acrosoma.
4. Después de realizar la primera evaluación, rápidamente se agregó 800uL (tris más yema de huevo) a cada uno de los tubos de ensayo cuidadosamente por las paredes.
5. Esta primera parte del trabajo se realizó a temperatura ambiente del laboratorio 17°C.
6. Seguidamente se llevó a refrigeración, la curva de enfriamiento fue de -1°C por cada 3 minutos (Figura N°5, Anexo). Hasta llegar a los 5°C.
7. La temperatura se hizo descender con la ayuda de hielos de 1mL, 3mL y 5mL. (Figura N°4, Anexo).

### **3.3.8 Adición del diluyente en las muestras espermáticas antes de la congelación.**

1. Al obtener la temperatura final 5°C y se conoce el volumen final en los tubos con los tratamientos, el dilutor de congelamiento con glicerol al 5% ya se encuentra en el baño María de refrigeración a igual temperatura de 5°C, previamente homogenizado.
2. Se agregó a los tubos de ensayo en refrigeración por las paredes del vidrio. a cada tubo de ensayo en la misma cantidad del semen refrigerado (1:1).
3. Se evaluó la motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana e integridad de acrosoma.
4. Se dejó equilibrar por 1 hora.

### **3.3.9 Proceso de la congelación**

1. Previo al envasado de las muestras, las pajillas fueron rotuladas con lapiceros indelebles indicando la fecha y el grupo de tratamiento (T = testigo; T10= tratamiento 10%; T50= tratamiento 50%; T100= tratamiento 100%) y a su vez fue refrigerado al igual que los pliegues de papel toalla.
2. El empajillado se realizó haciendo el uso de una jeringa de tuberculina el pivote debía de coincidir con una manguera de latex y de la misma forma el extremo superior de la pajilla con la boquilla de la manguera de latex, luego se introdujo ligeramente el extremo inferior de la pajilla en el tubo de ensayo que contenía los espermatozoides diluidos y se succiono suavemente la dilución hacia la pajilla y se verifico en la jeringa que el embolo llegue hasta

los 0.25mL, se dejó un espacio de aire entre el tope de la pajilla y el semen aspirado (Figura N°6, Anexo)

3. Inmediatamente después se realizó el sellado con polivinilo de cloruro, luego se introdujo en agua con la finalidad de solidificar el Polivinilo de cloruro. Las pajillas selladas se introdujeron al baño María a 5°C hasta concluir el empajillado.
4. Después, las pajillas fueron secadas con papel toalla refrigerada y colocadas en posición horizontal a los vapores de nitrógeno (Figura N°7, Anexo), sobre la rejilla de congelación a 5 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido, donde se mantuvo por 7 min. Luego fueron sumergidos directamente en el nitrógeno líquido a -196°, hasta su evaluación.

#### **3.3.10 Adición de plasma seminal al momento de la descongelación.**

Para el descongelado se preparó los tubos de ensayo para cada tratamiento de la siguiente forma:

- a) T (tris puro): no se añadió plasma seminal al momento de la descongelación
  - b) TC10 (10% de plasma seminal): 25uL de plasma seminal
  - c) TC50 (50% de plasma seminal): 125uL de plasma seminal
  - d) TC100 (100% de plasma seminal): 250uL de plasma seminal
1. Se incubo en un baño María seco a 37°C (Figura N° 9, Anexo)
  2. Para la descongelación se extrajo la pajilla de 0.25mL congelada del termo criogénico de forma al azar (Figura N° 10, Anexo) con la ayuda de una pinza, una vez obtenida la pajilla se sumergió inmediatamente en baño María a una temperatura de 37°C por 30 s.



3. Pasado este tiempo se extrajo la pajilla del baño María, se secó y se procedió con el corte de los extremos de la pajilla (Figura N°11, Anexo)
4. Su contenido fue vertido en el tubo de ensayo previamente preparado y se realizó el análisis.
5. Fueron evaluados los siguientes parámetros (concentración, vitalidad, morfología, integridad de membrana e integridad de acrosoma).

### **3.3.11 Evaluación de las características espermáticas Microscópicas**

#### **3.3.11.1 Motilidad individual.**

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por (Srivastava y Pande, 2017) con algunas modificaciones:

1. En cada una de las repeticiones antes de tomar la muestra para evaluar la motilidad individual se homogenizo completamente la muestra de semen.
2. Se tomó una muestra de 10 uL de semen la cual fue colocada sobre una lámina porta objetos de vidrio limpios y libres de grasa, que fue previamente temperada a 37 ° C.
3. A continuación, fue inmediatamente cubierta con una lámina cubre- objetos (22x22 mm) también previamente temperada a similar temperatura que la porta objetos.
4. La lectura se realizó mediante el microscopio Leica a 40X provista de una platina térmica graduable y se usó el sistema de captura de imagen a computadora con la aplicación LAZ suite, tan pronto como sea posible para evitar una falsa lectura al momento de

evaluar. La evaluación fue determinada por observación subjetiva de las muestras.

5. Se contabilizo todos los espermatozoides con movimiento (Figura N° 12 y 13, Anexo).
6. Se evaluó al momento de la colecta, seguido por el diluyente (cuando se adiciono el glicerol) y en la descongelación. Se contó 200 espermatozoides en cada muestra (Young., 2011)
7. Los resultados se expresaron en porcentaje. (Ec. A.1)

**Ecuación. A. 1** *Motilidad individual.*

$$\% = \frac{\text{Numero de espermatozoides mótiles.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

**3.3.11.2 Vitalidad**

1. La preparación del colorante se realizó según lo descrito por Barth, (1989), (Cuadro N° 47, Anexo).
2. El procedimiento de tinción se realizó según lo descrito por Srivastava y Pande, (2017), con algunas modificaciones. Brevemente.
3. Se colocó una lámina porta-objetos sobre una platina térmica temperada a 37°C.
4. Sobre la lámina se colocó 10uL de colorante (Eosina y Nigrosina) y al costado muy cerca de ella se colocará 10uL de semen, ambas fueron mezcladas rápidamente, se dejó mezclado por 20 segundos.
5. Se realizó el frotis se extendió lentamente la mezcla sobre el portaobjetos de un extremo al otro, utilizando el borde de otro portaobjetos.
6. Finalmente se dejó secar sobre la platina térmica.

7. La evaluación de la vitalidad se realizó a una magnificación de 100X con aceite de inmersión, se contó un mínimo de 200 células, considerándose como vivas a todas aquellas células que no se hallen teñidas y como muertas a todas aquellas células que se encuentren teñidas de color rosado (Figura N°14 y Figura N°15, Anexo)
8. La vitalidad fue reportada como porcentaje de espermatozoides, el cálculo se realizó según la siguiente fórmula. (Ec. A.2)

**Ec. A. 2** *Determinación del porcentaje de vitalidad*

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

**3.3.11.3 Integridad de acrosoma:**

Durante la colecta: Se evaluó en microscopio de contraste de fase, usando la coloración descrita en vitalidad, de la siguiente manera

1. Se utilizó los espermatozoides evaluados en vitalidad.
2. Se observó en un microscopio a aumento 100X con aceite de inmersión y se contabilizó 200 espermatozoides.
3. La evaluación a los espermatozoides fue a vivos y muertos con acrosoma intacto, espermatozoides vivos y muertos con acrosoma dañado o reaccionado (Figura N° 18, 19, Anexo)
4. La proporción de espermatozoides con acrosoma intacto se obtuvo de la siguiente fórmula. (Ec. A3)

**Ec. A. 3** *Espermatozoides con acrosoma intacto*

$$\% = \frac{\text{Numero de espermatozoides con acrosoma intacto.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

#### 3.3.11.4 Evaluación de la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide (HOST)

La preparación de la solución hipo-osmótica (Cuadro N°48, Anexo). El procedimiento para la evaluación de la integridad de membrana se realizó según lo descrito por (Srivastava y Pande, 2017) con algunas modificaciones.

1. Se colocó 500 µl de la solución HOST un tubo de ensayo en baño María acondicionado (termo) a 37°C.
2. Se extrajo 50 µL de la muestra y se mezcló completamente y fue incubado la suspensión en baño de agua a 37°C por 45 minutos.
3. Se examinó la muestra a 40X, contando un mínimo de 200 espermatozoides (Figura N°16, 17 Anexo)
4. Los espermatozoides fueron clasificados como respuesta a la prueba de hipo osmosis (HOS) cuando presenten la cola enrollada.
5. El porcentaje de espermatozoides con reacción positiva se determinó según la siguiente fórmula (Ec A.4)

##### **Ec. A. 4** *Espermatozoides con reacción positiva a la prueba de HOS*

$$\text{Porcentaje de células positivas} = \frac{\text{Células vivas con cola enrollada}}{\text{Células contadas en total}} \times 100$$

#### 3.3.12 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el sistema de Análisis Estadístico (SAS v9.0). Los resultados obtenidos en datos cuantitativos se sometieron a medidas de tendencia central como el promedio para la

evaluación de motilidad, Vitalidad espermática, Integridad de Membrana e Integridad de Acrosoma.

Las repeticiones fueron determinadas en función al trabajo de Perez et al., (2014a) el número de animales Perez et al., (2014b) la finalidad del estudio fue analítico con la asignación de las variables de estudio del tipo experimental. Otros autores como (Fumuso et al., 2018) uso 6 llamas para la obtención de semen mediante electro eyaculación.

Para evaluarlas se convirtieron a valores angulares mediante la transformación Arco-seno. Y en todos los casos la normalidad de los datos se corrobora mediante la prueba de Shapiro – Wilk. El nivel de significancia se fijó en (0.05) para todo los análisis. El diseño estadístico empleado fue Completamente al Azar balanceado (DCA) con las siguientes variables:

- a) Variable independiente: Motilidad espermática, Vitalidad espermática, Integridad de membrana e Integridad de Acrosoma.
- b) Variable de pendiente: Colecta, Dilución y Descongelado.

Para la comparación de medias se utilizó el test de Tukey.

Modelo aditivo del Diseño Completamente al Azar (DCA):

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

$i$  = 1, 2, 3, 4 tratamientos

$j$  = 1, 2, 3 y 4 repeticiones

$Y_{ij}$  = Variable respuesta

$\mu$  = Media General

$t_i$  = Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental

## IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Evaluación a la colección

#### 4.1.1 Motilidad individual

Los resultados de motilidad individual se muestran en la Tabla 1, con ( $W=0.94$ ) de normalidad, en la que no se observó diferencia ( $p>0.05$ ) como consecuencia del uso de diferentes proporciones de plasma seminal que fue añadido al momento de la colecta.

**Tabla 1: Motilidad individual al momento de la colecta.**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
<b>T50</b>	4	56.07	60.54	51.79
<b>T100</b>	4	55.36	61.42	51.79
<b>T0</b>	4	53.66	53.33	49.24
<b>T10</b>	4	51.60	56.67	51.01

**Nota:** b,a/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p>0.05$ )

Existe similitud entre los tratamientos con diferentes proporciones de plasma seminal con respecto a la motilidad individual de los espermatozoides, se debería posiblemente a la acción progresiva del plasma seminal por ende una acción protectora tardía Hernández et al., (2007), indica que aumenta el porcentaje de motilidad en los espermatozoides cuando el plasma seminal secretado por las glándulas anexas entra en contacto con los espermatozoides, ejerciendo sobre ellos un efecto protector. En el presente trabajo los componentes del plasma seminal se encuentran diluidos, pero se puede observar una diferencia numérica entre los tratamientos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a los reportados por Morton et al., (2010), quienes encontraron un valor de  $52.7\pm 3.3\%$  de motilidad inicial de espermatozoides obtenidos de 11 epidídimos de alpacas y en el laboratorio fue resuspendido en un dilutor

que contenía lactosa, el experimento se llevó a cabo en la Universidad de Sydney-Australia. En tanto que, Fumuso et al. (2018), reportó  $26.8 \pm 8.9\%$  de motilidad total en su tratamiento con 50% de plasma seminal al momento de la colecta en espermatozoides de 6 llamas obtenidos mediante electroeyaculación e incubados con colagenasa al 0.1% para eliminar la viscosidad del plasma seminal y que posteriormente fueron resuspendidos con plasma seminal y HEPES-TALP (HT) y en el mismo trabajo se reportó 27.7% de motilidad total en los espermatozoides colectados en 100% de plasma seminal y HT.

#### 4.1.2 Vitalidad:

Los resultados de vitalidad en la Tabla 2, ( $W=0.99$ ) se puede precisar que no existe diferencia ( $p>0.05$ ) al uso del plasma seminal que fue añadido al momento de la colecta en diferentes concentraciones.

**Tabla 2: Vitalidad de espermatozoides al momento de la colecta**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
<b>T50</b>	4	57.27	60.01	53.02
<b>T100</b>	4	54.14	55.5	52.27
<b>T10</b>	4	53.61	58.17	50.43
<b>T0</b>	4	52.79	59.43	46.79

Nota: b,a/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p>0.05$ )

Existe similitud entre tratamientos para la variable vitalidad de los espermatozoides que previamente fueron añadidos con plasma seminal en diferentes proporciones al momento de la colecta, estos resultados podría ser debida a que el plasma seminal no es rápidamente absorbida por la superficie del espermatozoide y por ende sus componentes de recubrimiento de los espermatozoides no estarían actuando de inmediato, como si lo hacen cuando el espermatozoide es eyaculado juntamente con el plasma seminal (Barrios et al. 2000); por esta razón tanto las muestras

que recibieron plasma seminal como aquella que no recibió plasma seminal (testigo) tuvieron similares porcentajes de vitalidad espermática.

Nuestros resultados son inferiores con respecto a los obtenidos por Deza. (2004) quien reporto una vitalidad de 58.25% espermatozoides obtenidos del conducto deferente de alpaca quien evaluó al diluir en Tris más 20% de yema de huevo con respecto al presente trabajo es superior, posiblemente de deba al trabajo realizado en época reproductiva, mientras tanto Kershaw - Young y Maxwell. (2011) reporto una vitalidad espermática de 46.9% en la colecta después de la castración a 10 alpacas de 3 años de edad colectados de epidídimos que fueron picados con un bisturí y el tiempo de sedimentación fue de 30 min en 4 mL de PBS-BSA a 37°C y finalmente fueron centrifugados a 300rpm durante 5 min, los espermatozoides fueron resuspendidos en 100% plasma seminal al cual adiciono 0.1 % de Suero Fetal Bovino (BSA) en un baño maría a 37°C, cada 15 minutos se removía la mezcla para evitar la separación del plasma seminal con la fracción de BSA, este experimento fue realizado en la Facultad de Ciencias Veterinarias, de la Universidad de Sydney-Australia. En contraste con el presente trabajo en cuanto al tratamiento T100 supero al trabajo del autor en mención, obteniendo un valor de 54.14%, este resultado superior se debería al método de obtención de los espermatozoides que fue por la desviación del conducto deferente, en llamas Fumuso et al. (2018), reporto  $56.5 \pm \%$  de vitalidad espermática a la colecta adicionando plasma seminal en un 50% más HT, los espermatozoides fueron obtenidos mediante electro eyaculación con intervalos de 15 días y para la evaluación de vitalidad la técnica usada fue



de mancha CB y FITC-PNA / mancha PI y en el mismo trabajo reportó 55.4 % de vitalidad colectados en 100% de plasma seminal empleando la misma técnica.

#### 4.1.3 Integridad de Membrana:

Para integridad de membrana en la Tabla 3, ( $W=0.27$ ) de normalidad, no se observó diferencia ( $p>0.05$ ) a la acción del plasma seminal entre los tratamientos.

**Tabla 3: Integridad de membrana al momento de la colecta.**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
T100	4	58.28	57.21	53.02
T50	4	57.02	57.89	54.25
T10	4	56.44	59.91	54.5
T0	4	54.76	59.31	55.27

**Nota:** b,a/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p>0.05$ )

Los valores resultantes del presente trabajo durante la colecta en integridad de membrana son similares entre tratamiento, esto indica que el plasma seminal no se adhiere inmediatamente a la membrana espermática. Rodriguez-Martinez. (2003) indica que la integridad y funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide, es la evaluación de mayor importancia debido a que la membrana plasmática está relacionada con el metabolismo de la célula. Esto indicaría que los espermatozoides en contacto con las diferentes proporciones del plasma seminal no hacen uso de los sustratos del plasma seminal ya que estarían en un proceso de adecuación a la presencia del oxígeno.

Los resultados reportados en el presente trabajo son superiores comparando con los resultados de Fumuso et al. (2018), quien reporto 43.9 % de integridad de membrana en llamas obteniendo semen mediante electro eyaculación e incubadas en 1% de colagenasa y HT por

8 min a 37°C y posterior mente centrifugadas a 800rpm durante 10min para ser resuspendidos los espermatozoides en plasma seminal en un 50% más HT, la evaluación se realizó mediante la prueba de hinchazón hipo osmótica (HOS) y además empleo la tinción CFDA / PI obteniendo. y en el mismo trabajo se reportó 41.4 % de vitalidad colectados en 100% de PS, con los mismos procedimientos. Los resultados obtenidos por el autor en mención posiblemente sean inferiores con respecto al presente trabajo, por el uso de la colagenasa en 0.1%. En otras especies, Montoya et al. (2017), suplemento con 20% de plasma seminal a los espermatozoides de cinco asnos colectado por vagina artificial y separados del plasma seminal mediante centrifugación, para la evaluación de la integridad de membrana para semen fresco, se empleó la prueba de Hipo osmosis y los resultados fueron 63.9 % estos valores son superiores a nuestros resultados, seria principalmente por el factor especie.

#### 4.1.4 Integridad de Acrosoma:

En la Tabla 4 se observa los resultados para la integridad de acrosoma con ( $W=0.97$ ) de normalidad, no se precisó la diferencia ( $p>0.05$ ,) entre tratamientos al momento de la colecta.

**Tabla 4: Integridad de Acrosoma de espermatozoides al momento de la colecta**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
<b>T100</b>	4	72.65	75.31	70.51
<b>T50</b>	4	71.09	75.10	66.67
<b>T10</b>	4	70.33	73.49	67.56
<b>T0</b>	4	68.89	71.75	66.79

**Nota:** b,a/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p>0.05$ )

La similitud entre los tratamientos se daría por que el plasma seminal no tiene efectos adversos para la integridad de acrosoma cuando entra en contacto con el plasma seminal.

Comparando los resultados del presente trabajo Kershaw-Young et al. (2011) utilizó espermatozoides procedentes de epidídimos de alpacas suspendidos en 100% de plasma seminal homólogo más la adición del 0.1% de BSA y reportó 76.6% de integridad de acrosoma este resultado no difiere mucho con los resultados de 72.65% de integridad de acrosoma para el tratamiento 100% de plasma seminal, es posible que la adición del plasma seminal obtenido de la misma alpaca que se obtiene los espermatozoides no muestre diferencias con respecto al plasma seminal obtenido de diferentes alpacas y reconstituidas a espermatozoides procedentes de otras alpacas. Fumuso et al. (2018), reportó en llamas a la colecta adicionando PS en un 50% más H-TALP (HT) obteniendo un valor de 86.2 % de integridad de Acrosoma evaluada mediante la técnica de mancha Coomassie Blue (CB) y diacetato de mancha fluorescente con isotiocianato de fluoresceína - Aglutinina de hipogea de *Arachis* / yoduro de propidio FITC-PNA / PI, para el tratamiento 50% de PS del presente estudio con 71.09% de integridad de acrosoma es inferior, se debería a la técnica empleada para su evaluación, la tinción con (CB) que permite una evaluación más completa de los acrosomas de llamas y alpacas frente a una evaluación por contraste de fases. En tanto Morton *et al.* (2010), reportó una integridad acrosómica de 89.3% en espermatozoides de 11 epidídimos de alpacas machos castrados, colectados en PBS y resuspendidos en lactosa, los datos reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo, esto se debería al uso de la lactosa. El mismo autor en el mismo año reporta una integridad de acrosoma de 92.3% con la misma técnica, donde los

espermatozoides fueron diluidos con el dilutor comercial Biladyl® adicionando antioxidante comercial Equex STM®, los datos reportados por el autor son superiores en comparación al presente trabajo, este resultado se debería al uso del antioxidante comercial Equex STM®, Fumuso *et al.* (2014), reporto 91.6% de integridad de acrosoma en llamas, la obtención del semen se realizó por electro eyaculación y fueron incubadas con colagenasa al 0,1 % en medio H-TALP, que diluyeron en una proporción 4:1 con la enzima e incubaron durante 4 min a 37° C seguidamente se centrifugaron durante 10 min a 800 rpm y el pellet obtenido se resuspendió con H-TALP, Se fijaron con paraformaldeído al 4% en PBS. Se tiñeron con colorante Coomassie Blue al 0.22 %, estos valores reportados por el autor son mucho mayores en comparación al presente trabajo posiblemente al uso del colorante empleado para integridad de acrosoma ya que posee afinidad a las proteínas acrosomales superficiales.

#### 4.2 Evaluación a la dilución:

##### 4.2.1 Motilidad individual:

La Tabla 5, muestra la motilidad de los espermatozoides con ( $W=0.97$ ) de normalidad, al momento de la dilución son diferentes entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ) y testigo.

**Tabla 5: Motilidad individual de espermatozoides al momento de la dilución**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
T100	4	43.63 <sup>a</sup>	49.17	38.87
T50	4	41.83 <sup>a</sup>	48.75	36.52
T10	4	36.01 <sup>ba</sup>	38.50	33.89
T0	4	31.27 <sup>b</sup>	34.24	29.17

**Nota:** a./b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p \leq 0.05$ )

Se observa para el T0 en ausencia de plasma seminal y T10 en una concentración menor de plasma seminal la motilidad de los espermatozoides disminuye hasta 31.27 % y 36.01 % respectivamente, para llegar a la dilución que en este experimento demoro dos h, el efecto del plasma seminal se podría evidenciar para T100 Y T50 a mayor concentración de la adición del plasma seminal se dé un efecto positivo en cuanto a motilidad individual, posiblemente porque el medio que los rodea a los espermatozoides sea adecuada para su metabolismo conforme desciende adecuadamente la temperatura de refrigeración hasta el momento óptimo de la dilución (5°C), esto se contrastaría con los estudios realizados por Perez y et al., (2014b) quien indica que al diluir en Tris más YH los cambios de la presión osmótica en un periodo de refrigeración de las muestras espermáticas se reduce el metabolismo de los espermatozoides. En cuanto a la refrigeración Pursel et al. (1973) indica que la presencia del plasma seminal durante un tiempo de retención de pre congelación o refrigeración, que dura 2 a 7 h, permite a los espermatozoides a desarrollar resistencia al choque frío. La curva de enfriamiento del presente trabajo fue de -1°C en 3 min lo que permitió la adecuada disminución del metabolismo en presencia del plasma seminal y yema de huevo. El periodo de refrigeración deben ser lentas 0.5-1°C/min para una adecuada adaptación de la célula espermática con su consiguiente reducción del metabolismo (Hafez, 2002; Barbas, 2009).

Los resultados encontrados por Perez et al. (2014b) al término de la refrigeración que duro 6 horas controlada a los 5°C de refrigeración obtuvo una motilidad de 58,34 % en espermatozoides de alpacas

colectados del conducto deferente esta fue diluida en Tris más 20% de yema de huevo y suero de cría nacida de alpaca al 5% estos resultados con relación al presente trabajo es superior, esto se debería a la adición del suero de cría nacida de alpaca empleada (homologo) al 5%. Morton *et al.* (2010), indico un valor de motilidad de 46.30% a temperatura de 4°C colectadas de epidídimos obtenidos mediante castración y transportadas en PBS al laboratorio que fue resuspendido con lactosa, los datos reportados por los autor no son muy diferentes al presente trabajo posiblemente se debería a los componentes de la lactosa y PBS. Estudios realizados en otras especies, indican como a Montoya *et al.* (2017) reportó 92.2% de motilidad total diluido antes de la congelación y las muestras fueron suplementadas con plasma seminal de cinco asnos, la evaluación fue mediante el sistema SCA® versión 5.1, estos resultados son superiores al presente trabajo se debería al factor especie principalmente.

#### 4.2.2 Vitalidad:

La Tabla 6 muestran los resultados de vitalidad con ( $W=0.96$ ) de normalidad, indican que no hay diferencia entre los tratamientos ( $p>0.05$ ).

**Tabla 6: Vitalidad de espermatozoides al momento de la dilución**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
T100	4	41.62	44.88	38.86
T10	4	39.14	40.80	36.15
T50	4	38.10	45.21	33.83
T0	4	34.97	38.81	30.85

**Nota:** a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p>0.05$ )

No existe diferencia entre los tratamientos ya que disminuyeron en la misma proporción con respecto a los valores obtenidos en la colecta.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares a los reportados por Calderon, (2015), quien indico una vitalidad a la refrigeración (5°C) utilizando el dilutor Tris- yema de huevo con 26.45% de vitalidad espermática y Tris-yema de huevo más plasma seminal 33.90% de vitalidad espermática donde, adicione plasma seminal que fue obtenida de un toro de la raza Brown Swiss, el presente trabajo muestra resultados inferiores. Fumuso et al, (2018) reporto a la dilución después de 3 h adicionando plasma seminal en un 50% más H-TALP (HT) un valor de 47.9 % de vitalidad mediante la técnica de mancha fluorescente con isotiocianato de fluoresceína - Aglutinina de hipogea de Arachis / yoduro de propidio (FITC-PNA) / PI y en el mismo trabajo reportaron 29.1 % de vitalidad colectados y adecuados a 100% de plasma seminal usando la misma técnica, con respecto al presente reporte no se encontraron diferencias estadísticas para los tratamientos con 50% y 100% de plasma seminal, esto se debería a la técnica utilizada que fue con Eosina-Negrosina. No se encontró más reportes en esta variable de dilución.

#### **4.2.3 Integridad de Membrana al momento de la dilución**

En la Tabla 7 existe diferencia ( $p \leq 0.05$ ) en integridad de membrana al momento de la dilución, con ( $W=0.95$ ) de normalidad, después de llegar a los 5°C y adicionando el dilutor de congelación.

**Tabla 7: Integridad de membrana al momento de la dilución.**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
<b>T50</b>	4	48.19 <sup>a</sup>	49.01	47.72
<b>T100</b>	4	47.14 <sup>a</sup>	48.54	45.64
<b>T10</b>	4	45.32 <sup>ab</sup>	48.34	43.59
<b>T0</b>	4	42.80 <sup>b</sup>	46.55	39.73

**Nota:** b,a/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p \leq 0.05$ )

La diferencia entre los tratamientos posiblemente sea por la peroxidación lipídica en la superficie espermática regulada por el plasma seminal también podría ser debido al agotamiento de nutrientes, la acumulación de residuos y / o especies reactivas de oxígeno, Agarwal et al., (2014), señala que la peroxidación lipídica en las membranas de los espermatozoides, generada por ROS, puede resultar en una función alterada de los espermatozoides. La otra diferencia se haya podido dar por la capacidad biosintética limitada de los espermatozoides y por eso su funcionalidad estaría controlada por el medio externo que le rodea, Mann, (1975) indica que los espermatozoides carecen de muchas organelas pero poseen enzimas necesarias para realizar diversas reacciones bioquímicas. También es probable que la acción del glicerol haya influido en la reorganización de los fosfolípidos y las proteínas de la membrana plasmática, de este modo se haya visto afectado, pero los espermatozoides con tratamientos de plasma seminal resistieron mejor el shock frio, Brandon et al. (1999) en equinos indica que las proteínas del PS se absorben a la superficie del ESP y ejercen un efecto reparador en la membrana lesionada al someter al ESP a choque térmico por frio.

Los resultados del presente estudio son superiores obtenidos a los estudios realizados por Banda et al. (2010) quienes reportaron 24.3 % tras la dilución con tris para integridad de membrana, utilizando la técnica



de la Hipo Osmosis (HOS), los espermatozoides fueron colectados de epidídimos. En tanto Fumuso et al. (2018) reporto a la dilución después de 3 h adicionando PS en un 50% más HEPES TALP mediante la prueba de hinchazón hipo osmótica (HOS) y usó la tinción CFDA / PI obteniendo así 39.6 % de integridad de membrana y en el mismo trabajo se reportó 26.9 % de vitalidad colectados en 100% de PS, con respecto a los resultados obtenidos por el autor son superiores respecto al presente trabajo se debe principalmente a la técnica empleada para evaluar vitalidad en los espermatozoides.

#### 4.2.4 Integridad de Acrosoma:

Los resultados que muestra la Tabla 8, nos indica que si existe diferencia entre tratamientos ( $p \leq 0.05$ ), con ( $W=0.82$ ) de normalidad, al momento de la dilución.

**Tabla 8: Integridad de Acrosoma al momento de la dilución**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
T100	4	54.03 <sup>a</sup>	55.06	52.91
T50	4	50.77 <sup>ab</sup>	52.63	48.67
T10	4	47.64 <sup>ab</sup>	49.12	45.79
T0	4	44.80 <sup>b</sup>	55.64	38.78

**Nota:** a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p \leq 0.05$ )

La existencia la diferencia entre tratamientos se debería a la presencia de proteínas específicas del plasma seminal que entran en contacto con el acrosoma espermático para evitar la reacción del acrosoma en esta fase de dilución, informes recientes como de Caballero et al. (2004) Indicaron la presencia de proteínas de plasma seminal específicas en la región acrosomal de varias especies. Entre los componentes proteicos que se asocian a la membrana acrosomal serían las proteínas polipeptídicas que actúan recubriendo la membrana

espermática evitando la pérdida de fosfolípidos de la membrana celular (Amann et al., 1999; Souza et al., 2008).

En tanto estudios realizados en llamas Carretero et al. (2015) obtuvieron resultados de 67.2 % de espermatozoides con acrosomas reaccionadas y 32.8% de los espermatozoides conservaron su acrosoma, para su evaluación empleo ionoforo de calcio (A23187) a las 3 horas de incubación a 38°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad, la recolecciones de semen se llevó a cabo utilizando electro eyaculación y la evaluación se efectuó utilizando la técnica de tinción con Coomassie, el autor en mención evidencio la clara acción del calcio para la reacción acrosómica, en el presente trabajo los espermatozoides incubados con las diferentes proporciones de plasma seminal lograron mantener su acrosoma, En tanto en ovinos Leahy et al. (2010) reporto resultados de acrosoma intacto un valor de 21.3% el semen fue colectado por vagina artificial en temporada reproductiva y el plasma seminal fue almacenada a -20°C, agregaron PS con proteínas de peso molecular de 10KDa, antes de la congelación con el diluyente crioprotector basado en tris que contenía 15% de yema de huevo y glicerol 5% fue evaluada con tinción yoduro de propidio (PI), estos resultados son inferiores a los encontrados en el presente trabajo, se debe a la sensibilidad de los espermatozoides de los carneros a las de otras especies.

### **4.3 Evaluación a la descongelación**

#### **4.3.1 Motilidad individual:**

Los resultados de motilidad individual se muestran en la Tabla 9, sin embargo, no se observó diferencia ( $p > 0.05$ ) a la adición del plasma

seminal al momento de la descongelación, con ( $W=0.90$ ) de normalidad.

**Tabla 9: Motilidad individual al momento de la descongelación.**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
<b>T50</b>	2	28.96	31.25	26.67
<b>T10</b>	2	16.82	20.00	16.82
<b>T100</b>	2	14.40	18.18	10.00
<b>T0</b>	2	13.45	15.79	11.11

**Nota:** a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p>0.05$ )

La no diferencia entre tratamientos para la motilidad total posiblemente sea por la excesiva dilución de las muestras espermáticas durante la adición del plasma seminal después del descongelado según tratamiento antes de su evaluación (es importante destacar que en el presente trabajo no se evaluó la concentración espermática). Mann et al. (1964), ratifica que cuando la dilución es excesiva, esta conduce a una pérdida permanente de la motilidad, como también de la actividad metabólica, conocida como el "efecto de dilución". Otro aspecto importante podría ser al estrés oxidativo (EO) que sufrieron los espermatozoides o la fragilidad de algunos componentes del plasma seminal por efecto de la congelación y descongelación. Ren et al. (2001), Indican que al EO afecta la motilidad de los espermatozoides (ESPs) debido a la peroxidación lipídica, un alto nivel de las especies reactiva de oxígeno (ERO) inducen cambios en la motilidad de los ESPs debido a que influyen sobre los canales de calcio y al agotamiento de las reservas de Adenosin Trifosfato (ATP). En estudios realizados por Díaz et al. (2015) determinaron una cierta labilidad de los triglicéridos por el efecto de la congelación y descongelación en lo cual disminuyó de 44.12% en plasma seminal

fresco a 27.31% en plasma seminal al descongelado. Ergün et al. (2007) en estudios sobre lípidos demostró que el incremento de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y los triglicéridos estaban correlacionados con la disminución de las características de motilidad del espermatozoide.

En comparación con los resultados obtenidos por Jimenes et al. (2016), reportaron valores de 13,4 % (10% PS) al descongelado de espermatozoides recuperados de epidídimos de alpacas suspendidos en diluyente de leche descremada con una proporción del 10% de plasma seminal y se congelo, al descongelar se lavó mediante centrifugación a (600 RFC durante 8 segundos) y el sedimento se volvió a resuspender en PBS para hacer su evaluación de motilidad, con respecto al presente trabajo la adición de 10% de plasma seminal después del descongelado fue superior T10% con 16.82% de motilidad, es superior el resultado porque no se utilizó la centrifugadora ya que este debilita aún más a los espermatozoides. Estudios realizados en otras especies adicionando plasma seminal mencionamos a Montoya et al. (2017) quienes reportaron al descongelado en un 34.2%, las muestras fueron suplementadas con plasma seminal de cinco asnos colectado por vagina artificial, estos resultados son superiores al presente trabajo se debería al factor especie principalmente; en tanto en verracos Hernandez., (2013) reporto 26.88% de motilidad al descongelado e incubados con plasma seminal autologo (mismo semental de origen de espermatozoide y plasma seminal) a la evaluación para la estimación de la motilidad se basó en el vigor de las

ondas espermáticas, estos valores son altos en comparación con el presente trabajo, la cual se debería al factor especie y al uso de plasma seminal auto logo.

#### 4.3.2 Vitalidad:

Los resultados de motilidad individual se muestran en la Tabla 10, indican que no existe diferencia ( $p>0.05$ ) como consecuencia al uso de diferentes proporciones de plasma seminal que fue añadido al momento de la descongelación, con ( $W=0.87$ ).

**Tabla 10 Vitalidad de espermatozoides al momento de la descongelación**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
T50	2	29.63	32.12	27.14
T10	2	27.19	29.50	24.88
T0	2	25.38	28.36	22.39
T100	2	25.19	26.37	24.00

**Nota:** b,a/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p>0.05$ )

los resultados obtenidos indican que no existe diferencia entre tratamientos ni con respecto al testigo(T0), esto se debería al desbalance de los componentes del plasma seminal que ocurrió durante una alta dilución y por efecto de la criopreservación. según tratamiento y como consecuencia posiblemente se produjo la inactivación del espermatozoide. Maxwell et al. (1999) Verificaron el efecto de la excesiva dilución con citometria de flujo donde observo que disminuye la vitalidad espermática porque se producía un desbalance de las fuentes de energía, a consecuencia de que los solutos se encontraban en desbalance y el efecto inmediato para el espermatozoide es acortar su vida. Sin embargo Hernández et al. (2007) indicaron en sus estudios que existen proteínas específicas que ayuden a mejorar la vitalidad espermática al momento de la

descongelación con plasma seminal, con respecto al testigo (T0) posiblemente la yema de huevo colaboro a mantener la vitalidad ya que posee lipoproteínas de baja densidad (LDL). los (LDL) protegen al ESP del shock de temperatura, principalmente las lecitinas a través de fosfatidilcolina y ácidos grasos principalmente ácidos araquidónico y docosahexanoico (Kampschmidt y Mayer., 1953; Huopalahti et al., 2007).

En alpacas Jimenes et al. (2016) reportaron valores de 16,58 % en vitalidad al descongelado, los espermatozoides fueron recuperados de epididimos de alpacas suspendidos en diluyente de leche descremada más la adición 10% de plasma seminal antes de congelar y al descongelar se lavó mediante centrifugación a (600 RFC durante 8 segundos) y el sedimento resuspendió en PBS para hacer su evaluación de vitalidad. Realizando la crio preservación de espermatozoides epididimarios de equino los resultados obtenidos al momento de la descongelación en dilutor de lactosa – EDTA más PS (1:1) la vitalidad fue de 40.5% reportado por Molfino et al. (2015).

#### 4.3.3 Integridad de Membrana:

En la tabla 11 se observó la existencia de la diferencia ( $p \leq 0.05$ ) entre tratamientos por la adición de plasma seminal que fue añadido al momento de la descongelación. Con ( $W = 0.97$ ).

**Tabla 11 Integridad de membrana al momento de la descongelación**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
T50	2	43.74 <sup>a</sup>	44.09	43.39
T100	2	32.66 <sup>ab</sup>	35.82	29.50
T10	2	31.50 <sup>b</sup>	32.11	30.88
T0	2	27.67 <sup>b</sup>	29.95	25.39

**Nota:** a,b/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p \leq 0.05$ )

Los presentes resultados obtenidos en el estudio son diferentes entre tratamientos, se podría pensar que la dilución en altas concentraciones de plasma seminal como fue el caso para el tratamiento T100% produce un efecto perjudicial para la integridad de membrana a pesar de poseer en más proporción los agentes anti oxidantes que en concentraciones de 50% evita el daño oxidativo de las proteínas del plasma seminal durante el proceso de la crio conservación. Posiblemente exista una afinidad con el Plasma seminal y la yema de huevo, que en proporciones equilibradas protegería de forma adecuada la membrana espermática evitando la pérdida de fosfolípidos y de esta forma favorecer a la permeabilidad consecuentemente su viabilidad. Moussa et al. (2002), indicaron un mecanismo de crio protección de las membranas espermáticas por parte de la fracción lipoproteica de baja densidad de la yema de huevo ya que esta fracción posee gran afinidad por las proteínas del plasma seminal bovino; esta unión se produce de forma rápida, saturable, específica, estable y permanece durante el proceso de congelación y descongelación.

Estudios realizados por Roostaei y Sharafi. (2013) quienes reportaron 19.37% de integridad de membrana de espermatozoides recuperados de epidídimos de carneros, dividió en 50% de PS bruto + 50% de diluyente de tris e incubo a T° ambiente 22°C durante 15 min para su evaluación hizo uso de la técnica de la prueba de hinchazón hipo osmótica, con respecto al presente trabajo en inferior el resultado por lo que debería principalmente por efecto especie. Otros estudios

los resultados obtenidos por Molfino et al. (2015) en equinos tras la recuperación de los espermatozoides epididimarios al momento de la descongelación al dilutor de lactosa – EDTA más PS (1:1) para integridad de membrana fue de 45.5%. En tanto Montoya et al. (2017), suplemento con plasma seminal a los espermatozoides de cinco asnos colectado por vagina artificial que fue congelado y descongelado para la evaluación de la integridad de membrana para semen fresco, se evaluó mediante la prueba de Hipo osmosis y los resultados al descongelado fueron de 26.7 % este valor es inferior a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la cual sería por el factor especie. Hernandez. (2013) a la evaluación de espermatozoides mediante la prueba de Hipo osmosis en semen de verraco incubado después de la descongelación con PS autologo (mismo semental de origen de espermatozoide y PS) y homologo (diferente semental de origen de espermatozoide y PS) incubados a 37°C durante 60 min fue de 27.58 % y 25.25 % respectivamente observándose el efecto benéfico en la adición de PS homólogo de acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro trabajo es inferior esto se debería por el factor especie.

#### **4.3.4 Integridad de Acrosoma:**

Los resultados de integridad de acrosoma se muestran en la Tabla 12, se puede precisar que si se observó diferencia ( $p \leq 0.05$ ) a la adición de plasma seminal en diferentes concentraciones con ( $W=0.79$ ) de normalidad.



**Tabla 12: Integridad de Acrosoma al momento de la descongelación.**

Tratamiento	Nº de OBS	Media (%)	Máx. (%)	Min. (%)
<b>T50</b>	2	45.08 <sup>a</sup>	46.19	43.96
<b>T100</b>	2	44.59 <sup>a</sup>	48.79	40.38
<b>T10</b>	2	38.95 <sup>ab</sup>	40,27	37.63
<b>T0</b>	2	30.75 <sup>b</sup>	32.14	29.35

**Nota:** ab/ letras diferentes en la misma fila indica diferencia significativa. ( $p \leq 0.05$ )

En los resultados del presente trabajo existe diferencia entre los tratamientos se debería principalmente a la presencia del calcio presente en el plasma seminal en proporciones más altas para tratamiento (T100) ya que se adiciono en un 100% plasma seminal después de la descongelación causando a si una permeabilidad en la membrana acrosomal que permite la entrada de calcio con la consiguiente activación de la fosfolipasa A2 para promover la capacitación prematura. Birch et al. (2009), demostró que el proceso de capacitación espermática se da en presencia del calcio principalmente más que de la presencia de los agentes capacitantes. mientras que el tratamiento T10 y el testigo sufrieron una pre capacitación por el efecto de la crio preservación, por poseer una baja concentración de proteínas en la superficie del espermatozoide que no fueron suficientes para proteger del efecto frio. El PS en carneros puede revertir el estado de capacitación y reacción acrosomal prematura que ocurre a causa del proceso de crio preservación (Barrios et al., 2000; García et al., 2010). Los espermatozoides de las muestras del tratamiento (T50) mantuvieron la integridad acrosómica, siendo el mejor tratamiento para la evaluación de integridad de acrosoma, posiblemente el PS en concentraciones de 50% sea óptimo para evitar un proceso de exocitosis, uniéndose las proteínas del plasma seminal a la superficie del acrosoma y evitar la liberación del contenido acrosomal, No se encontraron reportes en esta variable a la fecha.

## V. CONCLUSIONES

- a) El efecto de la adición del plasma seminal al momento de la colección de espermatozoides no afecta en los parámetros evaluados sobre la motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana e integridad de acrosoma.
- b) El efecto del plasma seminal previamente adicionado a los espermatozoides del conducto deferente, al momento de la dilución, ejerce efectos manteniendo la motilidad, mantiene la integridad de membrana e integridad de acrosoma. Mientras que sobre la vitalidad espermática hubo efecto de disminución.
- c) A la descongelación con la adición del plasma seminal mantuvo la integridad de membrana y acrosoma. Mientras que en la motilidad y vitalidad se observó una disminución

## VI. RECOMENDACIONES

- a) Se recomienda la adición de plasma seminal para el procesamiento de los espermatozoides colectados del conducto deferente.
- b) La evaluación de los parámetros se debería estudiarlas mediante evaluaciones supra vitales.
- c) Replicar este estudio en otras especies como llama y también en camélidos silvestres.

## VII. REFERENCIAS

- Agarwal, A. Virk, G. Ong, C. Du Plessis, S. S. (2014). Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, Vol. 32, pp. 1-17.
- Aisén, E.G. Álvarez, H.L. Venturino, A. G. J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, Vol. 53, pp.1053-1061.
- Amann, R.P. Hammerstedt, R.H. Shabanowitz, R.B. (1999). la exposición de espermatozoides humanos, jabalíes o toros a un péptido sintético aumenta la unión a un sustrato de membrana de huevo. *J Androl*, Vol.20, pp 34–41.
- Axe, R.L. Dally, B.A. Didion, R.W. Lenz, C.C. Love, D.D. Hafez, B. Bellini, M. (2000a). *Semen evaluation. Reproduction in farm animals*. 7ma Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp218–236.
- Axe, R. Dally, M. Didion, B. Lenz, R. Love, C. Varner, D. Hafez, B.B.M. (2000b). *Reproduction in farm animals*. 7ma ed. Baltimore: Lippincott Williams y Wilkins. P.509.
- Banda, R.J. Evangelista, V.S. Ruiz, G.L. Sandoval, R. Rodríguez, LL.C. Valdivia, C.M. y Santiani, A.A. (2010). Efecto de dilutores an base a Tris, Tes y Leche decremada en la criopreservacion de espermatozoides obtenidos de epididimos de alpacas. *Rev Inv Vet Peru*, 21(2), 145–153.
- Barbas, J.P. Mascarenhas, R.D. (2009). *Cryopreservation of domestic animal sperm cells*. Vol: 231, PP:259-275.
- Barrios, B. Fernández, J.M. Muiño, B.T. Cebrian. P. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl*; VOL. 26, PP. 539-549.
- Barrios, B. Pérez, PR. Gallego, M. Tato, A. Osada, J. Muiño, BT. Cebrian, P. (2000). Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane. *Biology of Reproduction*; Vol: 63, pp1531–1537.
- Barth, A.D. Oko, R.J. (1989). *Preparation of semen for morphological examination*. In: *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press; pp 8–18.
- Birch, A. Labouriau, R. Christensen, P. (2009). Dynamics of the induced acrosome reaction in boar sperm evaluated by flow cytometry. *Anim Reprod; Sci*; 115: 124-136
- Brandon, C.I. Heussner, G.L. Caudle, A.B. Fayer-Hosken, R.A. (1999). Two-dimensional polyacrylamide electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology*; vol: 52, pp: 863-873.
- Bravo, P.W. Skidmore, J.A. Zhao, X.X. (2000). Reproductive aspects and Artificial insemination of alpaca. *Theriogenology*; 47, 619–626.

- Bravo, P.W. Alarcon, V. Baca, L. Cuba, Y. Ordoñez, C. Salinas, J. Tito, F. (2013). Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Animal Reproduction Science*; 136(3), 157–163.
- Bravo, P.W. Flores, D. Garnica, J. Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpaca. *Theriogenology*; 47:619-626.
- Bravo, W. (1998). Avances en la fisiología reproductiva del macho llama y alpaca. Puno, Perú. *XXI Reunión Científica Anual APPA*, Facultad de MVZ - UNA.
- Bravo, W. (2002). The reproductive process of south Americana camelids. *Male reproduction*.pp 49-64.
- Caballero, I. Vázquez, JM. Gil, MA. Calvete, JJ. Roca, J. Sanz, L. Parrilla, I. García, EM. Rodríguez-Martínez, H. Martínez, EA. (2004). The seminalplasma PSP-I / PSP-II modulates the capacity of sperm-adhesin. Boarspermatozoa for homologous homologs of oocytes in vitro? *J Androl*; 25, 1004-1012.
- Calderón, A.D.W. (2015). Efecto de la Adición del Plasma Seminal de Toro (Bos Taurus) Sobre la Viabilidad de los Espermatozoides Criopreservados Colectados de los Conductos deferentes en Alpacas (Vicugna Pacos). *Tesis*. Universidad Nacional del Altiplano-FMVZ-Puno.
- Casaretto, C. Martínez, SM. Giuliano, S. Rubin de celis, E. Gambarotta, M. Carretero, MI. (2012). Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia*; 44, pp 335-341.
- Córdova, A. Ruiz, CG. Córdova, JÁ. Córdova, MS. Guerra, JE. Rodríguez, BE. (2009). Oxidative stress and antioxidants in the spermatic conservation. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3 (1), PP. 01-38.
- Curry, M. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev. Reprod*, Vol.5, PP. 46–52.
- de Graaf, S. Rickard, J. Pini, T. Maddison, J. Druart, XL. (2014). Emerging Roles of Seminal Plasma in Sperm Function. 9th Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology. *Newcastle: Association for Applied Animal Andrology*; 93–101.
- Delhon, G. and Von-Lawzewitsch, I. (1987). Reproduction in the llama (Lama glama), a South American Camelid. I. Spermatogenesis and organization of the Intertubular space of the mature testis. *Acta Anat*. 129: 59-66.
- Delhon, G. and Von-Lawzewitsch, I. (1983). Cytological study of guanaco gonads (Lama guanicoe) male, in prepubertal, sexually mature and senile stages. *Veterinary Scientific Review. Revista Cientificas Veterinarias Fac. Buenos Aires*. Argentina.
- Deza, H. (2004). Conservacion de espermatozoides obstenidos a traves del conducto deferente en alpacas (Lama ácos) y Llama (Lama glama) y su posterior viabilidad. *Tesis FMVZ - UNA*.
- Diaz, Fontdevilla, M. Bustos, Obregon, E. (1993). Cholestrol and polyunsaturated acid enriched diet: Effects on kinetics of the acrosome reaction in rabbit

spermatozoa. *Mol Reprod.* 35: 176-180

- Díaz, V. Díaz, H. Espinoza, J. Huanca, WL. Bernardo, LT. y Jose, RG. (2015). Características Bioquímicas del Plasma Seminal Fresco y Congelado/Descongelado de Alpaca (vicugna pacos). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*; vol.26 (1) pp.43-48.
- Dragilva, EE. Rubinstein, S. Breitbart, H. (1999). Intracellular Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, ATPasa regulates calcium influx and acrosomale exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biol Reprod.* 61: 1226
- Echegaray, A. (2003). ¿Para cuándo el semen de porcino congelado?. *Venezuela Porcina*, vol: 17(48), PP 3–5.
- Ergün, A. Köse, SK. Aydos, K. Ata, A. AND A. A. (2007). Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones. *Arch Androl* 53:, pp 21-23.
- Fahy, G. (1986). The relevance of cryoprotectant 'toxicity' to cryobiology. vol.23, 1–13.
- Fernandez-Santos, MR. Martienz-pastor, F. Garcia-Macías, V. Estesó, MC. Soler, AJ. De paz P. Anel, LG. (2007). Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 67:738-753.
- Fernández Baca, S. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. *Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura y La Alimentación (FAO)*.
- Fernando Raymundo, T., Wilfredo Huanca, L., Teodosio Huanca, M., Sandra Huerta, O. y Aída Cordero, R. (2006). Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*; 17(2), 125–130.
- Fowler, Murray, E. and Miller (2008). *Camelids are not ruminants. En Zoo and Wild Animal Medicine. Saunders.* St. Louis. Missouri. 6th Edition, pp 467-495
- Fuentes, C. (1990). *Concentración de los Principales Componentes Químicos del Plasma Seminal de la Llama. F.M.V.Z Universidad Nacional del Altiplano Puno.*
- Fumuso, F.G. Giménez, M.L. Neild, D.M. Giuliano, S.M. Chaves, M.G. Carretero, M.I. (2014). Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova* 1, 50–53.
- Fumuso, F.G. Giuliano, S.M. Chaves, D.M. Neild, M.H. Miragaya, M.C. Gambarotta Y Carretero, M.I. (2018) Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Animal Reproduction Science* Vol: 192; pp99-106

- García, JC. Domínguez, JC. Peña, FJ. Alegre, B. González, R. Castro, MJ. Habing, GG. (2010). Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: effects on sperm quality and fertility. *Anim Reprod Sci*, Vol. 119, 160–165.
- Garner, DL. y Hafez, ES. (2000). *Reproduccion y ensiminacion artificial en animales*. Mexico: Editorial Interamericana McGraw Hill.
- Garner, DL. Thomas, CA. Gravance, CG. Marshall, CE. Dejarnette, JM. (2001). Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. *Theriogenology*; Vol. 56, PP. 31-40.
- Garnica, J. Achata, R. and Bravo, W. (1993). Fiscal and biechemical characteristic of alpaca semen. *Animal Reproduction Sciense*.
- Garnica, J. (1995). Concentraciones de Acidos y Fructuosa en plasma seminal de la Alpaca. *Pequeño Rumin Res*; Vol:18, PP:95-98.
- Giuliano, S. Chavez, M. Director, A. Tresorres, V. and Miragaya, M. (2005). Inseminacion artificial con semen refrigerado en llamas. Resueltados preliminares. *IV Congreso Mundial de Camelidos Sudamericanos*.
- Giuliano, S. Director, A. Gambarotta, M. Trasorras, V. Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (Lamaglama). *Anim Reprod Sci*, 104, 359–369.
- Hafes, E. (1989). *Reproduccion e inseminacion artificial* (V Edicion). Mexico: Editorial Interamericana - Mc Graw - Hil.
- Hafez, E. (2000). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*, (Sexta Edic). México: Editorial Interamericana - Mc Graw - Hil.
- Hafez, E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. México: 6ta edición. Editorial Interamericana - Mc Graw - Hil
- Hernandez, A. (2013). Viabilidad y función espermática de semen descongelado de porcino adicionado con plasma seminal homólogo. *ResearchGate*, (July).
- Hernández, M. Roca, J. Calvete, J. Sanz, L. Muiño-Blanco, T. Cebrián-Pérez, J. Vázquez, J. (2007). Cryosurvival and in vitro fertilizing capacity postthaw is improved when spermatozoa are frozen in the presence of seminal plasma from good freezer boars. *J. Androl*, Vol. 28, PP. 689-697.
- Hidalgo Ordoñez, CO. Tamargo, MC. Diaz Monforte, C. (2005). Análisis del Semen Bovino. *Tecnología Agroalimentaria*; 2:39-43.
- Holt, WV. and North, RD. (1994). Effects of temperatura and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 51, pp 414-424.
- Holt, W. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, Vol: 53, pp.47-58.
- Hoskins, D. and Casillas, E. (1973). *Function of cyclic nucleotides in mammalian spermatozoa*. En: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. V, Male Reproductive System. R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.).

- Washington D.C., American Physiological Society, 453–460.
- Hu, JH. Li, QW. Zan, LS. Jiang, ZL. JH. Wang, LQ. Jia, YH. (2010). *The cryoprotective effect of low-density lipoproteins en extenders on bull spermatozoa following freezing-tawing. Anim Reprod Sci*; 117:11-17. doi: 10.1016/j.anireprosi.2009.04.001.
- Huanca, T. Apaza, N. Sapana, R. (2007). Defectos congénitos y hereditarios visibles en alpacas de dos zonas representativas de la región puno, *Sitio Argentino de Producción Animal*; pp1–7.
- Huopalahti, R. López-Fandiño, R. Anton, M. Schade, R. (2007). Bioactive egg compounds. Berlín, Alemania, Springer. 298 p.
- Instituto Nacional de Estadística y Informatica (INEI). (2012) IV Censo Nacional Agropecuario, Perú.
- James, PS. Wolfe, CA. Maquie, A. Ladha, A. Prentice, A. Jones, R. (1999) Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved. *Hum Reprod* 14: 1827 - 32.
- Jeyendran, RS. Vander-Ven, HH. Parez-Pelaez, M. Crabo, BG. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, 70, 219–228.
- Jimenez, J. Román, B. Zurita, R. Ugarelli, A. Santiani, A. Evangelista, S. (2016) The effect of seminal plasma concentrations on the oxidative damage in epididymal thawed alpaca spermatozoa. preliminary assay, *vi peruvian Congress Animal Reproduction*, vol:28; p:82
- Kadwell, MM. Fernández, M. Stanley, HF. Baldi, R. Wheeler, JC. Rosadio, RB. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and alpaca. *Proceedings of the Royal Society of London B*; 268, 2575–2584.
- Kampschmidt, RF. Mayer, DT. H.H. (1953). Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the residence and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci*, 36:733-742.
- Kershaw-Young, CM. and Maxwell, WM.(2012). Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.4), PP:369–375.
- Kershaw-Young, CM. and Maxwell, WM. (2011). The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*; 76(7), PP:1197–1206.
- Kershaw-Young, CM. Stuart, C. Evans, G. and Maxwell, WM. (2013). The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Animal Reproduction Science*; 138(3–4), PP:261–267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosi.2013.02.005>
- Larson, JL. Miller, DJ. (1999) Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev*, Vol 52(4):445-449.
- Leahy, T. Marti, J.I. Evans, G. Maxwell, W.M.C. (2010) Variación estacional del efecto protector del plasma seminal en espermatozoides de carnero

- congelados y descongelados. *Animal Reproduction Science*. Vol 119. Pp 147-153
- Lubos, H. (1983). *Bases Biológicas De La Reproducción Bovina*. Editorial Diana. México, D.F.,
- Manafi, M. (2011). *Artificial insemination in farm animals*. CBA Publishers & Distributors Pvt. Ltd., P. 312.
- Mann, T. and Lutwak-Mann, C. (1981). *Malé Reproductive Function and Semen*. Berlín: Springer-Verlag, pp 495.
- Mann, T. (1975). En: *Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Biochemistry of semen*. Vol. V, Male Reproductive System. R.O. Greep y E.B. Astwood (eds.). Washington, DC, American Physiological Society.
- Mann, T. (1964). *of Semen and of the Male Reproductive Tract. The Biochemistry*. London: Methuen and Co; pp 493.
- Maxwell, WM. and Johnson, LA. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: The influence of seminal plasma. *Theriogenology*; Vol:52(8), 1353–1362. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00222-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00222-8)
- Maxwell, WM. de Graff, SP, El-Hajj, Ghaoui, RE. (2007). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*; Vol. 64, PP. 13-38.
- Maxwell, WM. Evans, G. Mortimer, ST. Gillan, L. Gellatly, ES. M.C. (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Develop*; 11(2):123-6.
- Medeiros, CM. Forell, F. Oliveira, AT. R.J. (2002). Estado actual de la criopreservación de esperma: por qué no es mejor. *Theriogenology*, vol: 57, 327–344.
- Mendoza, C. (2000). Evaluacion de cuatro dilutores para la conservacion de semen en alpacas. *Tesis FMVZ - UNA*.
- Molfino, HMG. Rodríguez, C. Oropeza, A. Wong, Y. Sen, Llanos, J. y Figueroa, HG. (2015). Uso de Plasma Seminal en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Equinos. *Rev Inv Vet Peru*, 26(2), 351–356.
- Montovani, R. Rota, A. Falomo, M.E. Bailoni, L. VL. (2002). Comparison between glycerol and ethyleneglycol for criopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standrt analyses and with hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev*; Vol. 42, 217–226.
- Montoya, J.D. Rojanob, B. Restrepo, G. (2017). *Suplementación con plasma seminal y relación de sus componentes con la calidad de semen congelado-descongelado de asnos ( Equus asinus )*. *Revista Mexiana de iencias Pecuarias*; (83):233–242.
- Moore, Al. Squires, EL. and Graham, JK. (2005). Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 63(9), 2372–



2381. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.032>

- Morton, K. Vaughan, J. and Maxwell, WM. (2008). Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. *Rural Industries Research and Development Corporation-Australian Government*; Vol: 8, p:205.
- Morton, KG. Evans, W. and Maxwell, WM. (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.
- Moussa, M. Martinet, V. Trimeche, A. Tainturier, DAM. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-tawed bull semen. *Anim Reprod Sci*, 57:1695-1706.
- Muiño, Blanco, T. Pérez-Pé, R. Cebrián, PJ. (2008). Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction in Domestic Animals*; 43, 18-31.doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01228.x
- Núñez, ME. Genovese, P. Cordero, A. Picabea, N. Cardenas, O. Huanca, W. Bielli, A. (2007). Desarrollo heterogéneo , alternante y altamente ordenado en los túbulos seminíferos de la alpaca adulta ( *Vicugna pacos* ): Resultados preliminares. Sitio Argentino de Produccion Animal; pp 1–4.
- Pacheco, JI. Pérez, GM. calle, L. and García, W. (2009). Efecto del lugar y la hora de inseminación artificial sobre la fertilidad en alpacas (*Vicugna pacos*).. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*; Vol. X(n8), pp: 1-5.
- Parichhua, E. (2001). Evaluacion del Semen Sin la Secrecion de la Glandulas anexas en alpaca (lama pacos). Puno: Tesis FMVZ - UNA.
- Pérez, G. Zevallos, J. y Quintano, J. (2004). Sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente en tres dilutores. *Resúmenes Del XVII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Tacna Perú*.
- Pérez, G. (1997). Avances en la Inseminación artificial en Camélidos. La Técnica Completa, II Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos, Córdoba Argentina, 97–107.
- Perez, M.G. Zevallos, J. y Perez, U.H. (2014a). Recuperación de espermatozoides de alpaca del conducto deferente durante la época reproductiva. *Spermova*; 4(2), 139–144.
- Perez, M. G., Quintano, J. y Perez, U. H. (2014b). Sobrevivencia Espermatoca En Refrigeracion a 5°C Recuerados del Conducto Deferente de Alpaca en Tres Dilutores con dos Protectores de Membrana. *Spermova*; 4(2), 153–158.
- Pérez, MG. y Apaza, EDH. (2006). Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos. Allpaqa, *Revista de Investigación Del IIPC*, Vol. 11 Nro 01. pp 17-23, Puno-Perú.
- Pinto, J. Chris, E. Martín, EC. and CVMD. (2010). South American Camelids: Classification, Origen and Characteristics. *Revista Complutense de Ciencias*

- Veterinarias*, 4(1), 23-36.  
<http://www.ucm.es/BUCM/revistasBUC/portal/modulos.php?name=Revistas2&id=RCCV&col=1>
- Purdy, P. (2006). Una revisión sobre la criopreservación de esperma de cabra. *Small Rum Res*; Vol: 6, pp 215-225.
- Pursel, VG. Johnson, LA. and Schulman, L. (1973). Efecto de la dilución, el plasma seminal y el período de incubación en la susceptibilidad al choque frío de los espermatozoides de los verracos. *J Anim Sci*; Vol:37: pp 528-531.
- Quintano, J. (2002). Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpacas (lama pacos) colectado del conducto deferente con el uso de tres dilutores. *Tesis FMVZ – UNA –Puno*. Peru.
- Raggi, L. (2005). Situación actual de los camélidos Sudamericanos en Chile. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. TCP/RLA/2914. Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura y La Alimentación (FAO).
- Ratto, MH. Huanca, W. Singh, J. and Adams, GP. (2005). Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reproductive Biology and Endocrinology*; vol:3, pp452–457. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-29>
- Ren, D. Navarro, B. Perez, G. Jackson, AC. Hsu, S. Shi, Q. Tilly. JCD. (2001). A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. *Nature*; Vol. 413, 603–609.
- Rios, M. (1989). Presencia de Factores Inductores de la Ovulación (FIO) en el semen de la Alpaca y Toro. *Tesis*; F.M.V. Universidad Mayor de San Marcos.
- Rivera, EPM. (2000). Uso de la yema de huevo y glicerina en la sobrevivencia de los espermatozoides en el semen de alpaca. *VX Congreso Nac. de Ciencias Veterinarias. Cusco-Perú*. 14 (Abstract).
- Rodríguez-Martínez H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reprod Dom Anim*; 38: 312-318.
- Roostaei-A Li Mehr, M. and Sharafi, F. (2013) The effect of seminal plasma on the quality of coated ram frozen-thawed spermatozoa; *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, Vol. 14, No. 4, Pages 305-312
- Sanocka, D. and Kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells Reproductive. *Biology and Endocrinology*; 2, 12–18.
- Senamhi. (2018). Servicio Nacional de Meteorología e Hidrografía, Puno – Peru. Revista.
- Salder, T.W. (2010) Embriología medica. Edi 11; Cap 2, Barcelona España. pp15-16
- Souza, C.E.A. Moura, A.A. Monaco, E. Killian, G.J. (2008) Patrones de unión de proteínas plasmáticas seminales bovinas A1/A2, 30 kDa y osteopontina en

espermatozoides eyaculados antes y después de la incubación con líquido oviductal ítimo y ampular. *Anim Reprod Sci*, Vol.105, pp72–89.

- Srivastava, N. and Pande, M. (2017). Protocols in Semen Biology (Comparing Assays). *Springer Nature Singapore Pte Ltd*. 288.
- Stanley, HF. Kadwell, M. Wheeler, J. (1994). Molecular evolution of the family Camelidae: a mitochondrial DNA study. *Proc R Soc Lond. B*; 256:1-6.
- Töpfer-Petersen, E. Ekhlasi, Hundrieser, M. Tsoлова, M. Leeb, T. Kirchhoff, CMP. (2005). Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrologia* 37, pp 202-204.
- Troedsson, MHT. Desvousges, A. Alghamdi, AS. Dahms, B. Dow, CA. Hayna, J. Valesco, R. Collahan, PT. Macpherson, ML. Pozor, M. BW. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, Vol. 89, PP.171–186.
- Vaughan, J. GD. And H.D. (2003). Artificial insemination in alpacas (Lama pacos). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation; N° 03/104, Kingston, Australia.
- Vivanco, W. (2006). Tecnologías reproductivas y su relación con el mejoramiento genético en camelidos sudamericanos. Puno: I Simposium Internacional de Camelidos Sudamericanos.
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their postthawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7, pp 871-891.
- Wheeler, J. (2006). Capítulo 3: Historia Natural de la Vicuña. En: Investigación, conservación y manejo de las vicuñas – Proyecto MACS. Vila, B. (ed). Proyecto MACS-Argentina-INCO-Unión Europea. Buenos Aires, 208 pp.
- White, I. (1980). Secretion of the male reproductive tract and seminal plasma. *En: Reproduction in Farm Animals*. 4th ed. E.S.E. Hafez (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger.
- Young, MK. (2011). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl*; 64, 13–38.

## ANEXOS

### Materiales de laboratorio utilizados

- Termos de colecta
- Termómetro ambiental
- Tubos de ensayo de 5 mL de capacidad
- Micropipeta de 10  $\mu$ L y 100  $\mu$ L
- Puntas para micropipeta de 10  $\mu$ L y 100  $\mu$ L
- Tubos cónicos de 15 mL
- Gradillas para tubos de 15 mL
- Jeringas de 10 mL, 5 mL, 3 mL y 1 mL
- Torundas de algodón
- Papel toalla
- Vasos de precipitación de 100 mL.
- Probetas 50 mL.
- Termómetro de agua (tipo reloj).
- Pajillas de 0.25 mL.
- Caja portaobjetos
- Caja cubreobjetos
- Rack para porta objetos
- Bandeja de plástico
- Papel platino
- Rejilla de congelación.
- Caja de tecnopor (poliestireno expandido)
- Baño maria acondicionado
- Maniquí.
- Vagina artificial.
- Funda de látex.
- Plástico cónico.
- Frazadilla eléctrica.
- Ligas.
- Bomba de aire.

### 3.4 Equipo de laboratorio.

- Microscopio óptico Leica (modelo ICC50 con sistema de captura de imagen a computadora con aplicación LAZ suite - Leica Microsystems GmbH, Alemania).
- Centrifugadora (modelo C856E Con capacidad de 6X10mL, N°10907011, marca UNICO, USA)
- Balanza Digital (modelo ABS 220-4 con capacidad de 220g, marca KERN, N° WB1010573, Alemania)

- Refrigeradora.
- Balón criogénico.
- Baño Maria.
- Camara de flujo laminar

**3.5 Reactivos**

- Dilutor Tris
- Vaselina sólida
- Plasma seminal
- Yema de huevo
- Glicerol
- Solución hipo-osmótica
- Colorante Giemsa
- colorante de eosina 5%
- colorante de nigrosina 10%
- Alcohol 96°
- Nitrogeno liquido
- Agua bidestilada
- Alcohol Polivinilico

**Cuadro N° 1 Componentes bioquímicos del semen de Alpaca y llama.**

Componentes	Llama adulta	Alpaca de 3 años	Alpaca de 6 años	Distancia
Cloruro (mEq/L)	402 +- 10	348 +- 32	404 +- 34	263-491
Calcio (mg /dL)	-	18 +- 1	18 +- 3	13-31
Fosforo Inorganico (mg/dl)	10 +- 2	12 +- 2	8 +- 0.4	7-17
Glucosa (mg /dL)	6+- 0.3	7+- 0.4	5+- 0.3	4-8
Fructosa (mg /dL)	4 +- 2	-	6 +- 0.1	3-7
Lipidos (mg /dL)	106 +- 5	86 +- 10	95 +- 10	51-115
Fosfolipidos (mg /dL)	-	29 +- 1	29 +- 1	27-31
Nitrogeno Total (mg /dL)	623 +- 23	548 +- 50	647 +- 32	398-697
Proteína Total (g/dL)	4 +- 0.1	3 +- 0.3	4+- 0.2	3-4
Albumina (g/dL)	-	2 +- 0.3	2 +- 0.2	1-3
Globulinas (g/dL)	-	1 +- 0.1	2 +- 0.2	1-3

**Nota.** (g/dl) gramos por decilitro; (mEq/L) miliequivalente por litro; (mg/dl) miligramos por decilitro

**Fuente:** Fuentes, (1990)

**Cuadro N° 2 Espermiograma de Alpaca –Tris + 20% Yema de Huevo (T0)**

FECHA	Rep	COLECTA				DILUCION				N° de pajillas	DESCONGELADO				
		Mot total	Vit	Int Mem	Int Acr	Mot tota	Vit	Int Mem	Int Acr		Pajillas Des.	Mot total	Vit	Int Mem	Int Acr
10/04/2018	R1	52.80	59.43	53.30	69.04	29.17	30.85	39.73	44.76	6.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
18/04/2018	R2	51.01	46.79	53.02	66.79	30.42	38.81	42.24	38.78	7.00	1.00	11.11	28.36	29.95	
27/04/2018	R3	56.67	52.04	55.50	71.75	34.24	34.47	42.67	55.64	7.00	1.00	15.79	22.39	25.39	
04/05/2018	R4	54.17	52.91	57.21	67.97	31.25	35.75	46.55	40.00	7.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<b>Promedio</b>		<b>53.66</b>	<b>52.79</b>	<b>54.76</b>	<b>68.89</b>	<b>31.27</b>	<b>34.97</b>	<b>42.80</b>	<b>44.79</b>	<b>27.00</b>		<b>13.45</b>	<b>25.37</b>	<b>27.67</b>	<b>30.75</b>

**Cuadro N° 3 Espermiograma de Alpaca –Tris + 20% Yema de Huevo + 10% de Plasma Seminal (T10)**

FECHA	Rep	COLECTA				DILUCION				N° de pajillas	Pajillas Des.	DESCONGELADO			
		Mot total	Vit	Int Mem	Int Acr	Mot tota	Vit	Int Mem	Int Acr			Mot total	Vit	Int Mem	Int Acr
10/04/2018	R1	49.24	50.43	54.25	70.91	34.33	40.48	44.81	45.79	7.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
18/04/2018	R2	51.55	52.43	57.89	73.49	37.33	40.80	43.59	48.09	6.00	1.00	20.00	24.88	30.88	
01/05/2018	R3	52.29	58.17	56.94	67.56	33.89	39.13	44.55	49.12	6.00	1.00	13.64	29.50	32.11	
08/05/2018	R4	53.33	53.39	56.68	69.36	38.50	36.15	48.34	47.57	7.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<b>Promedio</b>		<b>51.60</b>	<b>53.61</b>	<b>56.44</b>	<b>70.33</b>	<b>36.01</b>	<b>39.14</b>	<b>45.32</b>	<b>47.64</b>	<b>26.00</b>		<b>16.82</b>	<b>27.19</b>	<b>31.49</b>	

**Cuadro N° 4 Espermiograma de Alpaca – Tris + 20% Yema de Huevo + 50% Plasma seminal (T50)**

FECHA	Rep	COLECTA				DILUCION				N° de pajillas	Pajillas Des.	DESCONGELADO			
		Mot total	Vit	Int Mem	Int Acr	Mot tota	Vit	Int Mem	Int Acr			Mot total	Vit	Int Mem	Int Acr
06/04/2018	R1	61.42	59.82	55.73	75.10	48.75	37.26	47.72	50.93	6.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
13/04/2018	R2	53.33	53.02	55.27	66.67	41.83	33.83	47.73	48.67	7.00	1.00	31.25	32.12	44.09	
01/05/2018	R3	51.79	56.13	57.77	72.22	36.52	36.10	48.29	52.63	6.00	1.00	26.67	27.14	43.39	
04/05/2018	R4	57.74	60.10	59.31	70.36	40.21	45.21	49.01	50.83	6.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<b>Promedio</b>		<b>56.07</b>	<b>57.27</b>	<b>57.02</b>	<b>71.09</b>	<b>41.83</b>	<b>38.10</b>	<b>48.19</b>	<b>50.77</b>	<b>25.00</b>		<b>28.96</b>	<b>29.63</b>	<b>43.74</b>	

**Cuadro N° 5 Espermiograma de Alpaca – Tris + 20% de Yema de Huevo + 100% Plasma seminal (T100)**

FECHA	Rep	COLECTA				DILUCION				N° de pajillas	Pajillas Des.	DESCONGELADO			
		Mot total	Vit	Int Mem	Int Acr	Mot tota	Vit	Int Mem	Int Acr			Mot total	Vit	Int Mem	Int Acr
06/04/2018	R1	52.41	53.73	59.50	70.51	40.65	38.86	46.12	55.06	7.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
13/04/2018	R2	51.39	52.27	59.19	71.26	38.87	42.74	48.54	52.91	7.00	1.00	10.00	24.00	35.82	
27/04/2018	R3	60.54	55.50	54.50	75.31	49.17	44.88	45.64	53.18	6.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
08/05/2018	R4	57.08	55.05	59.91	73.53	45.83	40.00	48.26	54.95	6.00	1.00	18.18	26.37	29.50	
<b>Promedio</b>		<b>55.35</b>	<b>54.14</b>	<b>58.28</b>	<b>72.65</b>	<b>43.63</b>	<b>41.62</b>	<b>47.14</b>	<b>54.03</b>	<b>26.00</b>		<b>14.09</b>	<b>25.18</b>	<b>32.66</b>	

**Cuadro N° 6 Conversión de los Valores Porcentuales a Valores Angulares para motilidad Individual (SAS)**

OBS	TRATAMIENTO	REP	VALORES PORCENTUALES			VALORES ANGULARES		
			COLEC	DILU	DESCON	COLEC 1	DILU 2	DESCON 3
1	T0	R1	52.80	29.17	.	46.6051	32.6899	.
2	T0	R2	51.01	30.42	11.11	45.5787	33.4730	19.4702
3	T0	R3	56.67	34.24	15.79	48.8331	35.8136	23.4136
4	T0	R4	54.17	31.25	.	47.3920	33.9878	.
5	T10	R1	49.24	34.33	.	44.5645	35.8679	.
6	T10	R2	51.55	37.33	20.00	45.8882	37.6606	26.5651
7	T10	R3	52.29	33.89	13.64	46.3125	35.6020	21.6739
8	T10	R4	53.33	38.50	.	46.9094	38.3515	.
9	T50	R1	61.42	48.75	.	51.6014	44.2837	.
10	T50	R2	53.33	41.83	31.25	46.9094	40.2979	33.9878
11	T50	R3	51.79	36.52	26.67	46.0258	37.1798	31.0931
12	T50	R4	57.74	40.21	.	49.4526	39.3543	.
13	T100	R1	52.41	40.65	.	46.3814	39.6111	.
14	T100	R2	51.39	38.87	10.00	45.7965	38.5691	18.4349
15	T100	R3	60.54	49.17	.	51.0846	44.5244	.
16	T100	R4	57.08	45.83	18.18	49.0702	42.6080	25.2381

**Cuadro N° 7 Conversión de valores porcentuales a valores angulares para vitalidad (SAS)**

OBS	TRATAMIENTO	REP	VALORES PORCENTUALES			VALORES ANGULARES		
			COLEC	DILU	DESCON	COLEC 1	DILU 2	DESCON 3
1	T0	R1	59.43	30.85	.	50.4355	33.7402	.
2	T0	R2	46.79	38.81	28.36	43.1595	38.5338	32.1773
3	T0	R3	52.04	34.47	22.39	46.1692	35.9523	28.2410
4	T0	R4	52.91	35.75	.	46.6682	36.7206	.
5	T10	R1	50.43	40.48	.	45.2464	39.5119	.
6	T10	R2	52.43	40.80	24.88	46.3928	39.6986	29.9205
7	T10	R3	58.17	39.13	29.50	49.7021	38.7218	32.8976
8	T10	R4	53.39	36.15	.	46.9438	36.9594	.
9	T50	R1	59.82	37.26	.	50.6633	37.6191	.
10	T50	R2	53.02	33.83	32.12	46.7314	35.5657	34.5236
11	T50	R3	56.13	36.10	27.14	48.5211	36.9296	31.3967
12	T50	R4	60.10	45.21	.	50.8270	42.2513	.

13	T100	R1	53.73	38.86	.	47.1391	38.5632	.
14	T100	R2	52.27	42.74	24.00	46.3011	40.8256	29.3339
15	T100	R3	55.50	44.88	.	48.1577	42.0613	.
16	T100	R4	55.05	40.00	26.37	47.8984	39.2315	30.8984

**Cuadro N° 8 Conversión de valores porcentuales a Valores Angulares para Integridad de Membrana (SAS)**

OBS	TRATAMIENTO	REP	VALORES PORCENTUALES			VALORES ANGULARES		
			COLEC	DILU	DESCON	COLEC 1	DILU 2	DESCON 3
1	T0	R1	53.30	39.73	.	46.8921	39.0735	.
2	T0	R2	53.02	42.24	29.95	46.7314	40.5358	33.1796
3	T0	R3	55.50	42.67	25.39	48.1577	40.7850	30.2574
4	T0	R4	57.21	46.55	.	49.1455	43.0217	.
5	T10	R1	54.25	44.81	.	47.4380	42.0210	.
6	T10	R2	57.89	43.59	30.88	49.5396	41.3172	33.7588
7	T10	R3	56.94	44.55	32.11	48.9892	41.8712	34.5174
8	T10	R4	56.68	48.34	.	48.8388	44.0487	.
9	T50	R1	55.73	47.72	.	48.2903	43.6932	.
10	T50	R2	55.27	47.73	44.09	48.0251	43.6989	41.6059
11	T50	R3	57.77	48.29	43.39	49.4700	44.0201	41.2016
12	T50	R4	59.31	49.01	.	50.3656	44.4327	.
13	T100	R1	59.50	46.12	.	50.4764	42.7747	.
14	T100	R2	59.19	48.54	35.82	50.2956	44.1634	36.7624
15	T100	R3	54.50	45.64	.	47.5818	42.4987	.
16	T100	R4	59.91	48.26	29.50	50.7159	44.0029	32.8976

**Cuadro N° 9 Conversión de valores porcentuales a valores angulares para Integridad de acrosoma (SAS)**

OBS	TRATAMIENTO	REP	VALORES PORCENTUALES			VALORES ANGULARES		
			COLEC	DILU	DESCON	COLEC 1	DILU 2	DESCON 3
1	T0	R1	69.04	44.76	.	56.1916	41.9922	.
2	T0	R2	66.79	38.78	32.14	54.8106	38.5162	34.5358
3	T0	R3	71.75	55.64	29.35	57.8926	48.2384	32.8033
4	T0	R4	67.97	40.00	.	55.5317	39.2315	.
5	T10	R1	70.91	45.79	.	57.3605	42.5850	.
6	T10	R2	73.49	48.09	40.27	59.0107	43.9054	39.3893
7	T10	R3	67.56	49.12	37.63	55.2804	44.4958	37.8381
8	T10	R4	69.36	47.57	.	56.3902	43.6072	.
9	T50	R1	75.10	50.93	.	60.0662	45.5329	.
10	T50	R2	66.67	48.67	43.96	54.7376	44.2379	41.5309
11	T50	R3	72.22	52.63	46.19	58.1925	46.5076	42.8149
12	T50	R4	70.36	50.83	.	57.0145	45.4756	.
13	T100	R1	70.51	55.06	.	57.1087	47.9041	.
14	T100	R2	71.26	52.91	48.79	57.5817	46.6682	44.3067
15	T100	R3	75.31	53.18	.	60.2055	46.8232	.
16	T100	R4	73.53	54.95	40.38	59.0366	47.8408	39.4536

**VARIABLE: MOTILIDAD INDIVIDUAL**

**Cuadro N° 10 ANVA de la variable dependiente colectado para motilidad individual (SAS)**

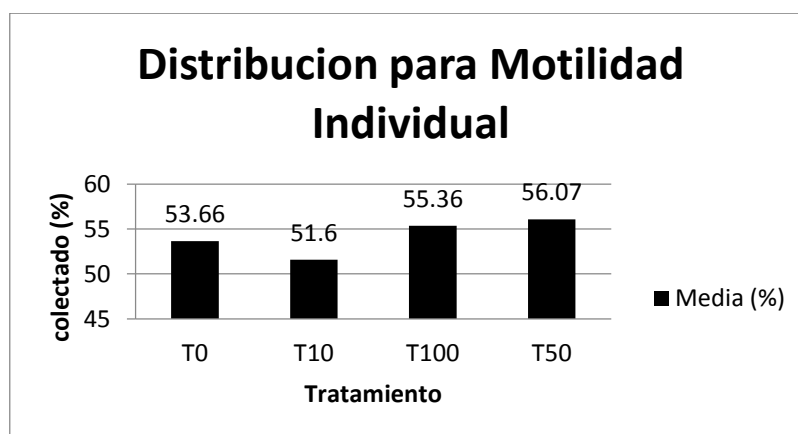
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	15.81534057	5.27178019	1.38	0.2967
Erro	12	45.90512834	3.82542736		
Total corregido	15	61.72046891			

**Cuadro N° 11 Prueba de rango estudentizado de Tukey (HSD) para colectado en motilidad individual**

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	48.497	4	T50
A	48.083	4	T100
A	47.102	4	T0
A	45.919	4	T10

**Cuadro N° 12 Test de normalidad para colectado en motilidad individual**

Test	estadística	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.943055	Pr < W 0.3881



**Cuadro N° 13 ANVA de la variable dependiente en dilución para motilidad individual (SAS)**

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	134.2497798	44.7499266	9.01	0.0021
Erro	12	59.6279780	4.9689982		
Total corregido	15	193.8777578			

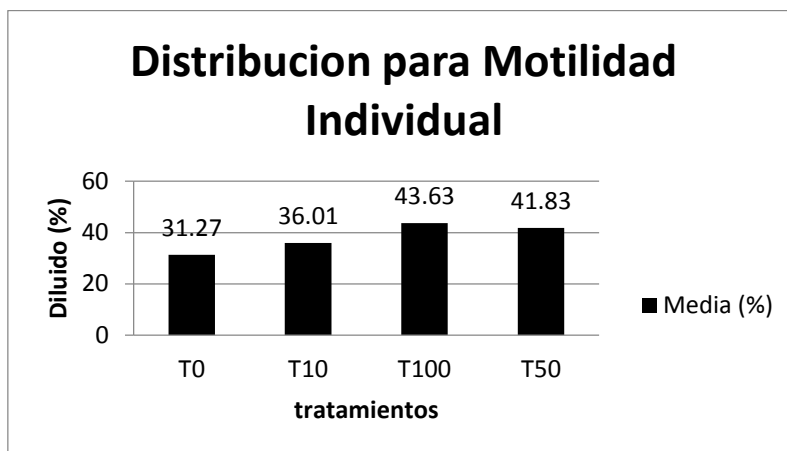
**Cuadro N° 14 Prueba de rango estudentizado de Tukey (HSD) para diluido en motilidad individual**

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	41.328	4	T100
A	40.279	4	T50
B A	36.870	4	T10
B	33.991	4	T0



Cuadro N° 15 Tabla A. 1 Test de normalidad para diluido en motilidad individual.

Test	estadística	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.968373	Pr < W 0.8116



Cuadro N° 16 ANVA de la variable dependiente en descongelación para motilidad individual (SAS)

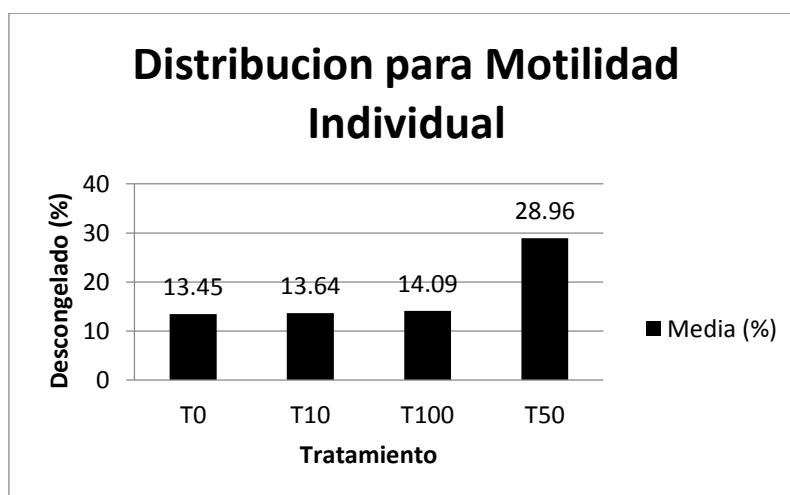
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	160.6012863	53.5337621	4.55	0.0887
Erro	4	47.0678313	11.7669578		
Total corregido	7	207.6691175			

Cuadro N° 17 Comparación múltiple de Tukey para descongelado en motilidad individual

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	32.540	2	T50
A	24.119	2	T10
A	21.837	2	T100
A	21.442	2	T0

Cuadro N° 18 Test de normalidad para descongelado en motilidad individual

Test	estadística	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.902457	Pr < W 0.3040



**VARIABLE: VITALIDAD**

**Cuadro N° 19 ANVA de la variable dependiente colectado para vitalidad (SAS)**

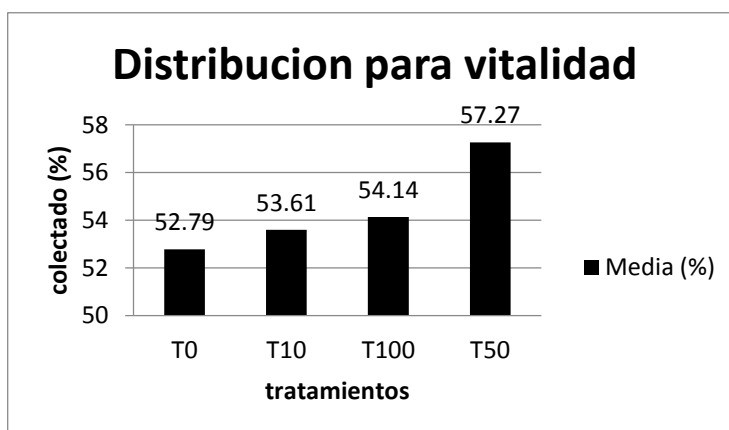
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	15.28920080	5.09640027	1.20	0.3510
Erro	12	50.90425766	4.24202147		
Total corregido	15	66.19345846			

**Cuadro N° 20 Comparación múltiple de Tukey para colectado en Vitalidad (SAS)**

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	49.186	4	T50
A	47.374	4	T100
A	47.071	4	T10
A	46.608	4	T0

**Cuadro N° 21 Test de normalidad para colectado en vitalidad**

Test	estdistica	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.985624	Pr < W 0.9929



**Cuadro N° 22 ANVA de la variable dependiente Dilución para vitalidad (SAS)**

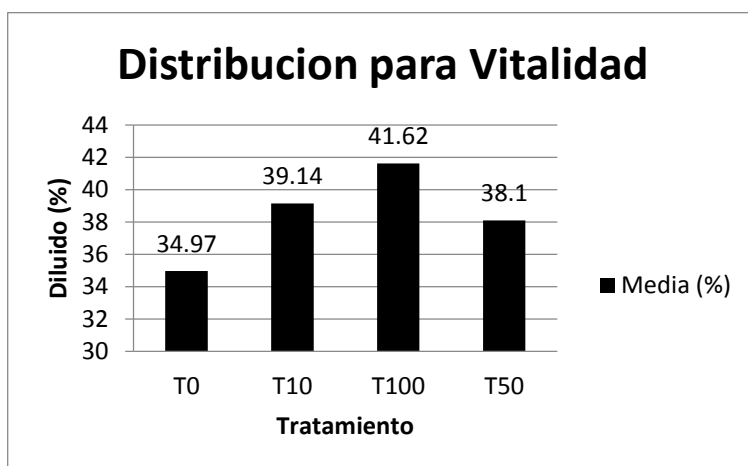
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	31.91112137	10.63704046	2.59	0.1011
Erro	12	49.23539430	4.10294953		
Total corregido	15	81.14651568			

**Cuadro N° 23 Comparación múltiple de Tukey para Dilución en Vitalidad (SAS)**

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	40.170	4	T100
A	38.723	4	T10
A	38.091	4	T50
A	36.237	4	T0

**Cuadro N° 24 Test de normalidad para dilución en vitalidad**

Test	estdistica	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.962656	Pr < W 0.7102



Cuadro N° 25 ANVA de la variable dependiente Descongelado para vitalidad (SAS)

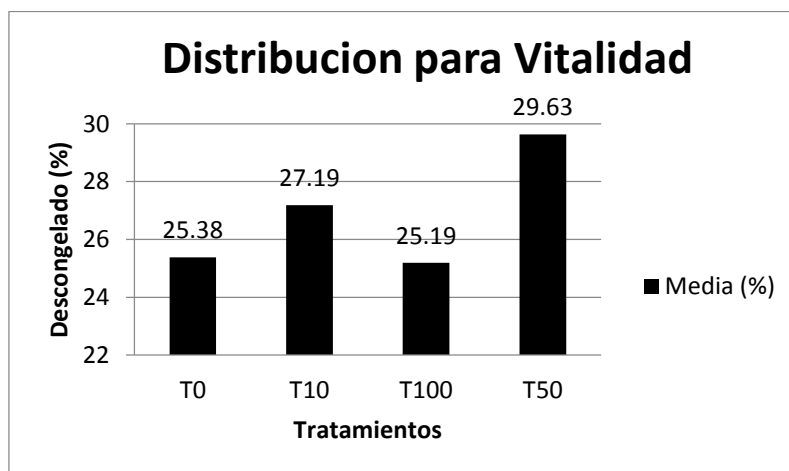
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	10.59115671	3.53038557	0.77	0.5670
Erro	4	18.29123938	4.57280985		
Total corregido	7	28.88239610			

Cuadro N° 26 Comparación múltiple de Tukey para Descongelado en Vitalidad (SAS)

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	32.960	2	T50
A	31.409	2	T10
A	30.209	2	T0
A	30.116	2	T100

Cuadro N° 27 Test de normalidad para descongelación en vitalidad

Test	estadística	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.866201	Pr < W 0.1383



**VARIABLE: INTEGRIDAD DE MEMBRANA**

**Cuadro N° 28 ANVA de la variable dependiente colecta para integridad de membrana (SAS)**

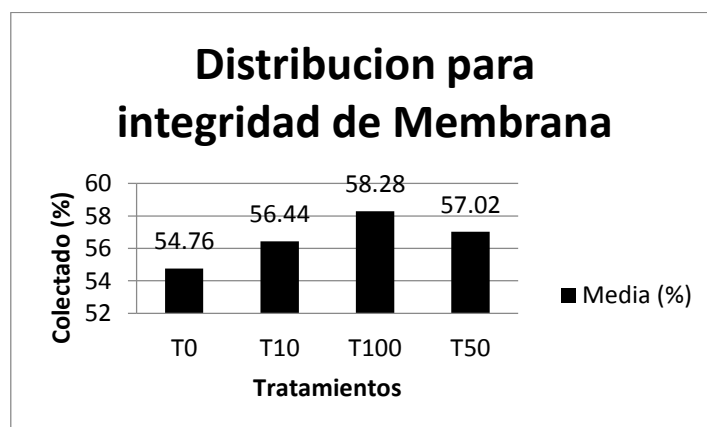
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	8.57238135	2.85746045	2.11	0.1528
Erro	12	16.27829024	1.35652419		
Total corregido	15	24.85067160			

**Cuadro N° 29 Comparación múltiple de Tukey para colecta para integridad de membrana (SAS)**

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	49.7674	4	T100
A	49.0377	4	T50
A	48.7014	4	T10
A	47.7317	4	T0

**Cuadro N° 30 Test de normalidad para colecta en integridad de membrana**

Test	estadística	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.932455	Pr < W 0.2666



**Cuadro N° 31 ANVA de la variable dependiente dilución para integridad de membrana (SAS)**

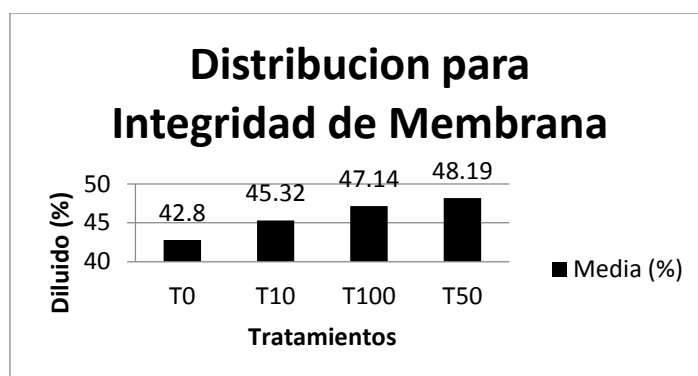
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	22.23333097	7.41111032	6.02	0.0096
Erro	12	14.76930686	1.23077557		
Total corregido	15	37.00263783			

**Cuadro N° 32 Comparación múltiple de Tukey para dilución para integridad de membrana (SAS)**

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	43.9612	4	T50
A	43.3599	4	T100
B A	42.3145	4	T10
B	40.8540	4	T0

Cuadro N° 33 Test de normalidad para dilución en integridad de membrana

Test	estdistica	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.945374	Pr < W 0.4201



Cuadro N° 34 ANVA de la variable dependiente descongelación para integridad de membrana (SAS)

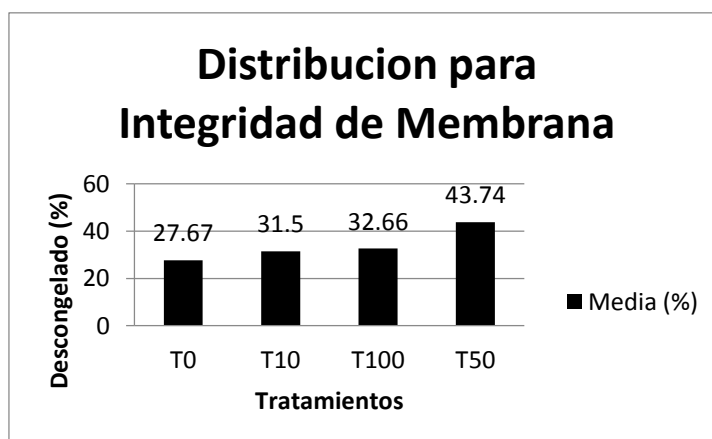
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	102.9113857	34.3037952	11.33	0.0200
Erro	4	12.1078016	3.0269504		
Total corregido	7	115.0191873			

Cuadro N° 35 Comparación múltiple de Tukey para descongelación para integridad de membrana (SAS)

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	41.404	2	T50
B A	34.830	2	T100
B	34.138	2	T10
B	31.719	2	T0

Cuadro N° 36 Test de normalidad para descongelacion en integridad de membrana

Test	estdistica	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.965153	Pr < W 0.8575



**VARIABLE: INTEGRIDAD DE ACROSOMA**

**Cuadro N° 37 ANVA de la variable dependiente Colecta para integridad de acrosoma (SAS)**

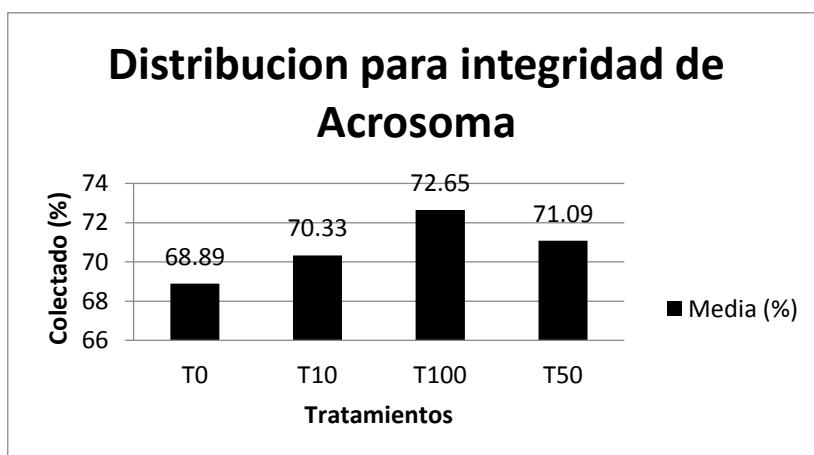
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	11.78598168	3.92866056	1.40	0.2900
Erro	12	33.61455829	2.80121319		
Total corregido	15	45.40053997			

**Cuadro N° 38 Comparación múltiple de Tukey para colecta para integridad de acrosoma (SAS)**

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	58.483	4	T100
A	57.503	4	T50
A	57.010	4	T10
A	56.107	4	T0

**Cuadro N° 39 Test de normalidad para colecta en integridad de acrosoma**

Test	estdistica	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.972571	Pr < W 0.8783



**Cuadro N° 40 ANVA de la variable dependiente Dilución para integridad de acrosoma (SAS)**

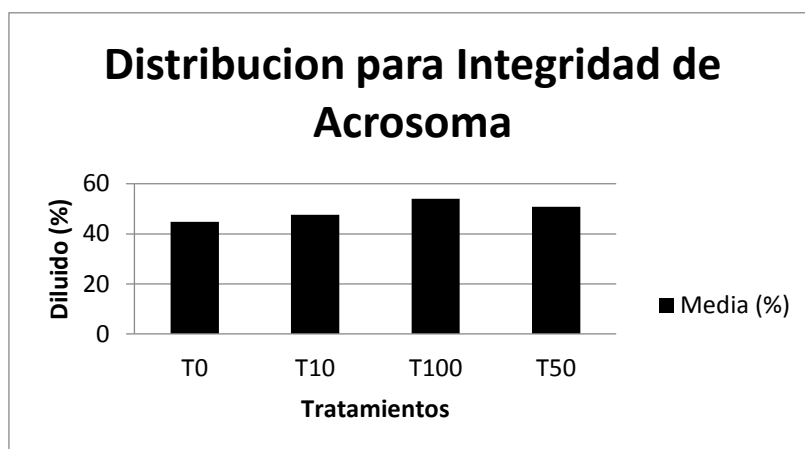
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	62.9449007	20.9816336	3.90	0.0370
Erro	12	64.5134391	5.3761199		
Total corregido	15	127.4583398			

**Cuadro N° 41 Comparación múltiple de Tukey para Dilución en integridad de acrosoma (SAS)**

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	47.309	4	T100
B A	45.438	4	T50
B A	43.648	4	T10
B	41.995	4	T0

Cuadro N° 42 Test de normalidad para dilución en integridad de Acrosoma

Test	estdistica	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.818768	Pr < W 0.0049



Cuadro N° 43 ANVA de la variable dependiente Descongelación para integridad de Acrosoma (SAS)

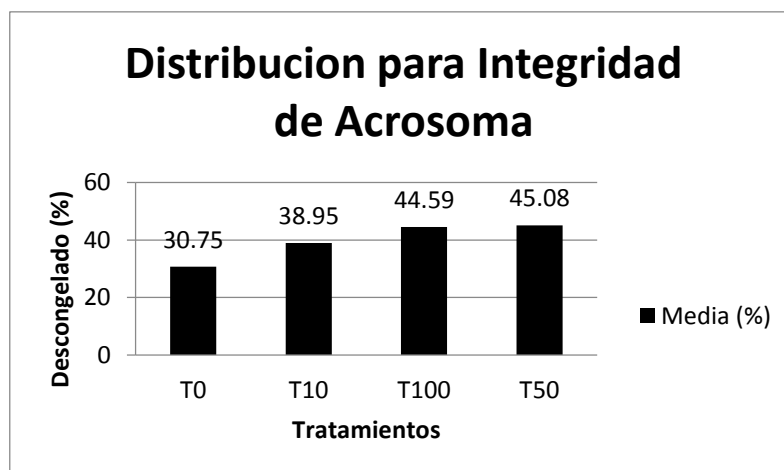
Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr>F
Modelo	3	93.7935465	31.2645155	8.17	0.0351
Erro	4	15.3045794	3.8261449		
Total corregido	7	109.0981260			

Cuadro N° 44 Comparación múltiple de Tukey en descongelado para integridad de membrana

Tukey agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	42.173	2	T50
A	41.880	2	T100
B A	38.614	2	T10
B	33.670	2	T0

Cuadro N°45 Test de normalidad para descongelacion en integridad de membrana

Test	estdistica	Valor p
Shapiro-Wilk	W 0.957755	Pr < W 0.7885



**Cuadro N° 46 Preparación del dilutor Tris**

Producto	Cantidad
Tris	2.42g
Ácido cítrico monohidratado	2.4g
Fructuosa	1g
Antibiótico	0.1ml
Enrazado a 100mL con agua bidestilada	

**Fuente:** Planteado por Hafez, (1989)

**Cuadro N° 47 Preparación de Eosina-Nigrosina modificada**

Producto	Cantidad
Eosina	3.3 g
Nigrosina	20.0 g
Citrato de sodio	1.5 g
Enrazar con Agua destilada a 300ml	

**Fuente:** indicado por Barth, (1989)

**Cuadro N° 48 solución hipo-osmótica.**

Producto	Cantidad
Citrato de sodio	0.734g
Fructuosa	1.351g
Enrazar a 100ml con Agua destilada	

**Fuente:** se realizó según descrito por Jeyendran et al, (1984)





Figura N° 1 Alpaca copulando a la vagina artificial

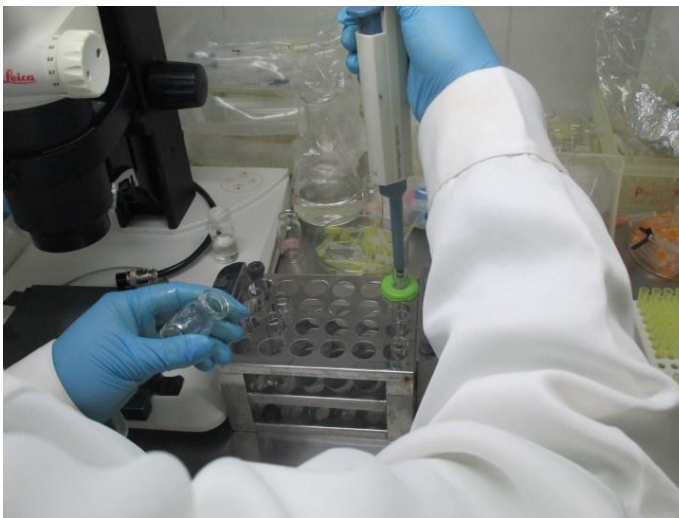
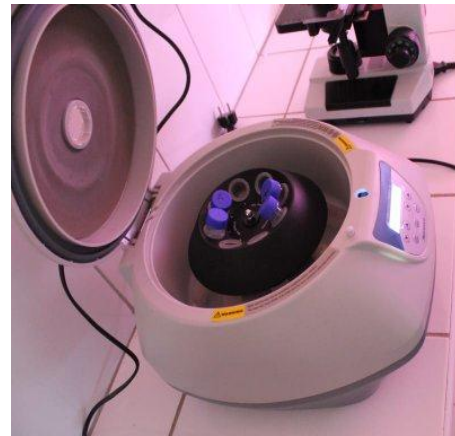


Figura N° 2 Preparación de los tratamientos



Figura N° 3 Obtención de los espermatozoides



Figura N° 4 Fase de refrigeración

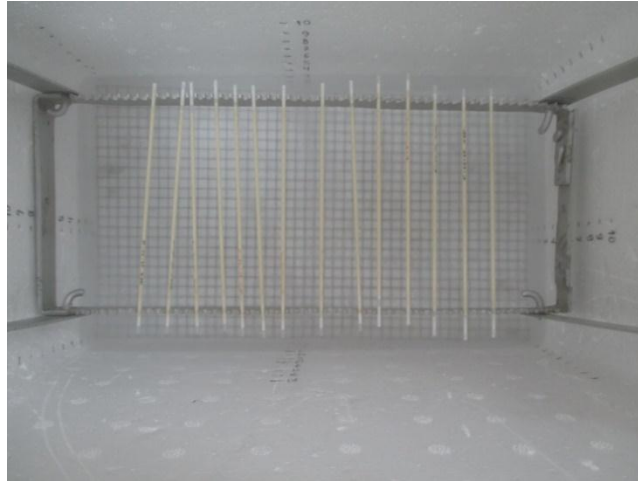
CURVA DE ENRIAMIENTO

PRUEBA 1		PRUEBA 2		PRUEBA 3		PRUEBA 4	
N.º	HORA	N.º	HORA	N.º	HORA	N.º	HORA
1	12:00	1	12:00	1	12:00	1	12:00
2	12:05	2	12:05	2	12:05	2	12:05
3	12:10	3	12:10	3	12:10	3	12:10
4	12:15	4	12:15	4	12:15	4	12:15
5	12:20	5	12:20	5	12:20	5	12:20
6	12:25	6	12:25	6	12:25	6	12:25
7	12:30	7	12:30	7	12:30	7	12:30
8	12:35	8	12:35	8	12:35	8	12:35
9	12:40	9	12:40	9	12:40	9	12:40
10	12:45	10	12:45	10	12:45	10	12:45
11	12:50	11	12:50	11	12:50	11	12:50
12	12:55	12	12:55	12	12:55	12	12:55
13	13:00	13	13:00	13	13:00	13	13:00
14	13:05	14	13:05	14	13:05	14	13:05
15	13:10	15	13:10	15	13:10	15	13:10
16	13:15	16	13:15	16	13:15	16	13:15
17	13:20	17	13:20	17	13:20	17	13:20
18	13:25	18	13:25	18	13:25	18	13:25
19	13:30	19	13:30	19	13:30	19	13:30
20	13:35	20	13:35	20	13:35	20	13:35
21	13:40	21	13:40	21	13:40	21	13:40
22	13:45	22	13:45	22	13:45	22	13:45
23	13:50	23	13:50	23	13:50	23	13:50
24	13:55	24	13:55	24	13:55	24	13:55
25	14:00	25	14:00	25	14:00	25	14:00
26	14:05	26	14:05	26	14:05	26	14:05
27	14:10	27	14:10	27	14:10	27	14:10
28	14:15	28	14:15	28	14:15	28	14:15
29	14:20	29	14:20	29	14:20	29	14:20
30	14:25	30	14:25	30	14:25	30	14:25
31	14:30	31	14:30	31	14:30	31	14:30
32	14:35	32	14:35	32	14:35	32	14:35
33	14:40	33	14:40	33	14:40	33	14:40
34	14:45	34	14:45	34	14:45	34	14:45
35	14:50	35	14:50	35	14:50	35	14:50
36	14:55	36	14:55	36	14:55	36	14:55
37	15:00	37	15:00	37	15:00	37	15:00
38	15:05	38	15:05	38	15:05	38	15:05
39	15:10	39	15:10	39	15:10	39	15:10
40	15:15	40	15:15	40	15:15	40	15:15
41	15:20	41	15:20	41	15:20	41	15:20
42	15:25	42	15:25	42	15:25	42	15:25
43	15:30	43	15:30	43	15:30	43	15:30
44	15:35	44	15:35	44	15:35	44	15:35
45	15:40	45	15:40	45	15:40	45	15:40
46	15:45	46	15:45	46	15:45	46	15:45
47	15:50	47	15:50	47	15:50	47	15:50
48	15:55	48	15:55	48	15:55	48	15:55

Figura N° 5 Registro de refrigeración



Figura N° 6 Empajillado del semen



**Figura N° 7 Pajillas en vapores de nitrógeno líquido**



**Figura N° 8 Preparación de las proporciones de plasma seminal para el descongelado.**



**Figura N° 9 Incubación de las proporciones de plasma seminal**



Figura N° 2 Obtención de la pajilla al azar

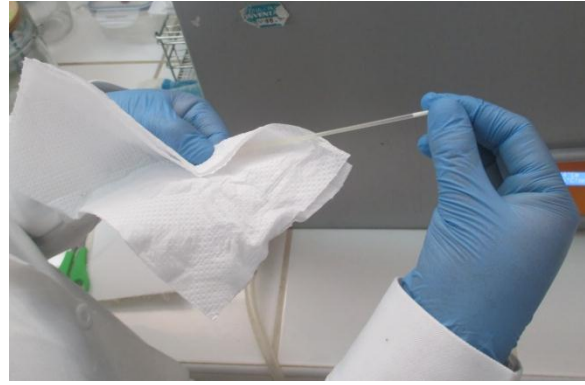


Figura N° 11 Secado de la pajilla después del Baño María

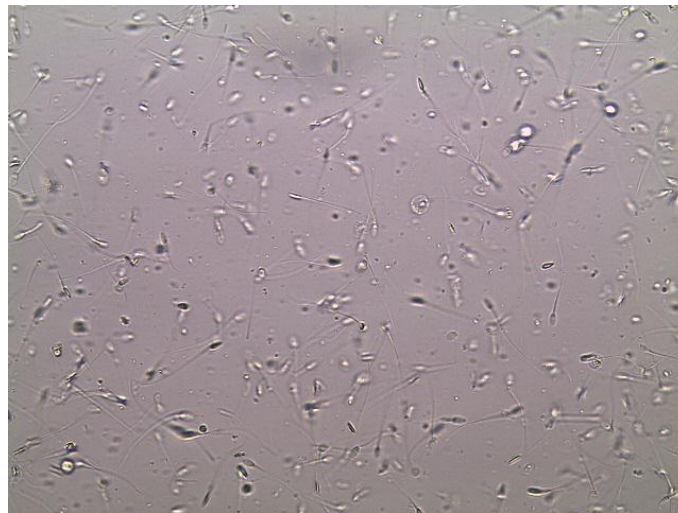


Figura N° 12 Motilidad al momento de la colecta

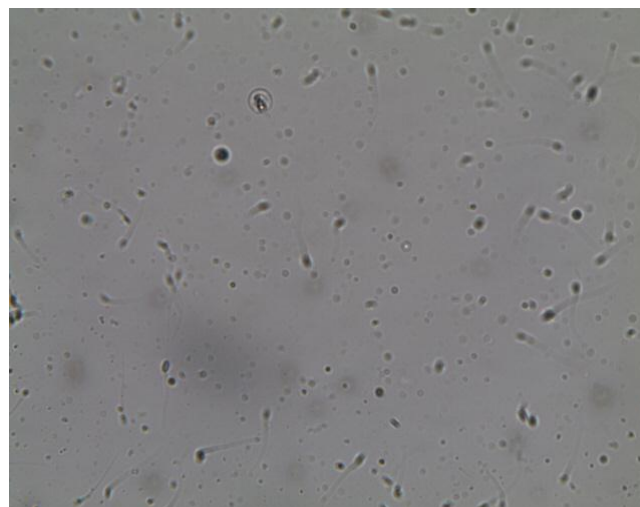
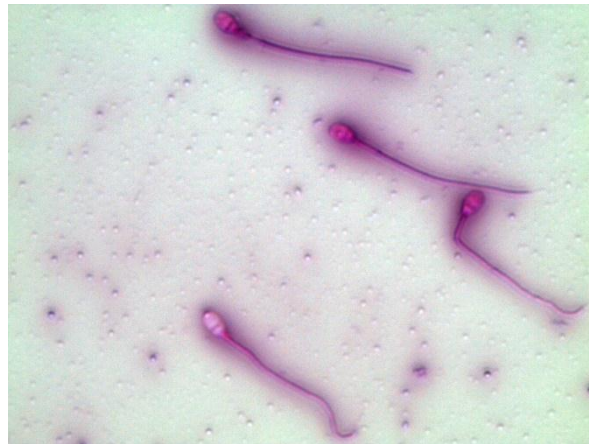


Figura N° 13 Motilidad al momento de la descongelación



**Figura N° 14 Vitalidad al momento de la colecta**



**Figura N° 15 Vitalidad al momento de la descongelación**



**Figura N° 16 Integridad de membrana al momento de la colecta**



**Figura N° 17 Integridad de membrana al momento de la descongelación**



**Figura N° 18 Integridad de Acrosoma al momento de la colecta**



**Figura N° 19 Integridad de Acrosoma al momento de la descongelación**