



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

**Efecto de diferentes métodos de congelación y
descongelación en la criopreservación de los
espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria

AUTOR

Thais Bitinia VARGAS SANDOVAL

ASESOR

Dr. Wilber Calixto Rolando GARCIA VERA

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Vargas T. Efecto de diferentes métodos de congelación y descongelación en la criopreservación de los espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Escuela Profesional de Medicina Veterinaria; 2023.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Thaís Bitinia Vargas Sandoval
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	71122939
URL de ORCID	-----
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	WILBER CALIXTO ROLANDO GARCÍA VERA
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	01345827
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-3666-7267
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10650758
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	WILFREDO HUANCA LÓPEZ
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10036341
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	LUIS MANUEL BARRIOS ARPI
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43485699
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.4.2.3. Reproducción Animal

Grupo de investigación	Producción y Sanidad en Ganadería Altoandina (PROSAGAL)
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM y al FONDECYT – CONCYTEC a través del proyecto de investigación aplicada N° 053-2108-FONDECYT/BM (Resolución Rectoral N° 00721-R-19) con N° de contrato 53-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura sede Marangani, Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Cusco Provincia: Canchis Distrito: Marangani Dirección: Calle Lima N° 106 Latitud: -14,35544 Longitud: -71,16789
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 – 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencia Veterinaria https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#4.03.01



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL
TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA**

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **viernes 17 de febrero de 2023**, a las **11:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **0216-EPMV/FMV-2022**, integrado por los siguientes profesores:

MV. Dr. Santiani Acosta, Alexei Vicent	Presidente del Jurado
MV. Dr. Garcia Vera, Wilber Calixto Rolando	Asesor de la Tesis
MV. Mg. Huanca López, Wilfredo	Miembro del Jurado
MV. Mg. Barrios Arpi, Luis Manuel	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **VARGAS SANDOVAL, THAIS BITINIA** para optar el Título Profesional de Médico Veterinaria, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“EFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES DE ALPACA (*Vicugna pacos*)”,

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria de la Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **dieciséis (16)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIA** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:



Firmado digitalmente por SANTIANI ACOSTA Alexei Vicent FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.03.2023 13:43:50 -05:00

.....
Santiani Acosta, Alexei Vicent: MV. Dr. Prof. Principal TC



Firmado digitalmente por GARCIA VERA Wilber Calixto Rolando FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 20.03.2023 10:52:08 -05:00

.....
Garcia Vera, Wilber Calixto Rolando: MV. Dr. Prof. Principal DE



Firmado digitalmente por HUANCA LOPEZ Wilfredo FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 17.03.2023 08:14:17 -05:00

.....
Huanca López, Wilfredo: MV. Mg. Prof. Principal DE

.....
Barrios Arpi, Luis Manuel: MV. Mg. Prof. Asociado DE



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

ep.veterinaria@unmsm.edu.pe

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"



INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

Tesis para optar el título profesional de Médico Veterinario

1. Facultad: Medicina Veterinaria
2. Escuela: Medicina Veterinaria
3. Autoridad académica que emite el informe de originalidad: Escuela Profesional de Medicina Veterinaria.
4. Apellidos y Nombres de la Autoridad Académica: Santiani Acosta, Alexei Vicent
5. Operador del Programa Informático de similitudes: Sandoval Monzón Rocío Silvia.
6. Documento evaluado: "Efecto de diferentes métodos de congelación y descongelación en la criopreservación de los espermatozoides de alpaca (*Vicugna Pacos*)"
7. Autor del documento: Thaís Bitinia Vargas Sandoval
8. Fecha de recepción del documento: 25 de setiembre del 2022
9. Fecha de aplicación del programa informático: 04 de octubre del 2022
10. Software utilizado
 - Turnitin
11. Configuración del programa detector de similitudes:
 - Excluye textos entrecomillados
 - Excluye bibliografía
 - Excluye cadenas menores de 40 palabras
 - Exclusión de fuentes para buscar similitud
12. Porcentaje de similitudes según programa detector de similitudes: 8%
13. Fuentes originales de similitudes encontradas:
 - hdl.handle.net 2%
 - happylibnet.com 2%
 - spermova.pe 1%
 - ri.agro.uba.ar 1%
 - repositorio.cientifica.edu.pe 1%
 - Publicación "Efecto de la inseminación artificial con semen fresco, con uno y dos servicios, en la fertilidad y natalidad de las alpacas" <1%
 - docplayer.es <1%
 - www.scribd.com <1%
 - www.reproduccionanimal.org <1%
 - repositorio.unsaac.edu.pe <1%
14. Observaciones: el mayor porcentaje de las similitudes halladas en la tesis evaluada se encuentra en la sección de materiales y métodos.
15. Calificación de originalidad:

DOCUMENTO CUMPLE CRITERIOS DE ORIGINALIDAD, SIN OBSERVACIONES.

Fecha del informe: 04 de octubre del 2022



UNMSM

Firmado digitalmente por SANTIANI
ACOSTA Alexei Vicent FAU
20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 06.03.2023 16:36:01 -05:00

Dr. Alexei Vicent Santiani Acosta
Director EPMV

DEDICATORIAS

A Dios, por permitirme vivir cada día y ser parte de sus designios divinos.

A mis padres, Rino y Elmira, por el amor, preocupación, compromiso y apoyo que siempre tuvieron conmigo.

A mi hermanita Yanet, por el ser el mayor cimiento para la construcción de mi vida profesional y la mayor de mis alegrías. En ella tengo el espejo en el cual me quiero reflejar.

A Maritza, Ana y Sandra, por acompañarme en los momentos más difíciles de mi vida y también por celebrar cada uno de mis logros.

A Renato, por siempre creer en mí y ser pilar de la confianza que necesito para cumplir mis metas.

A Paul, Gabriela y Ale por ofrecerme su amistad y apoyo durante mi estadía en Cusco.

A Toby, Maylo, Argos, Nieves y Puki por ser mi mayor soporte emocional y mis mejores amigos durante tantos años.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Wilber García Vera por toda la perseverancia, recomendaciones y sugerencias para concluir este trabajo.

Al laboratorio de Reproducción del centro IVITA -Maranganí por acogerme para realizar mi proyecto brindándome los materiales necesarios.

Al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la FMV-UNMSM sobre todo a los Doctores Wilfredo y Fahrih Huanca por acogerme y compartir su experiencia y técnicas conmigo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM, por todo el conocimiento y experiencia adquiridos durante estos 6 años y que estarán reflejados a lo largo de todo mi camino.

INDICE DE CONTENIDOS

INDICE DE CONTENIDOS.....	iv
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACA.....	3
2.1.1. PROPIEDADES BIOQUÍMICAS.....	3
2.1.2 MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA.....	4
2.1.3. FACTORES QUE AFECTAN LAS CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN	6
2.2. CRIOPRESERVACIÓN	7
2.2.1. LICUEFACCIÓN DEL SEMEN.....	7
2.2.2. DILUTORES DEL SEMEN.....	8
2.2.3. CRIOPROTECTORES.....	10
2.2.3.1. CRIOPROTECTORES PERMEABLES.....	10
2.2.3.2. CRIOPROTECTORES NO PERMEABLES.....	12
2.2.4. PROCESO DE LA CRIOPRESERVACIÓN SEMINAL.....	12
2.2.4.1. PROCESO DE REFRIGERACIÓN.....	14
2.2.4.2. PROCESO DE CONGELACIÓN.....	15

2.2.4.3. PROCESO DE DESCONGELACIÓN.....	15
2.2.5. MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN.....	17
2.2.6. FACTORES CRÍTICOS EN EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN.....	18
2.3. EVALUACIÓN DEL SEMEN.....	20
2.3.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA.....	20
2.3.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA.....	23
2.3.3 SISTEMA DE ANÁLISIS ASISTIDO POR COMPUTADORA	26
2.3.4 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	27
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1. LUGAR DE ESTUDIO.....	29
3.2. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL.....	29
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
3.4. PREPARACIÓN DE DILUYENTES DE CONSERVACIÓN.....	31
3.5. COLECCIÓN DE SEMEN Y TRATAMIENTO DEL SEMEN FRESCO.....	31
3.6. REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN DE SEMEN USANDO DIFERENTES MÉTODOS.....	33
3.7. DESCONGELACIÓN DE PAJILLAS UTILIZANDO DOS MÉTODOS DIFERENTES.....	34
3.8. ANALISIS SEMINAL.....	34
3.8.1. MOTILIDAD TOTAL (MT, %) Y MOTILIDAD PROGRESIVA (MP, %).....	34
3.8.2. VIABILIDAD ESPERMÁTICA MEDIANTE MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.....	34
3.8.3. ANALISIS DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	36
3.8.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	36
IV. RESULTADOS.....	37
4.1. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL SEMEN FRESCO.....	37
4.2. EFECTO DE DIFERENTES METODOS DE CONGELACIÓN EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA.....	38
4.3. EFECTO DE DIFERENTES METODOS DE DESCONGELACIÓN EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA.....	38
V. DISCUSIÓN.....	39
VI. CONCLUSIONES.....	44
VII. RECOMENDACIONES.....	45
VIII. LITERATURA CITADA.....	46
IX. APÉNDICE.....	54

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de diferentes métodos de congelación y descongelación sobre la calidad de espermatozoides de alpaca. Se utilizaron 4 alpacas macho a los cuales se les colectó semen con el método de vagina artificial. Se aceptaron las muestras con motilidad total $\geq 60\%$ y concentración de 80×10^6 espermatozoides/mL. Se procedió a efectuar la primera evaluación de parámetros del pool de eyaculados como control para que más adelante la muestra fuera dividida en cinco alícuotas que se diluyeron en una proporción 1:1 con la fracción A (tris, ácido cítrico, fructosa, tilosina, gentamicina, lincomicina y yema de huevo) del dilutor a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ y enfriaron hasta $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 120 min, después nuevamente se diluyó en proporción 1:1 con la fracción B (tris, ácido cítrico, fructosa, tilosina, gentamicina, lincomicina, yema de huevo y glicerol) para ser envasadas en pajuelas de 0.25 mL siendo posteriormente sometida a 5 métodos diferentes de congelación: T1: 1cm/15 min; T2: 4cm/15 min; T3: 7cm/15 min; T4: 4cm/10 min y 1cm/5 min; T5: 7cm/10 min y 4cm/5min luego fueron almacenadas. Cada tratamiento fue sometido a dos procesos de descongelación, el primero a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos y el segundo a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 segundos. Se evaluó la motilidad total (MT) y progresiva (MP) mediante el sistema CASA, viabilidad mediante microscopía de fluorescencia y la integridad de la membrana mediante HOST. Los resultados fueron analizados utilizando el procedimiento de modelo lineal general (ANOVA) del SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). El método de congelación T5 ($p < 0.05$) obtuvo el mejor efecto sobre los parámetros de viabilidad ($30 \pm 10.27\%$), MT ($28.20 \pm 12.82\%$) e integridad de membrana ($9 \pm 10.75\%$) al descongelado, brindando valores superiores a los demás. Los parámetros de calidad espermática al descongelado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos fueron superiores ($p > 0.05$) a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 10 segundos. Se concluye que el método de congelación de los espermatozoides de alpaca a 7 cm por 10 minutos y 4 cm por 5 minutos y el método de descongelación de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 segundos proporcionaron los mejores resultados en los parámetros de MT, viabilidad e integridad de membrana. Los resultados de este estudio ayudarán a promover la optimización de un protocolo de criopreservación seminal mejorando el uso de biotecnologías reproductivas necesarias para el mejoramiento genético en alpacas.

Palabras clave: Espermatozoide, alpacas, congelación, descongelación, fluorescencia.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of different freezing and thawing methods on the quality of alpaca spermatozoa. Four male alpacas were used, from which semen was collected using the artificial vagina method. Samples with total motility $\geq 60\%$ and concentration of 80×10^6 spermatozoa/mL were accepted. The first evaluation of the parameters of the ejaculate pool was carried out as a control so that later the sample was divided into five aliquots that were diluted in a 1:1 ratio with fraction A (tris, citric acid, fructose, tylosin, gentamicin, lincomycin and egg yolk) from the diluter at 35°C and cooled to 5°C in 120 min, then again diluted 1:1 with fraction B (tris, citric acid, fructose, tylosin, gentamicin, lincomycin, egg yolk and glycerol) to be packed in 0.25 mL straws and subsequently subjected to 5 different freezing methods: T1: 1cm/15 min; T2: 4cm/15min; T3: 7cm/15min; T4: 4cm/10 min and 1cm/5 min; T5: 7cm/10min and 4cm/5min were then stored. Each treatment underwent two thawing processes, the first at 37°C for 30 seconds and the second at 60°C for 10 seconds. Total (MT) and progressive (MP) motility were evaluated using the CASA system, viability using fluorescence microscopy, and membrane integrity using HOST. Results were analyzed using the general linear model (ANOVA) procedure of SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The T5 freezing method ($p < 0.05$) had the best effect on the parameters of viability ($30 \pm 10.27\%$), MT ($28.20 \pm 12.82\%$) and membrane integrity ($9 \pm 10.75\%$) upon thawing, providing values higher than others. The sperm quality parameters when thawed at 37°C for 30 seconds were higher ($p > 0.05$) than at 60°C in 10 seconds. It is concluded that the freezing method of alpaca spermatozoa at 7 cm for 10 minutes and 4 cm for 5 minutes and the thawing method at 37°C for 30 seconds provided the best results in MT, viability and integrity parameters. membrane. The results of this study will help promote the optimization of a seminal cryopreservation protocol, improving the use of reproductive biotechnologies necessary for genetic improvement in alpacas.

Keywords: Sperm, alpacas, freezing, thawing, fluorescence.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto del uso de diferentes tipos de diluyentes sobre la motilidad total de espermatozoides frescos y posdescongelados de alpaca.

Cuadro 2. Características espermáticas de semen fresco de alpaca obtenidas con vagina artificial.

Cuadro 3. Efecto de los diferentes tratamientos de congelación T1 1 cm 15 min, T2 4 cm 15 min, T3 7 cm 15 min, T4 4 cm 10 min y 1 cm 5 min y T5 7 cm 10 min y 1 cm 5 min sobre los parámetros de calidad espermática postdescongelación en alpacas.

Cuadro 4. Efecto de dos métodos diferentes de descongelación (37 °C por 30 segundos y 60 °C por 10 segundos) en los parámetros de calidad espermática.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma de procedimientos experimentales.

Figura 2. Proceso de colección de semen fresco de alpaca por el método de vagina artificial.

Figura 3. Proceso de criopreservación del semen de alpaca y registro de temperaturas durante la congelación.

Figura 4. Parámetros de evaluación postdescongelamiento.

I. INTRODUCCIÓN

Una de las actividades comerciales de gran consideración para el desarrollo de las comunidades altoandinas es la crianza de camélidos sudamericanos, no solo por su producción de fibra de buena calidad sino en la actualidad, por su uso como fuente de alimento de alto contenido proteico (Huanca *et al.*, 2007); sin embargo, el esquema de explotación que se ejecuta en las comunidades es deficiente y el incremento de su productividad depende de la aplicabilidad de los programas de mejoramiento genético entre otros.

La biotecnología actual en el área de criopreservación facilita la conservación genética en reproductores de alto valor por tiempo ilimitado y facilita su transporte a distancias lejanas; sin embargo, la criopreservación seminal en camélidos sudamericanos (CSA) no ha tenido el éxito semejante al de otras especies ya que se obtienen bajos porcentajes de preñez (Huanca *et al.*, 2007), es por ello que no existen campañas a nivel nacional de inseminación artificial con semen criopreservado.

Se considera que los espermatozoides de CSA no toleran bien los procedimientos de congelación y descongelación, probablemente debido a la naturaleza viscosa del plasma seminal que impide que el crioprotector entre en contacto con los espermatozoides. La alta viscosidad y la mala calidad de los eyaculados son actualmente las principales desventajas para el desarrollo de una técnica de congelación. Por otra parte, Flores (2011) nos indica que el éxito de la criopreservación depende de muchos factores como la interacción entre crioprotectores, tipo de diluyente, velocidad de enfriamiento, velocidad de descongelación, envasado e incluso la variación entre animales individuales; sin embargo, en CSA, los estudios realizados se han enfocado más en el tipo de dilutor y crioprotector (Bravo *et al.*, 2000; Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et*

al., 2005) prestando poca atención al manejo de las tasas de congelación y descongelación que son importantes para la optimización de un protocolo de criopreservación.

El objetivo de esta investigación es evaluar el efecto de diferentes métodos de congelación, temperaturas y tiempos de descongelación sobre la calidad de los espermatozoides de alpaca, los resultados obtenidos en este estudio promoverán la optimización de un protocolo de criopreservación seminal y a su vez la mejora del uso de biotecnologías reproductivas, que son herramientas necesarias para el mejoramiento genético de caracteres con alta demanda económica por el mercado nacional e internacional como lo es la finura de fibra, produciendo mayor cantidad y mejor calidad por medio de la implementación de núcleos de reproductores de muy alta calidad genética en las zonas alpaqueras altoandinas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACA

2.1.1. Propiedades Bioquímicas

Las características bioquímicas del semen de CSA suelen ser similares con respecto a otras especies de producción. El plasma seminal radica en una compleja mixtura de secreciones que se originan en el testículo y en las glándulas sexuales accesorias del macho, cumpliendo la función de protección en el tracto reproductivo de la hembra (Tibary y Vaughan, 2006).

Existen diferentes trabajos en donde se expresa el perfil bioquímico del plasma seminal en machos que ya alcanzaron su madurez sexual. Entre los componentes bioquímicos se encuentra la glucosa, que es la principal fuente de energía y es necesaria para el metabolismo de los espermatozoides en la respiración celular, esta puede ejercer una acción inhibitoria o estimuladora en la capacitación espermática. La concentración promedio de glucosa en el plasma seminal de alpaca es de 7 ± 0.4 mg/dl (Garnica *et al.*, 1993). Se resalta que el ácido cítrico y la fructosa tienen concentraciones que son independientes a la edad de cada macho, probablemente a causa de la ausencia de vesícula seminal en esta especie, las concentraciones de estos dos elementos son en promedio 4.3 ± 0.3 mg/dl (Garnica *et al.*, 1995) y 4.0 ± 0.2 mg/dl (Bravo *et al.*, 2002) respectivamente en CSA.

En relación con los lípidos, los niveles altos de colesterol previenen la capacitación espermática prematura y promueven una reacción acrosomal oportuna, por tanto, la alteración de estos niveles influye sobre la movilidad, conformación y activación enzimática (Demianowicz y Strezek, 1996). Las concentraciones presentes en alpacas oscilan entre 86 ± 10 mg/dl (Bravo *et al.*, 2000) y 95.0 ± 10.0 (Garnica *et al.*, 1993).

Las proteínas neutralizan el efecto de los metales pesados, la aglutinación celular, la capacitación y reacción acrosomal prematura. La concentración promedio en el plasma seminal (media \pm DE) es de proteínas totales 3 ± 0.3 g/dl, el de

Albúminas 2 ± 0.3 g/dl y Globulinas 1 ± 0.1 g/dl (Garnica *et al.*, 1993). Otros componentes tanto orgánicos como inorgánicos se hallan en diferentes concentraciones como el Cloro 404 ± 34 mEq/l (Malo *et al.*, 2020), Calcio 18 ± 1 mg/dl, Fósforo inorgánico 8.0 ± 0.4 mg/dl, Fosfolípidos 29 ± 1 mg/dl y Nitrógeno total 548 ± 50 mg/dl (Garnica *et al.*, 1993).

El plasma seminal de CSA presenta altas cantidades de factor de crecimiento nervioso beta (β -NGF) (proteína de 13 kDa que representa el 27 % del contenido proteico del plasma seminal) (Ratto *et al.*, 2010), siendo producido principalmente en la próstata. Dicho factor tiene participación sobre la generación del pico preovulatorio de hormona luteinizante (LH) en las hembras y por tanto induce a la ovulación (Huanca *et al.*, 2012). La colocación del plasma seminal para inducir la ovulación en hembras puede ser directa en el útero de la hembra sin necesidad de empadre o por vía intramuscular (Huanca *et al.*, 2012). sin embargo; la composición del factor inductor de ovulación aun es incierta.

2.1.2. Morfología Espermática

La célula espermática está conformada estructuralmente por la cabeza y la cola, ambos se encuentran envueltos por una membrana espermática llamada plasmolema. La primera está conformada por el núcleo que contiene al ADN que fue sustituido de manera parcial por pequeñas proteínas denominadas protaminas (Sutovsky y Manandhar, 2006). El extremo anterior de la cabeza se encuentra protegido por el acrosoma, esta estructura tiene forma de un saco membranoso de doble membrana localizado encima del núcleo a forma de casquete que contiene enzimas hidrolíticas como la acrosina y hialuronidasa que intervienen en la fecundación (Garner y Hafez, 2002).

La segunda estructura se divide en diferentes partes: cuello, segmento medio, segmento principal y segmento caudal. El cuello forma una lámina que se empalma a la depresión del extremo posterior del núcleo rodeado por un cúmulo de citoplasma residual al que se le denomina “gota citoplasmática”. El segmento medio es aquella zona de la cola envuelto por una cantidad numerosa de mitocondrias denominada

vaina mitocondrial (Garner y Hafez, 2002). El segmento principal está conformado por el axonema y sus fibras que llegan hasta casi la punta de la cola (Garner y Hafez, 2002). El último segmento está conformado solo por el axonema y es envuelto por la membrana plasmática (Sutovsky y Manandhar, 2006).

Morfométricamente, el largo de las células espermáticas maduras en CSA son menores a los de otros machos de producción presentando unas dimensiones aproximadas de $6.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$ de largo y $3.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ de ancho en la cabeza (Buendía *et al.*, 2002).

El análisis morfológico es un estudio de rutina que permite estimar la calidad del eyaculado. En muchas especies, el aumento del porcentaje en las anomalías morfológicas se correlaciona con una baja tasa sobre la fertilidad del reproductor. Las evaluaciones morfométricas realizadas por computadora con el sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis System) permiten la medición de forma imparcial de la forma y magnitudes de la cabeza de la célula espermática como indican los estudios realizados por (Buendía *et al.*, 2002). La asistencia del programa computarizado en la evaluación espermática permite detectar diferencias tenues entre individuos que no son detectados en una evaluación subjetiva.

La morfología es una característica muy útil para poder anticipar la capacidad de fecundación en un macho, fundamentándose en la forma y medida de las estructuras espermáticas para poder catalogarlas, esto nos permite clasificarla en anomalías propias de la cabeza, pieza media y cola. Todas las anomalías que están presentes en otros animales de producción se pueden hallar también en CSA. Según Bravo (1997a).

Entre las anomalías más comunes halladas en alpacas se puede encontrar las colas con curvaturas o curvaturas dobles (9 – 15 %), cabeza libre (3 %), cabezas dobles (13 %), existencia de gota citoplásmica (1 – 7 %) (Lichtenwainer *et al.*, 1996). Las pautas para que una célula espermática se considere normal contempla ciertos caracteres morfológicos como: La forma oval de la cabeza, carencia de vacuolas o escotaduras en la cabeza, la superficie de la cabeza debe estar ocupada de un 40 % a 70 % por el acrosoma, la gota plasmática debe estar presente en la pieza

intermedia y debe ser inferior a un 30 % de la superficie de la cabeza, la fijación entre el flagelo y la cabeza debe ser de forma axial y presencia del flagelo recto y uniforme. Cualquier expresión o distribución impropia de esas condiciones se consideran anormales (Lichtenwainer *et al.*, 1996). Buendía (2002) menciona que el análisis morfológico por medio del uso del microscopio óptico es viable siempre que se usen las tinciones correctas, aquellas que resalten las estructuras espermáticas que se están evaluando.

2.1.3. Factores que afectan las características del semen

Uno de los factores que afectan la calidad seminal es el tiempo de cópula, ya que, si bien este no afecta directamente el volumen del eyaculado, sí repercute sobre la concentración y el porcentaje de vitalidad espermática. La cópula interrumpida ocasiona que se incremente el nivel de porcentaje de espermatozoides muertos, es por ello que se recomienda que la cópula no debe ser menor a los 15 minutos para que así no disminuya la concentración del eyaculado. Por otro lado, las colecciones sucesivas también pueden ser contraproducentes ya que estudios realizados por Bravo (2002) han demostrado que la concentración y volumen de las muestras de eyaculado disminuyen después del tercer eyaculado sucesivo. La edad de los machos en el momento de la cópula también es un factor relevante, ya que existe una variación significativa en la concentración espermática de los animales jóvenes es menor con respecto a los machos que tenían más edad (Gadea., 2005).

El estrés térmico es un factor que afecta directamente la calidad seminal principalmente en lugares donde las variaciones térmicas son importantes, como aquellas zonas que presentan clima continental (Gadea., 2005). A su vez, al realizar las colecciones se debe tener en cuenta muchos factores adicionales como la estación del año, temperatura del ambiente exterior, el entorno social del animal en el corral, el tipo de nutrición, su edad, el desarrollo de características sexuales secundarios y la aparición de patologías (Bravo *et al.*, 1997a).

2.2. CRIOPRESERVACIÓN

2.2.1. Licuefacción del semen

Una de las propiedades principales del semen de CSA es su gran viscosidad que presenta, esta característica es la que imposibilita su manipulación y estudio, se conjetura que establece un arquetipo de depósito en el útero de la hembra que ayuda a conservar los espermatozoides viables (Huanca *et al.*, 2007). Debido a su naturaleza viscosa es que se utilizan elementos exógenos para “desgelificar” los eyaculados. Generalmente se utilizan enzimas proteolíticas como por ejemplo la hialuronidasa, colagenasa, tripsina y fibrolisina (Bravo *et al.*, 2000, 2002); sin embargo, presentan efectos negativos sobre la viabilidad espermática e integridad acrosomal alterando sus características y disminuyendo la fertilidad de los eyaculados.

Algunos estudios como los de Ccallo (1996) señalan que se produce un impacto importante sobre el porcentaje de espermatozoides vivos haciendo uso de cuatro enzimas de uso común como la fibrolisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina llegando a reducir la vitalidad en 7, 10, 23 y 18 %, respectivamente con respecto a las muestras sin desgelificar. Por otro lado, Huanca *et al* (2007) menciona que la colagenasa es efectiva en la reducción de la viscosidad sin causar un gran impacto sobre las características seminales.

Se ha empleado la agitación mecánica con cierto porcentaje de éxito permitiendo una mejor manipulación, dilución, extensión y congelación. Dentro de este tipo de método está la aspiración y expulsión de la muestra de eyaculado por medio de una aguja hipodérmica obteniendo buenos resultados con respecto a la reducción de la viscosidad y la poca repercusión sobre las características seminales (Valdivia *et al.*, 1999).

2.2.2. Dilutores de semen

Un dilutor correcto nos permite suministrar nutrientes a los espermatozoides, darle protección fuera del tracto reproductivo como las variaciones bruscas de pH y la presencia de un medio isotónico. También se protege a los espermatozoides ante el shock térmico al que se someten durante el proceso de criopreservación seminal y neutraliza el crecimiento microbiano (Garner y Hafez, 2002). Al diluir las muestras de semen podemos obtener numerosas dosis con la concentración requerida para realizar inseminación artificial optimizando su rendimiento.

Entre los componentes más frecuentes se encuentran la yema de huevo y leche, que contienen lipoproteínas que estabilizan las membranas celulares brindándole así termoestabilidad a los espermatozoides contra el frío (Hafez, 2002), además de atenuar los cambios en el pH, la leche actúa como quelante de metales pesados (Salamon y Maxwell, 2000). sin embargo; la leche contiene una proteína llamada lactenina que es de naturaleza toxica para los espermatozoides por lo cual se requiere desnaturalizarla sometiéndola a tratamiento térmico antes de su uso, calentándola a temperaturas superiores a los 90 °C si es el caso de leche entera, es por ello que se recomienda el uso de leche UHT (Ultra High Temperature) ya que no requiere dicho tratamiento y la venden bajo condiciones de esterilidad o también el uso de leche descremada (Salamon y Maxwell, 2000).

La yema de huevo ha sido utilizada en muchas especies domesticas como toros, carneros, verracos, equinos, camélidos y especies silvestres como termorregulador mejorando la fertilidad espermática (Hafez, 2002). Se puede usar sola o en unión con citrato de sodio, leche entera sometida térmicamente o leche descremada. Las LDL (lipoproteínas de baja densidad) son las responsables de la protección termorreguladora brindada por la yema de huevo, ya que durante el proceso de congelación y descongelación las LDL se adhiere a la membrana plasmática de los espermatozoides formando una capa protectora en la superficie, proporcionándoles protección mediante la estabilización de membrana (Demianowicz y Strezek, 1996). El uso de las HDL (lipoproteínas de alta-densidad) redujeron los parámetros de cinética espermática en comparación con el grupo que

fue preservado con LDL, ya que las primeras contienen gránulos que actúan como componentes dañinos en la preservación seminal.

El componente energético de la dilución se da gracias a la agregación de sustratos metabolizables, entre ellos tenemos a los azúcares simples como la glucosa, fructosa o lactosa (Garner y Hafez, 2002). También se pueden utilizar como sustratos energéticos al sorbitol y glicerilfosforilcolina (Sandoval, 2005). Las sustancias iónicas y no iónicas mantienen una osmolaridad y pH adecuado; mientras que, la agregación de antibióticos como la penicilina, estreptomina, gentamicina, entre otros, evitan un crecimiento bacteriano exponencial.

Entre los dilutores más frecuentemente usados para el semen de alpaca se encuentran el: PBS, yema-glucosa-citrato, glucosa-citrato, tris y tridalyl, Andromed y Optixcell. El estudio realizado por Bravo (2002) sostiene que el Tris combinado con yema de huevo es el dilutor más eficaz al mantener la vitalidad espermática durante los procesos de dilución, refrigeración, congelación y descongelación. La dilución seminal varía dependiendo de la concentración espermática de la muestra de eyaculado. Usualmente una muestra de eyaculado (que ya es de naturaleza diluida) puede diluirse en relación de 1:1 (v- v) mientras que las muestras más viscosas pueden diluirse 1:2 o 1:3 con dilutor, incluso mencionan que puede ser productivo agregar 1mL del diluyente a la luz de la vagina artificial para conservar los espermatozoides durante una cópula prolongada (Valdivia *et al.*, 1999).

2.2.3. Crioprotectores

Son soluciones de naturaleza hidrosoluble que dan protección ante la exposición al frío y actúan sinérgicamente en el proceso de deshidratación celular. El proceso de deshidratación parcial es indispensable para evitar la formación de cristales de hielo en el interior de la célula espermática a causa del líquido intracelular que contiene, desplazando o extrayendo agua del citoplasma y así disminuyendo el gradiente osmótico. Es por ello que la adición de crioprotectores desempeña un rol importante en la viabilidad de los espermatozoides en el proceso de criopreservación, reduciendo el impacto del shock térmico producido durante el

proceso de congelación y descongelación (Watson, 2000). Los crioprotectores se pueden clasificar según su permeabilidad en permeables y no permeables.

2.2.3.1. Crioprotectores permeables

La característica principal de este tipo de crioprotector es su bajo peso molecular, por este motivo tiene un ingreso pasivo por medio de la membrana celular. Una vez ocurrido su ingreso al espermatozoide, este tipo de crioprotectores reemplazan el volumen del agua del citoplasma y lo desplaza al medio extracelular previniendo la deshidratación excesiva, formación de cristales de hielo intracelulares y evitando así el colapso de la célula (Medeiros *et al.*, 2002). En este grupo tenemos crioprotectores como el glicerol, etilenglicol, propilenglicol, propanediol (PROH) y dimetilsulfóxido (DMSO) (Boiso, 2001).

El DMSO es un solvente bipolar que posee una acción crioprotectora que se fundamenta en la prevención de la acumulación excesiva de electrolitos, estabiliza la bicapa fosfolípídica de la membrana celular e interviene en el transcurso de solvatación del crioprotector en el agua (Boiso, 2001).

El crioprotector más práctico en la conservación de espermatozoos de mamífero es el glicerol (Hafez, 2002). Su función durante la criopreservación consiste en ingresar de forma pasiva por la membrana espermática a través de los canales de acuaporinas 7, desplazando el agua del citoplasma hacia el medio extracelular, reemplazando osmóticamente el agua intracelular y deshidratando así a la célula. Esto sumado a una velocidad de congelación lenta reduce la producción de cristales intracelulares (Salamon y Maxell, 2000). El papel que cumple extracelularmente radica en aumentar el volumen con líquido que aún no está congelado (proveniente del citoplasma) disminuyendo así la concentración de electrolitos del medio extracelular, reduciendo el estrés osmótico o “efectos de solución” (Mazur, 1985). En síntesis, disminuye el estrés celular en el proceso de congelación actuando por medio del mecanismo “sal buffer” disminuyendo el volumen líquido intracelular que puede congelarse, deshidratando a la célula, pero manteniendo el volumen citoplasmático, previniendo la muerte celular por severa deshidratación.

Con respecto al etilenglicol (EG), éste es utilizado generalmente para el congelamiento del tejido ovárico y embrionario (Medeiros *et al.*, 2002) ejerciendo un menor impacto negativo sobre la motilidad del semen de toro comparado a sus análogos como el glicerol o DMSO, disminuyendo así los daños osmóticos.

El glicerol, utilizado en concentraciones de 2 a 7 % (0.27- 0.96 M), es el crioprotector más usado en alpacas (Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2012); sin embargo, presenta efectos adversos, tóxicos para las células espermáticas a nivel de la membrana plasmática, ya que el glicerol influye sobre la reestructuración de los lípidos y proteínas de membrana afectando su potencial y disminuyendo su capacidad fecundante, incluso puede afectar a la membrana mitocondrial, la membrana acrosomal y la integridad del ADN. Carretero *et al* (2014) expone que el uso del glicerol a un porcentaje igual o mayor al 7% aumenta la toxicidad intracelular aumentando significativamente el porcentaje de espermatozoides con fragmentación de ADN llegando a valores de 93.8 %, esto puede repercutir sobre la tasa de fertilidad, preñez, disminución de calidad embrionaria y aumento de mortalidad embrionaria. A su vez, otros efectos del glicerol es que produce cambios sobre el volumen de los espermatozoides ya que, durante la congelación, la pérdida de agua de esta célula reduce casi a la mitad el volumen de ésta y en el momento en que entra al proceso de descongelación, cuando es suspendido en una solución isotónica, el espermatozoide puede expandir hasta dos veces su volumen (Parks y Graham, 1992).

Por lo mencionado, se han puesto a prueba otros crioprotectores como el etilenglicol a una concentración de 1 y 7 % (0.2 y 1.25 M) (Santiani *et al.*, 2005; Terreros *et al.*, 2012) y dimetil sulfoxido (DMSO) al 7 % (0.98 M) (Terreros *et al.*, 2012) obteniendo efectos inconsistentes para ser considerado óptimo en un protocolo de criopreservación (Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2012).

2.2.3.2. Crioprotectores no permeables

Son de elevado peso molecular por lo que son incapaces de atravesar la membrana celular (Boiso, 2001) y realizan su función crioprotectora en el medio extracelular por inducción osmótica a causa de la veloz deshidratación celular, esto provoca la reducción del agua intracelular previniendo la producción de cristales intracelulares (Medeiros *et al.*, 2002). A su vez, aumenta la viscosidad del medio extracelular cuando desciende la temperatura potenciando su efecto. Los más empleados son los azúcares como la sacarosa, dextrosa, trealosa, glucosa, polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol y dextrano.

Se ha comprobado que los grupos hidroxilo de los azúcares interactúan de forma positiva con los fosfolípidos de la membrana celular, formando puentes de hidrogeno, sustituyendo el agua alrededor de la membrana lo que previene el daño de esta (Boiso, 2001). Si se usan concentraciones elevadas de un crioprotector no permeable se comporta de forma tóxica, promoviendo alteraciones a nivel de la membrana espermática y disminuyendo la movilidad espermática.

La concentración de los crioprotectores dependerá de los componentes que se usarán en la dilución, la velocidad de enfriamiento que se empleará en la muestra, el método utilizado en el proceso de congelación y descongelación. Al ser muchos factores los que influyen sobre el éxito del uso de un criopreservante no se puede optimizar un protocolo estándar.

2.2.4. Proceso de criopreservación seminal

La criopreservación es una técnica en donde se puede congelar tejidos y células, a través del cual se detienen las funciones metabólicas celulares por un tiempo indefinido, dicha técnica se aplica actualmente en el área de la reproducción. Actualmente tiene como finalidad mantener la viabilidad y funcionalidad de todas las estructuras celulares someténdolas a muy bajas temperaturas. Para su correcta aplicación es necesario del uso de crioprotectores, por lo que se han estudiado y

verificado a través de su funcionalidad en base a los fenómenos que causan daño celular y el mecanismo físico y químico de la criopreservación. Se define que el daño celular en la criopreservación se da a causa de dos mecanismos: la producción de hielo en el espacio intracelular y la deshidratación o estrés osmótico. Estos factores están directamente ligados a las velocidades de congelación y descongelación utilizadas durante el proceso de criopreservación (Mazur *et al.*, 1985).

En CSA, diversos trabajos sobre criopreservación han sido ejecutados como se manifiesta en el cuadro 1. Usualmente se trabajan con muestras seminales provenientes de dos orígenes, colección de semen por vagina artificial y muestras provenientes del epidídimo de testículos refrigerados. Una vez criopreservadas las muestras de semen, estas tienden a reducir la motilidad espermática a valores que oscilan hasta 10 % y 20 % de la motilidad total (Valdivia *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005); sin embargo, Bravo *et al.* (2000b) reportó valores superiores, señalando que las diferencias del porcentaje de motilidad post congelado pueden ser a causa de la metodología de la criopreservación utilizada durante el proceso. Rodríguez (2009) señala que, si bien el porcentaje de motilidad desciende a un valor usualmente menor al 20%, la vitalidad espermática puede mantenerse hasta en un 50 % e incluso preservando la integridad acrosomal, indicando que no necesariamente la disminución del porcentaje de motilidad causase la muerte espermática (Morton *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Efecto del uso de diferentes tipos de diluyentes sobre la motilidad total de espermatozoides frescos y postdescongelados de alpaca.

Autor	Año	Especie	Tipo de Muestra	Diluyente/ Crioprotector	Motilidad %	
					Fresco	Congelado
Vaughan <i>et al</i>	2003	Alpaca	Semen	Tris - Citrato - Fructosa	50	10
Santiani <i>et al</i>	2005	Alpaca	Semen	Leche - etilenglicol	72.0	20.0
				Leche - glicerol		15.3
				Tris - glicerol		4.0
				Tris - etilenglicol		1.0
Bravo <i>et al</i>	2000 b	Alpaca	Semen	Citrato - yema	80.00	30 a 40
Valdivia <i>et al</i>	2000	Alpaca	Semen	Glicerol - yema	68.98	15 a 20

2.2.4.1. Proceso de refrigeración

El proceso de refrigeración o enfriamiento consiste en reducir la temperatura de la muestra, que previamente ha pasado por un proceso de dilución, hasta los 5 °C (Salamon y Maxwell, 2000) en un tiempo que puede oscilar desde 0,5 hasta los 180 minutos (Aisen *et al.*, 2000). Reduciendo así, la cinética espermática (Sandoval, 2005) con el fin de lograr una fase de estabilización celular.

Posterior a ello, se adiciona el agente crioprotector a la muestra refrigerada otorgando aun mayor estabilidad celular a la dilución. Se recomienda agregar el crioprotector lentamente y en dos fragmentos, en el cual el segundo contenga el doble de concentración que en comparación a la primera (Sandoval, 2005). En caso se añada el agente de forma brusca o muy rápida ocasionará lesiones en la membrana espermática, el acrosoma y la cola debido a los efectos tóxicos propios del agente pudiendo reducir significativamente su vitalidad (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

En el momento de la refrigeración, en donde la temperatura baja de los 35 °C a los 5 °C, los espermatozoides soportan daños a nivel de la membrana espermática, acrosomal y mitocondrial debido a la exposición a bajas temperaturas y la rapidez con la que ocurren los eventos osmóticos (Bravo *et al.*, 2000). Estos daños pueden ser morfológicos como la rigidez que adquieren las membranas o bioquímicos como la reducción del ejercicio respiratorio, reducción del funcionamiento de las bombas de ATP/ Iones de H⁺ y el daño causado sobre el ADN haciendo predominante en estos casos el transporte pasivo de moléculas (Canorio, 2008). Además, cuando ocurre daño específicamente sobre la membrana acrosomal se liberan las enzimas hidrolíticas, acrosina y hialuronidasa, causando que el espermatozoide pierda su capacidad fecundante. El estudio realizado por García, (2017) menciona que la tasa de preñez en el semen refrigerado de alpaca es 37 %, siendo inferior al 48 % obtenida con semen fresco. Las bajas tasas de preñez con semen refrigerado podrían ser un reflejo de los daños que se producen en esta etapa.

2.2.4.2. Proceso de congelación

Al iniciar la congelación, los espermatozoides refrigerados son sometidos a un cuadro de estrés térmico y osmótico (Watson, 2000). Cuando inicia el proceso de congelación y la temperatura disminuye a -10 °C empieza la producción de hielo fuera de la célula que promueve el aumento de la concentración de solutos convirtiéndolo en un medio hipertónico y a consecuencia de la diferencia de gradiente el agua intracelular sale al medio extracelular deshidratando a la célula (Boiso, 2001). A este periodo en donde empieza la cristalización se le denomina “rango crítico de temperatura” (Salamon y Maxwell, 2000), siendo la etapa donde ocurren los principales eventos de daño espermático.

Usualmente, en el proceso de congelación se exponen las pajuelas de semen a una altura que puede ir de 1 a 10 cm sobre el nitrógeno líquido que se encuentra en proceso de evaporización por un tiempo que puede durar hasta los 15 min, antes de finalmente sumergirlas en el nitrógeno líquido (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). Este método tiene buenos resultados sobre la tasa de supervivencia espermática, a pesar de que manifiesta inconvenientes como la falta de uniformidad en la tasa de enfriamiento entre alícuotas o el hacer irreproducible las condiciones de congelación (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

2.2.4.3. Proceso de descongelación

Durante el proceso de descongelación ocurren cambios osmóticos opuestos a los expresados en la congelación (Mazur, 1985). La rápida fusión del agua ocasiona una diferencia en la concentración de solutos extracelulares, reduciendo su concentración gradualmente causando a su vez que la célula se rehidrate para compensar la diferencia de gradientes entre el medio extra e intracelular, esto en presencia de un crioprotector penetrante cuya salida de la célula no pudo ejecutarse por la rapidez del proceso de descongelación causa la turgencia celular en consecuencia a la entrada de agua (Watson, 1990). Para recuperar las células de

forma más efectiva es necesario el empleo de una descongelación rápida ya que cuando las células vuelven a pasar por el rango crítico de temperatura en el proceso de descongelación, se tiende a la recristalización intracelular que tienen consecuencias letales (Salamon y Maxwell, 2000).

Por otro lado, se ha corroborado que el cambio de temperatura afecta la estabilización molecular de la membrana, fenómeno de transiciones de fase de los lípidos, contribuyendo con la aparición de lesiones. Por lo tanto, las membranas se empiezan a desestabilizar tanto por el cambio de temperatura como por las altas concentraciones salinas durante la congelación y se manifiesta como la degeneración celular postdescongelación al acoplarse nuevamente con los efectos nocivos de la naturaleza térmica y osmótica (Demianowicz y Strezek, 1996).

La tasa de descongelación se ve influenciada por diferentes factores como la temperatura ambiental, el método usado en la congelación y la conductividad térmica (superficie/ volumen del envase que contiene el semen diluido). La tasa de supervivencia en el mejor de los casos puede tener un éxito del 30 al 40 % postdescongelado en CSA (Bravo *et al.*, 1997a) siendo influenciada por la diferencia entre machos, diferencias entre eyaculados del mismo animal, la concentración del crioprotector y la tasa de enfriamiento utilizada.

En la etapa de descongelación se sumergen las pajuelas en baño maría cuyas temperaturas pueden variar desde los 37 °C hasta los 60 °C por un periodo de tiempo que va desde 1 segundo hasta 4 minutos (Aisen *et al.*, 2000). En alpacas usualmente se utilizan métodos de descongelación lenta, 30 a 37 °C por 30 segundos (Valdivia *et al.*, 1999; Aller *et al.*, 2003). Por el contrario, se reporta métodos de descongelación rápida en camellos dromedarios de 60 °C por 10 segundos obteniendo resultados de hasta 82 ± 2 % de integridad de membrana postdescongelado (Malo *et al.*, 2019).

2.2.5. Métodos de criopreservación

Los métodos de criopreservación se clasifican de acuerdo con la velocidad de congelación y descongelación en: congelación lenta/ descongelación lenta, congelación lenta/ descongelación rápida, congelación rápida/ descongelación lenta, congelación rápida/ descongelación rápida y congelación ultrarrápida y vitrificación (Ferré *et al.*, 2017). Durante el proceso de congelación lenta se suele añadir el crioprotector en diferentes etapas y el descenso de la temperatura usualmente se ejecuta por medio de un congelador programable; sin embargo, aún existe el empleo de métodos manuales en donde se utiliza la exposición sobre vapores de nitrógeno líquido (Ávila Portillo *et al.*, 2006). En el caso de la descongelación lenta y rápida también se puede utilizar un congelador programable, pero es más común realizarlo sometiendo las pajuelas a baño maría mayor a una temperatura de 30 °C (Boiso, 2001).

La congelación ultrarrápida implica un proceso de deshidratación celular utilizando altas concentraciones del crioprotectora, comúnmente se utilizan dos agentes crioprotectores penetrantes y uno no penetrante en forma combinada y agregados de forma escalonada, seguido a esto se sumerge en el nitrógeno líquido (Ávila-Portillo *et al.*, 2006). En el caso de la vitrificación, este es un proceso alternativo que no requiere de un congelador programable, en este caso se trabaja con concentraciones más elevadas de crioprotector, en comparación con la congelación ultrarrápida, que al estar expuesto a un descenso de temperatura tan crítico incrementan exponencialmente su viscosidad formando una consistencia sólida en forma semejante al vidrio, de ahí el nombre “vitrificación”, evitando totalmente la formación de hielo (Boiso, 2001).

La sensibilidad de los espermatozoides frente al enfriamiento rápido se considera como criolesiones celulares que causan la pérdida de la permeabilidad selectiva y en consecuencia el daño a la membrana celular, acrosomal y mitocondrial. Provocando así, la pérdida de motilidad y por lo tanto la pérdida de capa de sus competencias fecundantes ya que el espermatozoide no podrá llegar al sitio de fecundación ni tendrá la energía y elementos necesarios para penetrar el

ovocito (Watson *et al.*, 1990). Los métodos de criopreservación aplicado a células espermáticas inducen además a cambios en la organización de lípidos de membrana y también el de las enzimas aledañas. Las criolesiones modifican a su vez la capacidad de fusión de la membrana y las vías de transducción de señales, afectando las respuestas bioquímicas normales y reduciendo la longevidad de las células espermáticas post descongelamiento (Watson., 1995b).

El método más utilizado por los laboratorios para criopreservar semen es la exposición de pajuelas en vapores de nitrógeno líquido por un periodo aproximado de 10 minutos para después ser sumergidos finalmente en el nitrógeno líquido. Este procedimiento si bien es simple y rápido no permiten que las tasas de enfriamiento con las que se trabajen sean uniformes y por tanto resulta difícil repetir las condiciones de enfriamiento y congelación. En cambio, el uso de congeladores programables automáticos permite una verificación y control preciso de la tasa de enfriamiento durante la curva de congelación, permitiendo la repetitividad del proceso (Barbas *et al.*, 2009).

2.2.6. Factores críticos en el proceso de criopreservación

En el transcurso de la congelación y descongelación de los espermatozoides, se modifican la naturaleza biofísica del medio intracelular y ocasionan alteraciones en los lípidos y proteínas celulares que dañan su estructura y fisiología (Barbas *et al.*, 2009), ocasionando una reducción drástica de su vida útil. La magnitud de estas lesiones depende mucho de la constitución de los diluyentes y la tasa de enfriamiento empleada. En alpacas se emplean velocidades moderadas y homogéneas que permiten un apropiado periodo de equilibrio entre los espermatozoides y el medio (Aller *et al.*, 2003), logrando así reducir los efectos adversos del choque térmico en la fase de refrigeración; sin embargo, cuando empieza la congelación de los espermatozoides se produce un daño celular marcado a causa de la formación de cristales de hielo intracelulares (Watson., 1995b) reduciendo la calidad espermática postdescongelamiento.

Por ello se dice que el daño celular provocado a lo largo del proceso de criopreservación básicamente se produce por dos diferentes mecanismos. El primero, por la producción de hielo intracelular y el segundo por la deshidratación celular y el estrés osmótico que trae consigo. Ambos mecanismos están relacionados con la velocidad (Mazur *et al.*, 1985).

Cuando la velocidad de congelación es muy alta o baja ocurre un daño a nivel celular de forma irreversible pudiendo ser letal. A velocidades muy bajas el daño es causado por efecto de la solución y la diferencia de concentración de solutos y electrolitos, deshidratación celular considerable y la reducción no congelada del espacio extracelular. En el caso del uso de velocidades de congelación muy altas, el daño celular es producido por acción de los cristales de hielo intracelulares que lisan a la célula (Barbas *et al.*, 2009). Se menciona que la velocidad de congelamiento óptima sería aquella suficientemente baja para evitar la formación de cristales y suficientemente alta como para reducir el impacto que genera el estrés osmótico, maximizando la supervivencia celular.

El estrés oxidativo, por otro lado, es otro de los factores críticos que repercuten sobre el proceso de criopreservación ya que propicia a la desestabilización de membranas y la pérdida de la función espermática causando una alteración de la función celular de la población sobreviviente (Watson, 2000). Es por ello que es de gran importancia el uso de antioxidantes durante el proceso de criopreservación. Pese a que se haya tenido especial supervisión sobre los factores críticos en el proceso de criopreservación, siempre encontraremos en los resultados una disminución significativa de la cinética espermática, vitalidad e incluso daño en la estructura genética del ADN (Baumber *et al.*, 2003).

2.3. EVALUACIÓN DE SEMEN

El análisis del semen o también llamado espermiograma comprende una secuencia de estudios que evaluarán diferentes funciones celulares. Como resultado de estas pruebas se puede clasificar a la muestra como apta o no apta teniendo como fin su uso en la inseminación artificial ya sea usando la muestra en fresco, refrigerada o criopreservada (Gadea *et al.*, 2005). Las técnicas de evaluación aún dependen del análisis rutinario clásico tanto para su uso práctico como de investigación, a pesar de sus limitaciones para predecir la tasa de fertilidad al que podría llegar la muestra. Pese a ello, el análisis de otros parámetros de evaluación hace posible definir el estado celular actual y permite correlacionarlo con la posible tasa de fertilidad y la calidad de la muestra.

En el transcurso del tiempo ha sido posible el uso y el desarrollo de sistemas automatizados de análisis por imágenes CASA (por sus siglas en inglés, Computer Assisted Sperm Analysis) y sistemas que utilizan la citometría de flujo como fundamento. Estos sistemas brindan un mayor número de datos para evaluar distintos aspectos y cualidades espermáticas permitiendo el entendimiento respecto a la calidad de la muestra después de la congelación y determinando el rendimiento de los machos para su empleo en un programa de inseminación artificial. El conjunto de características macroscópicas y microscópicas del semen nos permite un diagnóstico relevante y concluyente sobre la calidad seminal de la muestra.

2.3.1. Evaluación macroscópica

El estudio macroscópico comprende lo observable a simple vista en la muestra de semen, se lleva a cabo en el laboratorio evitando el contacto directo de la muestra con la luz solar. Entre las características macroscópicas a evaluar se encuentran: el volumen, color, pH y densidad o consistencia (Bustinza, 2001).

CONSISTENCIA

El semen de los camélidos presenta gran viscosidad/ filancia a causa de la alta concentración de glicosaminoglicanos, como por ejemplo el quetarán sulfato, que provienen de las secreciones de las glándulas bulbouretrales (González, 2004), también presenta proteínas como la presencia de la mucina 5B que forman parte del plasma seminal que a su vez puede representar hasta un 85 % del volumen total del eyaculado (Rateb, 2016). La filancia dificulta el movimiento de los espermatozoides que quedan atrapados en el eyaculado ocasionando que presenten principalmente motilidad oscilatoria y bajos porcentajes de motilidad progresiva. Sumar (1994) menciona que la consistencia del semen es dependiente de la relación que existe entre el plasma celular y su estructura, concluyendo que la principal característica de este es consistencia viscosa y pegajosa difícil de manipular.

COLOR

El color de los eyaculados puede variar normalmente entre blanco lechoso y blanco cristalino, esto depende directamente de la concentración espermática de la muestra y el grado de contaminación por orina, sangre o algún elemento que le da un color más opaco (Fernández y Calderón.,1965).

VOLUMEN

El volumen se mide con ayuda de un tubo colector graduado y el rango promedio puede variar según la etapa fisiológica del macho, edad, raza, alimentación, método de colección empleado, ausencia o presencia de hembras en el mismo corral y frecuencia de colección (Sumar 1994). El método de colecta también puede influir sobre el volumen del eyaculado. La colección por vagina artificial generalmente obtiene un promedio de 0.4 a 3.5 mL mientras que mediante el método de electroeyaculación 1 ± 0.47 mL (Bravo *et al.*,2000).

El método de colección por medio de la vagina artificial puede llegar incluso a volúmenes de 10 a 12.5 mL (Bustinza *et al.*, 2001); sin embargo, se debe hacer

énfasis en que el 88.5 % de su composición podría estar representado por plasma seminal. También se debe tomar en cuenta que no se excluye la idea de que el eyaculado de las alpacas se realice en un proceso continuo.

pH

El pH del eyaculado tiene gran impacto sobre la viabilidad de las células ya que del nivel de pH dependen funciones metabólicas y genéticas. El pH promedio de semen es de 7.7, en un rango que puede variar desde los 7.1 a 8.3 (Huanca *et al.*, 2011), el nivel ligeramente alcalino al que se encuentra permite la actividad óptima enzimática de las células espermáticas y por lo tanto una tasa metabólica elevada; sin embargo, si tiende más de lo normal a alcalinidad se reduce el índice metabólico celular por ello se le atribuye gran importancia a la dilución sobre un medio que resista los cambios de pH para mantener la viabilidad de la muestra (Sumar, 1991).

Por otra parte, es válido resaltar que durante el proceso de criopreservación, los espermatozoides y bacterias inmersas en la muestra crean metabolitos que podrían disminuir el pH afectando la motilidad y metabolismo celular de forma negativa. La producción de ácido láctico a consecuencia del metabolismo de la glucosa es el principal responsable de la reducción del pH, es por ello que es usado también como indicio de la calidad del semen (Huanca *et al.*, 2011).

2.3.2. Evaluación microscópica

Es el método más conciso para la evaluación seminal ya que permite analizar con gran exactitud las características del eyaculado a nivel celular permitiendo predecir la fertilidad de la muestra. Comprende desde la valoración de la motilidad, viabilidad, morfología y la concentración de espermatozoides en la muestra.

CONCENTRACION ESPERMÁTICA

Es uno de los parámetros más importantes de evaluación de la fertilidad porque permite conocer la capacidad de producción de espermatozoides del macho

y calcular el número de dosis de producción por eyaculado para su posterior uso en inseminación artificial. Se expresa en el número de espermatozoides por unidad de volumen, ya sea mm^3 o cm^3 . Su medición es realizada comúnmente a través de un conteo celular haciendo el uso de cámaras de conteo como la de Neubauer; sin embargo, la alta viscosidad del plasma seminal dificulta su extensión y adecuada manipulación en la cámara (Rodríguez *et al.*, 2008). Antes de iniciar el recuento de espermatozoides, la muestra de semen se diluye bajo condiciones ya estandarizadas, para el cálculo se tiene en cuenta la superficie y altura de la cámara, así como el grado de dilución a la que fue sometida la muestra y es con ayuda de una ecuación aritmética que podemos conocer la concentración de espermatozoides/ mL.

La cámara de Neubauer es una placa de cristal de 30 x 70 mm de área y unos 4 mm de profundidad o grosor, es una cámara simple y ahí se ejecuta el conteo de espermatozoides. La porción central de la placa está fraccionada en 3 partes y a su vez la zona céntrica de esta se encuentra dibujada una matriz cuadrangular. La cámara de Neubauer contiene una doble cámara de 3 mm x 3 mm de lado cada una, presentando 2 áreas de conteo y se subdivide en 9 cuadrados de 1 mm por cada lado. Para poder evaluar se debe cargar la cámara con la muestra diluida cubriendo todos los bordes y cubriendo con el cubreobjetos y dejando estabilizar tres minutos para permitir que los espermatozoides se ubiquen en una misma zona e iniciar el conteo.

Los estudios realizados sobre la concentración espermática en camélidos manifiestan distintos valores de concentración encontrados, posiblemente debido a la diferencia entre individuos y métodos de colección. Aller *et al.*, (2003) manifiesta en sus resultados que por la técnica de VA existe un promedio de 60 a 80 millones de espermatozoides por mililitro, lo cual es muy variable considerando que se utilizó un solo método de colección. sin embargo, en publicaciones anteriores como las descritas por Bravo (2002) indica que la concentración espermática en alpacas puede llegar a valores que oscilan desde 80 a 120 millones de espermatozoides por mililitro.

También se han reportado otros valores por medio del uso de otros métodos de colección como 107 y 225 millones de espermatozoides por mL utilizando

fundas vaginales y de 48 millones espermatozoides por mL en el caso de electroeyaculación (Fernández Baca y Calderón, 1965).

MOTILIDAD ESPERMÁTICA

El semen de alpaca obtenido por vagina artificial no muestra una motilidad masal con las mismas características que en otras especies como la presencia de torbellinos y turbulencias (Sumar, 1991). Incluso, por la naturaleza viscosa del plasma seminal, la motilidad individual se observa como un desplazamiento muy lento y en su mayoría como movimientos oscilatorios en sí mismos.

La motilidad espermática es de tipo oscilante y pausado (Sumar, 1991), el porcentaje promedio encontrado en camélidos por método de colección de vagina artificial se halla entre el 54 al 60 % de espermatozoides móviles (Aller *et al.*, 2003). Por otro lado, se registran valores similares obtenidos por medio de la colección por electroeyaculación resultando del 50 al 60 % espermatozoides móviles (Fernández Baca *et al.*, 1965).

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

Los espermatozoides anormales se clasifican según la presencia de cabeza, gota citoplasmática y cola anormal (Bravo, 1997a). En aquellas células que presentan cabezas anormales se pueden observar defectos de asimetría, adelgazamiento, macrocabezas, microcabezas, cabezas de forma piriforme y cabezas dobles. La gota citoplasmática tiene su origen en el cuello del espermatozoide durante la espermiogénesis y se pierde durante la maduración en el epidídimo por lo cual su presencia es una característica anormal (Sumar, 1983). Así mismo, las anomalías de la cola pueden ser colas alargadas, dobladas, rotas, truncadas, filiformes, de piezas intermedias dobles, enroscadas e incluso dobles. La mayoría de los espermatozoides con alguna anomalía en la cola serán inmóviles o se desplazarán de forma anormal.

Todas las muestras tienen un porcentaje de anomalías, lo esperado es que se encuentren en un rango de 8 a 10 % ya que en este nivel no tendrá efectos

desfavorables sobre la fertilidad de la muestra, si las anomalías superan el 25 % del total eyaculado, se puede predecir que la fertilidad es reducida (Sumar, 1983). Las anomalías espermáticas también se pueden clasificar en primarias (provenientes de alteraciones testiculares) y secundarias (provenientes de disturbios en los conductos especialmente del epidídimo o un mal manejo de la muestra al momento de realizar el frotis) (Bustinza, 2001).

El promedio del porcentaje de anomalías encontrado en alpacas difiere según diferentes autores. Palomito (1962) encontró un 11.65 % de anomalías, entre ellas las más frecuentes de forma decreciente fueron cabezas solas, colas retorcidas, colas enrolladas, colas rotas, cabezas alargadas y microcabezas. Asimismo, Sumar (1983) realizó una evaluación en donde los resultados expresaron 41,23 % de anomalías, aquellas de mayor frecuencia fueron: cabezas solas, microcabezas, colas rotas, pieza intermedia engrosada, entre otras.

TEST DE HOST (TEST HIPOSMÓTICO)

El método consiste en la observación de esta alteración morfológica, incremento de tamaño y flagelos curvos o enrollados, una vez inmersos en el medio hiposmótico, ya que el espermatozoide tratará de restaurar el equilibrio permitiendo el ingreso del agua del medio extracelular al intracelular aumentando así el volumen celular (Correa y Zavos, 1994), lo cual se evidencia con la torsión de la cola en diferentes grados. Las células que tienen la membrana funcionalmente dañada no experimentarán esos cambios morfológicos ya que no responden al entorno hiposmótico, considerando positivo cuando se observa la cola tomar la forma espiral y ascender dentro de sí misma.

La fecundación no puede llevarse a cabo si la membrana espermática está bioquímicamente inactiva (falla en la acción de transportadores y canales de iones específicos que permiten la permeabilidad molecular) a pesar de que conserva su estructura morfológica intacta, ya que se necesita que esta sea íntegra para eventos como la capacitación espermática, reacción acrosomal y la ligación del espermatozoide a la superficie del oocito, por ello es un indicador preciso de la

capacidad fertilizante de los espermatozoides y de la vitalidad (González *et al.*, 2011).

En alpacas, se han reportado estudios de evaluación sobre la prueba de endosmosis en donde se determina que esta especie tiene poblaciones de espermatozoides inmóviles con membranas completamente funcionales e íntegras (Vázquez *et al.*, 2012; Zirena *et al.*, 2015). En camélidos se ha llegado a obtener porcentajes superiores al 73% como indica los estudios realizados por Pacheco *et al* (2014) utilizando una concentración en la solución hiposmótica en 50 mOsmol. A su vez, Giuliano *et al.*, (2010) obtuvo 62 % de respuesta endosmótica a una concentración de 100 mOsmol.

2.3.3. Sistema de análisis asistido por computadora

El análisis de espermatozoides asistido por computadora o por sus siglas en inglés CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), es un sistema que puede ser automático como semiautomático. Están diseñados para brindar información precisa sobre los valores descriptivos en una muestra seminal como la concentración, morfología, viabilidad y la dinámica del movimiento celular para ejecutar así el análisis estadístico de esos valores precisos (Shojaei *et al.*, 2012). Este sistema se fundamenta en el procesamiento digital de una secuencia de imágenes de células espermáticas capturadas por una cámara de video incorporada en un microscopio de fases. Una vez obtenida la información, la computadora realiza el procesamiento de imágenes y el estadístico. El uso de estos equipos se está haciendo cada vez más frecuente en la práctica de evaluación seminal, permitiendo evaluar de forma objetiva diferentes parámetros, sobre todo el de la motilidad espermática.

Las medidas cinéticas arrojan parámetros espermáticos que se basan en la sucesión de diferentes posiciones que adopta el centroide de la cabeza del espermatozoide a través del tiempo. Es así que gracias al uso de la geometría de las trayectorias que se puede determinar las velocidades y patrones de movimiento (Bernardi *et al.*, 2011). El día de hoy existe una variedad de sistemas vigentes en el

mercado cuyas diferencias entre sí pueden variar respecto a los sistemas ópticos, técnicas de captura de imagen, algoritmos utilizados en la construcción de las trayectorias espermáticas, determinación de medidas cinéticas, reconocimiento espermático e incluso el sistema de análisis de los datos obtenidos.

Si bien el uso del sistema CASA ofrece numerosas ventajas también puede presentar algunas dificultades. Una de las principales desventajas es la inexistencia de una estandarización y optimización de equipos y procedimientos utilizados en el análisis, ya que cada laboratorio trabaja con diversos equipos que tienen características técnicas diferentes unos de otros, por ello a veces las evaluaciones para un mismo parámetro son muy divergentes entre sí.

2.3.4 Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es un poderoso instrumento analítico que mezcla las cualidades de aumento óptico de la microscopía con el empleo de la fluorescencia celular. Esta última es un evento que comprende la absorción y la emisión de una diminuta serie de ondas de luz mediante una molécula fluorescente nombrada fluorocromo. La técnica se desarrolla con el microscopio óptico acoplado de una fuente de luz intensa, filtros específicos y un medio de fluorescencia añadido a la muestra a evaluar (Ormachea y Villazón, 2017).

Los análisis de fluorescencia en la biotecnología reproductiva se han fundamentado en la determinación de la proporción de espermatozoides que pueden o no presentar integridad de membrana haciendo referencia a la función de permeabilidad en células vivas y muertas. Durante el proceso de criopreservación espermática, el estrés térmico afecta las membranas espermáticas (plasmática, acrosomal y mitocondrial) ocasionando cambios en su organización, fluidez, permeabilidad y composición lipídica que a su vez pueden tener consecuencias letales para la célula comprometiendo su supervivencia (Thomas *et al.*, 1998).

Actualmente, la microscopía de fluorescencia es una de las técnicas precisas más empleadas ya que nos permite evaluar tanto la viabilidad como la integridad

acrosomal por medio del uso de indicadores fluorescentes (Ormachea y Villazón, 2017). Existen diferentes tipos de sondas fluorescentes que en asociación permiten evaluar diferentes parámetros que son cruciales para determinar la actividad fecundante del espermatozoide. El yoduro de propidio (PI) se unifica al ADN de las células que tienen dañada la membrana (Graham *et al.*, 1990) siendo usualmente empleada para evaluar la viabilidad de los espermatozoides en conjunto con SYBR-14 que es un fluorocromo que es capaz de penetrar todas las membranas permitiendo identificar la población de células viables en la muestra. En esta doble tinción, el ADN de los espermatozoides viables emite fluorescencia verde, mientras que aquellos con membrana plasmática dañada emiten fluorescencia roja. Con respecto a la integridad de la membrana acrosomal, se utilizan marcadores glicoproteicos como las lectinas que reconocen y se unen a una secuencia de carbohidratos específico reconociendo terminales de manosa, glucosa y glucosamina de conjugados localizados en la matriz acrosomal, entre las más utilizadas está el PSA (aglutinina del guisante *Pisum sativum*) y PNA (aglutinina del mani *Arachis hypogaea*) que se emplean en asociación con Isiocinato de fluoresceína (FITC) marcando el acrosoma de los espermatozoides dañados en amarillo y verde (Graham *et al.*, 1990).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el laboratorio de Reproducción Animal de la Estación IVITA Marangani – FMV – UNMSM (localizado a una altitud de 3650 m.s.n.m, y 14° 21' 25" latitud Sur) con sede en el Distrito de Marangani, Provincia de Canchis, Departamento de Cusco entre los meses de enero a marzo del 2022.

3.2. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL EXPERIMENTAL

Se utilizaron 4 alpacas macho Huacaya, de 5 años en promedio de edad. Los animales se mantuvieron alimentados con pasturas cultivadas (Trebol-Raygras) a lo largo del estudio; asimismo, los machos fueron parte del grupo selecto de reproductores. Se colectó semen de los animales por el método de vagina artificial obteniendo 4 eyaculados por día en 11 repeticiones (intervalos de 3 días por cada repetición) procesando un total de 44 eyaculados. La colección de semen se realizó en el fundo San Marcos - IVITA Marangani. Todos los reactivos que fueron usados procedieron de la casa comercial Merck Peruana S.A. (Sigma-Aldrich).

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

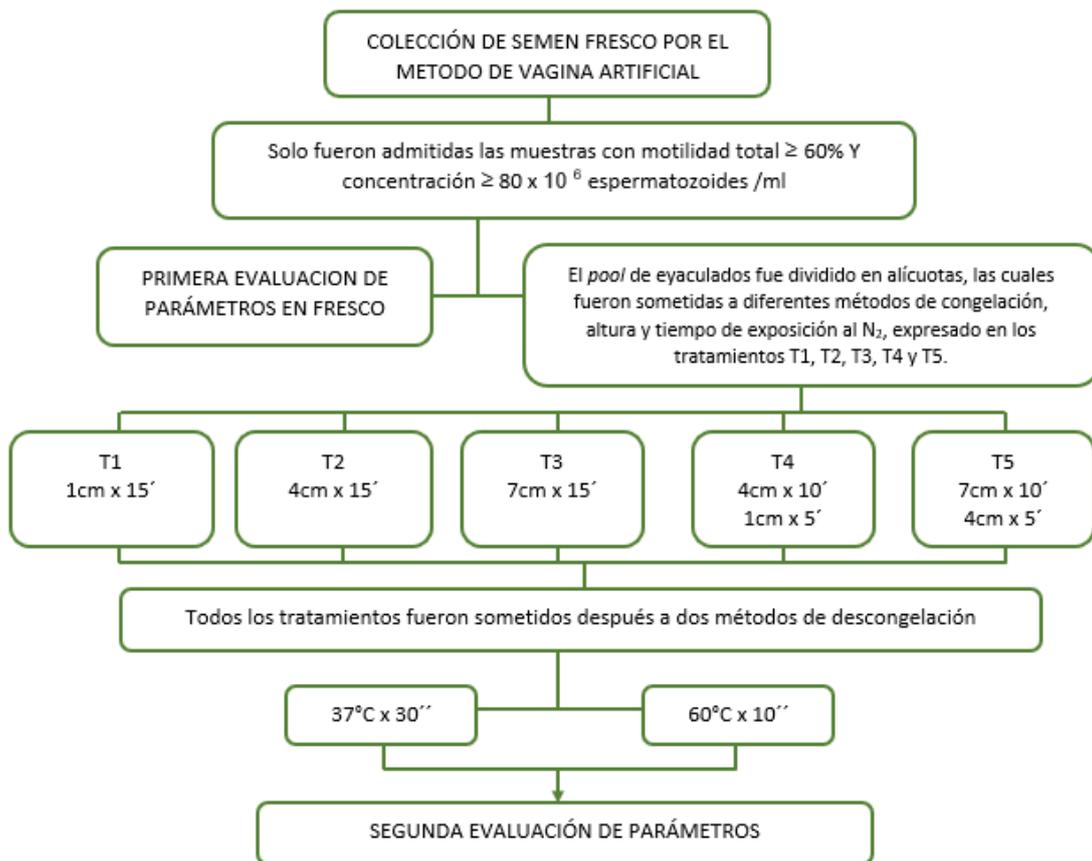


Figura 1. Flujograma de procedimientos experimentales.

DESCRIPCIÓN DE LOS METODOS DE CONGELACIÓN

Los eyaculados obtenidos fueron incorporadas en un solo tubo (*pool*) con el fin de homogeneizar las muestras y de esta manera presenten características similares, el pool obtenido se dividió en cinco alícuotas. Seguidamente cada una de las alícuotas fue sometida a diferentes métodos de congelación descritos, con 11 repeticiones (una cada 3 días).

- T1 = 1 cm por 15 min
- T2 = 4 cm por 15 min
- T3 = 7 cm por 15 min
- T4 = 4 cm por 10 min; 1cm por 5 min

- T5 =7 cm por 10 min; 4 cm por 5min

Se tomó dos pajillas por método de congelación y se descongeló en Baño María por dos métodos diferentes.

- 37 °C por 60 segundos
- 60 °C por 10 segundos

3.4. PREPARACIÓN DE DILUYENTES DE CONSERVACIÓN

Según el método descrito por García (2014), aplicado en ovinos, se empleó un dilutor en base de tris, fructosa y ácido cítrico que consiste en 2 fracciones (A y B). La **fracción A** fue hecha en base a 3.03 g de Tris, 1.70 g de ácido cítrico, 1.25 g de fructosa, 10 mg de tilosina, 50 mg de gentamicina, 180 mg de lincomicina y 20 mL de yema de huevo fresco de gallina, y se completó hasta 100 mL con agua destilada. La **fracción B** del dilutor se preparó en base a la solución anterior adicionándole 10 mL de glicerol completando hasta 100 mL.

3.5. COLECCIÓN DE SEMEN Y TRATAMIENTO DE SEMEN FRESCO

La colecta se ejecutó durante los meses de enero y marzo del 2022. Las muestras fueron adquiridas por el método de la vagina artificial modificada (Bravo *et al.*, 1997a), que consta de un tubo de PVC de 20 cm de largo por 4 cm de diámetro, con funda de látex recta y cónica que termina adosada con un tubo colector graduado. La VA contuvo aire a presión y agua caliente (50-55 °C) que se agregó por una válvula canular a fin de que internamente se tenga entre 38 a 40 °C. La VA se cubrió con una frazadilla eléctrica para mantener una temperatura constante. En la colección de semen, la VA preparada con sus accesorios se acopló a un maniquí de grupa para alpaca y la colección de semen fue una dos veces por semana, se realizó un total de 20 colecciones de las cuales 9 fueron descartadas al no cumplir las condiciones apropiadas y 11 fueron tomadas como colecciones efectivas.

Las muestras obtenidas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su evaluación donde se conservaron en Baño María a 37 °C y fueron desgelificadas, para reducir la viscosidad seminal, mediante acción mecánica la cual consistió en realizar el pasaje de la muestra por una aguja, con la punta previamente limada, número 18 acoplada a una jeringa de 5 mL, la muestra fue aspirada y expulsada suavemente por las paredes del tubo (Bérgamo *et al.*, 2012). Después de ello, se procedió a evaluar: motilidad total (MT) y concentración de cada muestra, aceptando solo aquellas que cumplan los siguientes requisitos: motilidad $\geq 60\%$ y concentración de 80×10^6 espermatozoides/mL (García y Alarcón., 2019). Seguido, los eyaculados fueron incorporados en un solo tubo (*pool*), a partir del cual se realizó la primera evaluación de parámetros seminales (Motilidad Total, Motilidad Progresiva, Vitalidad e integridad de membrana plasmática) como grupo control. Posteriormente, se utilizaron las muestras para aplicar los tratamientos experimentales.

CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

Fue determinado con cámara de Neubauer. En primer lugar, para poder hacer uso de la cámara se humedece el borde del cubreobjetos y se adhiere a la cámara con una ligera presión, dejando libres las escotaduras para llenar la zona de la retícula por capilaridad. Se toma una muestra del semen previamente desgelificado que se diluye con agua destilada en relación 1:20, enseguida pasa a homogenizarse de 30 a 60 segundos de forma manual. Seguido a ello, se toma 10 μL de la muestra diluida colocando el extremo de la punta de la micropipeta en el borde del cubreobjetos y se espera que la cámara se cargue con la muestra por capilaridad. El líquido no debe exceder los lados y no deben quedar espacios vacíos en la cámara. Se dejó reposar durante 5 minutos a la muestra para que se estabilice. El recuento se llevó a cabo en 5 cuadrados de la cámara a una visión de 400x en un microscopio, la concentración final es el producto de la multiplicación de número total de espermatozoides contados, números de cuadrados contados, dilución y 100000 teniendo como unidad la cantidad de espermatozoides por mililitro (espermatozoides /mL) (García y Pacheco, 2022).

MOTILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN FRESCO

Para poder evaluar la motilidad se desgelificó la muestra mediante la acción mecánica. Posterior a ello, se tomó 10 µl de muestra desgelificada en una lámina portaobjetos precalentada en una placa térmica (37 °C), cubriéndola con una lámina cubreobjetos la cual fue observada a 400X en un microscopio de contraste de fase (ZEISS Axio Scope A1), en el cual se calificó a los espermatozoides con movimientos oscilatorios sobre si mismos, movimientos progresivos y el porcentaje de movimientos espermáticos totales (Garnica *et al.*, 1993).

3.6. REFRIGERACIÓN Y CONGELACIÓN DE SEMEN USANDO DIFERENTES METODOS

Se dividió el *pool* en cinco alícuotas que se diluyeron con el fragmento (A) del dilutor a 35 °C en dilución (1:1). El enfriamiento se realizó desde los 35 °C hasta los 5 °C lentamente, introduciendo los tubos en un recipiente con 10 mL de agua a 35 °C, se dispuso en una nevera que conservó una temperatura de 5 °C y mantuvo las muestras dentro por un periodo de 120 minutos a una velocidad de descenso térmico en promedio de 0.25 °C por cada minuto.

Antes de iniciar el proceso de congelamiento se añadió el dilutor con el fragmento B (glicerol adicional) en una dilución de (1:1) en cada uno de los tratamientos dejándolo estabilizar por 20 minutos obteniéndose una concentración final de 5 % de glicerol. Seguido a esto, las distintas alícuotas refrigeradas fueron envasadas manualmente en pajillas de 0.25 mL y selladas con alcohol polivinílico. A continuación las pajillas fueron expuestas y congeladas de manera simultánea con vapor de nitrógeno líquido (LN2) utilizando cinco cajas de poliestireno expandido de

28 cm de alto x 32 cm de ancho x 41 cm de largo, y rejillas que fueron condicionadas por cada tratamiento de la siguiente manera: T1: 1 cm por 15 min; T2: 4 cm por 15 min; T3: 7 cm por 15 min; T4: 4 cm por 10 min luego bajar a 1 cm por 5 min; T5: 7 cm por 10 min luego bajar a 4 cm por 5 min del nivel del LN2, finalmente sumergir en el nitrógeno líquido a -196°C hasta el momento del descongelado.

3.7. DESCONGELACIÓN DE PAJILLAS USANDO DOS METODOS DIFERENTES

Se tomará dos pajillas por cada tratamiento siendo sometida cada una a diferentes temperaturas y tiempo de descongelación; 37 °C por 30 segundos y 60 °C por 10 segundos. Se evaluará la motilidad total, motilidad progresiva, viabilidad espermática e integridad de membrana.

3.8. ANÁLISIS SEMINAL

El análisis se efectuó en el semen fresco y descongelado evaluándose los siguientes parámetros:

3.8.1. Motilidad total (MT, %) y Motilidad progresiva (MP, %)

Se midieron ambos parámetros mediante el sistema CASA (Andro Vision® Alemania). Las muestras se diluyeron en una solución de TGC (base de tris, glucosa y ácido cítrico) a una concentración final del 50×10^6 espermatozoides/mL tomándose 10µL de la suspensión, se colocó en una lámina portaobjetos precalentada en una placa térmica (37 °C), cubriéndola con una lámina cubreobjetos (22x22 mm) y se capturaron 3 campos por cada muestra observándose a 400X en un microscopio de contraste de fase (ZEISS Axio Scope A1).

3.8.2. Viabilidad espermática mediante microscopia de fluorescencia

Se determinaron los espermatozoides vivos y muertos utilizando la técnica descrita por Juárez y Santiani (2019). Se empleó el fluorocromo SYBR-14 en conjunto con Ioduro de Propidio (PI). Se tomó 100 μL de muestra y se realizaron dos lavados por centrifugación con PBS a 600g durante 8 min. Se procedió a eliminar el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 100 μL de PBS. Para este procedimiento se utilizaron los insumos provenientes del kit LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (L-7011, Molecular Probes, Inc.) que contiene el Fluorocromo SYBR-14, el cual emitió fluorescencia verde indicando que la membrana plasmática de los espermatozoides esta íntegra y por tanto el se encuentran viables, mientras que el PI indica el daño de la membrana plasmática por tanto los espermatozoides han sufrido un daño letal haciéndolos inviables.

Para preparar la solución stock de SYBR-14 se tuvo que diluir 100 μL del SYBR-14 (1 mM) en 4900 μL de DMSO llegando así a una concentración de 20 μM mientras que la solución de PI fue de 2.4 mM. Posteriormente se homogeneizó para preparar alícuotas de 50 μL y se mantuvo en congelación para finalmente tomar 100 μL de la muestra y agregar 0.5 μL de la solución stock incubándola por 10 minutos a 38°C así se obtuvo una concentración final de 100 nM, después se adicionaron 0.5 μL de solución stock de IP para llegar a una concentración final de 12 μM y se incubó por 10 minutos más.

La valoración del porcentaje de células vivas y muertas se realizó mediante un microscopia de fluorescencia (ZEISS Axio Scope A1) mediante el uso de luz transmitida por una lámpara halógena HAL 100 12v 100w y a su vez, una luz reflejada HBO 100 (fluorescencia) que permite excitar a los fluorocromos y percibir la luminosidad a una longitud de onda de emisión de 488 nm, la proporción de células vivas se estimará con SYBR-14 identificando a todos los espermatozoides de la muestra, dicho fluorocromo emite en la longitud de onda de 516 nm. La mortalidad celular se midió con el fluorocromo PI, cuya función consiste en penetrar en las células con daño de la membrana, por tanto, los núcleos de los espermatozoides muertos emitirán una longitud de onda de 617 nm. Al análisis fue

posible identificar las células que estaban cursando el proceso de muerte celular ya que estas se tiñeron con ambos fluorocromos.

3.8.3. Análisis de la integridad de la membrana plasmática

Se evaluó mediante la prueba de endosmosis (*Hypoosmotic- Swelling test*, HOST). Para lo cual, se incubaron 50 μL de la muestra en 450 μL de solución hipoosmótica esperando obtener una concentración de 100 mOsm (citrate de sodio 0.490 gr + fructosa 0.900 gr + 2H₂O c.s.p. 100 mL) (Pacheco *et al.*, 2014) durante 60 minutos a 37 °C y luego se observó 10 μL de la muestra en un microscopio óptico con objetivo (40 X). Se contabilizaron 200 espermatozoides en muchos campos en donde los espermatozoides vivos con colas dobladas e hinchadas fueron reconocidos como espermatozoides positivos a HOST ya que indicaron que la membrana celular está intacta. Los resultados se expresaron en porcentajes.

3.8.4. Análisis estadístico

Se realizó el procesamiento de los datos utilizando un modelo lineal general (ANOVA) del SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.), es un diseño factorial, teniendo como factor cinco métodos de congelación (T1, T2, T3, T4 Y T5) y dos métodos de descongelación (37 °C por 30 segundos; 60 °C por 10 segundos), así como las interacciones entre ellos. Se ejecutó 11 repeticiones por unidad experimental. Cuando las diferencias resultaron significativas ($p < 0.05$), se realizó la prueba de Tukey de comparación de medias *a posteriori*. La normalidad y homogeneidad de varianza de los parámetros espermáticos se comprobaron con el test de Kolmogorv-Smirnov y Levene. Las variables dependientes que no cumplieron con los supuestos de igualdad de varianza y distribución normal fueron sometidas a una transformación arcoseno, antes del análisis estadístico.

IV. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN EN FRESCO

Los resultados incluyen los criterios utilizados previos a ser refrigerados (Motilidad total ≥ 60 % y una concentración $\geq 80 \times 10^6$ espermatozoides/ mL). Respecto al tiempo de monta, el promedio alcanzado durante las 44 colecciones fue de 33.3 ± 1.1 minutos. La concentración espermática obtuvo un promedio de 141.3 ± 9.3 millones de espermatozoides por cada mL, el cual se encuentra fuera de los criterios de descarte siendo todas las colectas muestras admisibles. El volumen promedio de los eyaculados obtenidos durante las colectas fue 1.95 ± 0.1 mL.

En relación con el porcentaje de parámetros cinemáticos, los resultados manifiestan un valor promedio de 67.0 ± 2.1 % en la MT y 4.7 ± 0.2 % en la MP. Respecto al porcentaje de espermatozoides vivos mediante el uso de la microscopia de fluorescencia se obtuvo un 71.6 ± 2.3 % en promedio, mientras que el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática íntegra fue de 61.7 ± 3.4 % en promedio que resulta ser indicativo de la viabilidad de las muestras en fresco tal como se expresa en el cuadro 2.

Cuadro 2. Características espermáticas de semen fresco de alpaca obtenidas con vagina artificial.

Parámetros de calidad espermática	Promedio \pm DE	Valor Mínimo	Valor Máximo
Tiempo de monta (min)	33.35 ± 10.1	17.5	53
Concentración Espermática (mill esp/ mL)	141.3 ± 31.4	86.0	206.0
Volumen de Eyaculado (mL)	1.95 ± 1.1	0.2	4.5
Viabilidad (%)	71.6 ± 7.1	63.5	89.5

Motilidad Total Espermática (%)	67.0 ± 6.5	60.3	83.0
Motilidad Progresiva Espermática (%)	4.7 ± 0.9	3.0	6.0
Integridad de la membrana plasmática (%)	61.7 ± 10.8	45.3	75.0

4.2. EFECTO DE DIFERENTES METODOS DE CONGELACIÓN EN LA CRIOPRESERVACION ESPERMÁTICA EN ALPACAS

Como se indica en el cuadro 3, todos los parámetros espermáticos evaluados fueron inferiores durante la postdescongelación comparado con la evaluación en fresco, al cotejar los resultados de viabilidad e integridad funcional de la membrana tras el proceso descongelación, se observó que aquellos espermatozoides congelados en T1 y T4 presentaron valores menores a los demás tratamientos, con diferencia significativa del T5 ($p > 0.05$).

El parámetro cinético de MT (motilidad total) presenta valores significativamente superiores a aquellos congelados en tratamiento T5 en comparación con los demás tratamientos.

Cuadro 3. Efecto de los diferentes tratamientos de congelación T1 1 cm 15 min, T2 4 cm 15 min, T3 7 cm 15 min, T4 4 cm 10 min y 1 cm 5 min y T5 7 cm 10 min y 4 cm 5 min sobre los parámetros de calidad espermática postdescongelación (Promedio ± DE) en alpacas.

Métodos de congelación	Viabilidad espermática (%)	Motilidad Total espermática (%)	Motilidad Progresiva espermática (%)	Integridad de la membrana plasmática (%)
	Promedio ± DE	Promedio ± DE	Promedio ± DE	Promedio ± DE
T1	22.01 ± 10.14 ^a	15.77 ± 7.57 ^a	6.10 ± 4.90	13.93 ± 5.91 ^a
T2	26.17 ± 6.95 ^{ab}	18.11 ± 6.33 ^a	7.18 ± 3.58	20.25 ± 5.81 ^{ab}
T3	24.46 ± 9.59 ^{ab}	18.26 ± 6.80 ^a	5.78 ± 2.40	19.88 ± 7.33 ^{ab}
T4	20.36 ± 11.41 ^a	19.74 ± 6.57 ^a	6.72 ± 3.33	15.25 ± 9.55 ^a
T5	30.44 ± 10.27 ^b	28.20 ± 12.82 ^b	7.13 ± 4.01	27.49 ± 9.75 ^b

^{abcd} Diferentes letras representan diferencia significativa ($p < 0.05$)

4.3. EFECTO DE DIFERENTES MÉTODOS DE DESCONGELACIÓN EN LA CRIOPRESERVACION DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACA

En el cuadro 4 se puede observar que los resultados más favorables ($p < 0.05$) pertenecieron a la descongelación a 37 °C en 30 segundos sobre los descongelados a 60 °C en 10 segundos.

Cuadro 4. Efecto de dos métodos diferentes de descongelación (37 °C y 60 °C) en los parámetros de calidad espermática (Promedio \pm DE).

Métodos de descongelación	Viabilidad espermática (%)	Motilidad Total espermática (%)	Motilidad Progresiva espermática (%)	Integridad de la membrana plasmática (%)
	Promedio \pm DE	Promedio \pm DE	Promedio \pm DE	Promedio \pm DE
37 °C/ 30s	29.51 \pm 8.65 ^a	22.99 \pm 9.14 ^a	8.14 \pm 5.69 ^a	23.36 \pm 7.94 ^a
60 °C /10s	19.87 \pm 8.68 ^b	17.04 \pm 8.51 ^b	5.02 \pm 4.44 ^b	15.36 \pm 9.97 ^b

^{abcd} Diferentes letras representan diferencia significativa ($p < 0.05$)

V. DISCUSIÓN

Las características seminales evaluadas en las muestras frescas de alpacas Huacaya pertenecientes a este estudio, en donde se utilizó la colecta por método de vagina artificial (VA) en maniquí de grupa, manifiestan parámetros similares a otros estudios en llamas (Aller *et al.*, 2003) y alpacas (González *et al.*, 2011; Bravo y Alarcón, 2013; García *et al.*, 2017; García *et al.*, 2019; García *et al.*, 2020) colectado por poscópula o VA; no obstante, los resultados de concentración, volumen, motilidad total, porcentaje de viabilidad y porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática integra en este estudio lograron ser superiores que en muestras colectadas mediante VA en alpacas (Flores *et al.*, 2002; Morton *et al.*, 2008).

Estos resultados se deben posiblemente a que los parámetros como volumen, concentración espermática, motilidad total y viabilidad son muy variables entre machos, entre eyaculados colectados del mismo macho, edad, método de colección, época del año, condición medio ambiental y especie (Bravo *et al.*, 2000; Tibary y

Vaughan, 2006; Morton *et al.*, 2008). Los eyaculados conseguidos por VA tienen tendencia a reducirse en volumen, concentración y viscosidad, cuando se crecienta la frecuencia de uso (Bravo y Alarcón, 2013). Por otra parte, el tiempo de cópula fue similar a los reportados en alpacas en monta natural y con VA acoplada a un maniquí de alpaca (Bravo y Alarcón, 2013).

Durante el proceso de congelación, el método en el cual se ejecutó la velocidad de congelación lenta (T5), 7 cm por 10 minutos y 4 cm por 5 minutos fue la más beneficiosa durante el experimento, esto se manifiesta por los valores significativamente superiores ($p \leq 0.05$) en la cinética (MT), viabilidad e integridad de membrana, en comparación con los demás métodos.

El proceso de congelación (T5) alcanzó una velocidad de descenso máximo de 14.7 °C/ min. La alternancia de alturas y velocidades de congelación han resultado beneficiosas en este experimento sobre los parámetros de motilidad total (28.2 ± 12.8 %), motilidad progresiva (7.13 ± 4.0 %), viabilidad (30 ± 10.3 %) e integridad de membrana plasmática (27.5 ± 9.8 %). Esto es respaldado por estudios que anteriormente han aplicado la alternancia de alturas en protocolos de congelación de semen de alpacas como en el caso de Morton *et al.*, (2008) y Terreros *et al.*, (2015), en donde obtuvieron altos porcentajes en parámetros seminales postdescongelamiento como motilidad total (21.5%), integridad acrosomal (91%) (Morton *et al.*, 2008) e integridad de la membrana plasmática (31.1%) (Terreros *et al.*, 2015) similares a los hallados en este trabajo. En los protocolos que aplican ambos autores, inician la exposición de las pajillas a 8 cm por 10 minutos y después a 4 cm por un tiempo de exposición final de 5 minutos (Morton *et al.*, 2008) y 10 minutos (Terreros *et al.*, 2015), estos protocolos son semejantes al aplicado en T5 ya que empezó en 7 cm por 10 minutos para después reducir la altura a un 1cm por 5 minutos. La alternancia de alturas ha permitido manejar una velocidad óptima de congelación en donde los daños extremos, cristalización y deshidratación, han sido reducidos permitiéndole al espermatozoide tener una supervivencia máxima.

Respecto a los otros métodos de congelación, mientras más cerca del nitrógeno líquido se colocaron las pajuelas T1 (1 cm a 15 min) y T4 (4 cm 10 min y 1 cm 5 min) los resultados sobre los parámetros espermáticos post-descongelados fueron los más bajos. Resultados similares han sido reportados por Arizabal (2019) en espermatozoides de llama procedentes del conducto deferente en donde se encontraron valores significativamente inferiores de motilidad total (18.2 %), motilidad progresiva (10.2 %), viabilidad (22.4 %) e integridad de membrana (18.4 %) en espermatozoides congelados a una altura de 3 cm sobre el nitrógeno líquido, considerado una velocidad de congelación rápida. La causa más probable es que al someter a los espermatozoides de alpaca a una velocidad de congelación rápida estos no son capaces de deshidratarse a tiempo, quedando grandes moléculas de agua en el citoplasma, que al llegar a la temperatura de nucleación intracelular se solidificaron formando hielo intracelular. Ello sumado a la descongelación lenta, 36 °C por 30 segundos, promovió el inicio del proceso de recristalización como probablemente ocurrió en los tratamientos T1 y T4 de este experimento, al descongelar a 37 °C por 30 segundos, el daño mecánico causado por los cristales afectó las propiedades de membrana y estructura espermática interna (organélas, macromoléculas y proteínas) (Mazur, 1985).

En el transcurso del proceso de descongelación se ocasionan efectos letales en la célula, es por ello que a pesar de que se halla ejecutado un protocolo óptimo de congelación, estos buenos resultados podrían quedar inhabilitados si es que no se efectúa correctamente la fase de descongelación. La parte crucial que afronta la célula durante el proceso de criopreservación lo establece el rango de temperatura que va desde -15°C a -60 °C, en donde perjudica gravemente su integridad, y por la que es sometida en dos momentos, la primera en el enfriamiento y la segunda a lo largo de la descongelación (Mazur, 1985). La criosupervivencia demanda afrontar con éxito la etapa de congelación y descongelación.

En el presente estudio existe un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en el método de descongelación, obteniéndose los mejores resultados en los parámetros de motilidad total, motilidad progresiva, viabilidad e integridad de membrana cuando se descongeló a 37 °C por 30 segundos (Cuadro 4) pudiendo ser corroborado con estudios previos

realizados por (Zirena, 2015; Pérez *et al.*, 2017; Al-bulushi *et al.*, 2019; Jang *et al.*, 2020; Longobardi *et al.*, 2020) en donde la descongelación a esta temperatura y tiempo expresó resultados positivos, a pesar de que se congelaron los espermatozoides a diferentes velocidades en diferentes especies como camélidos, bovinos, caprinos y equinos.

En el presente estudio, el método de descongelación a 60 °C por 10 segundos de duración brindó resultados porcentuales bajos y poco homogéneos respecto a la descongelación a 37 °C por 30 segundos en los parámetros de viabilidad, motilidad total, motilidad progresiva e integridad de membrana plasmática en los diferentes tratamientos. Contrariamente, otros investigadores demostraron que las temperaturas de descongelación tan alto como 60-80 °C podría mejorar aún más la motilidad posterior al descongelado al minimizar la recristalización del agua exterior, lo que podría lesionar la membrana (Busch y Waberski, 2010) de igual manera.

Malo *et al.*, (2019) al descongelar espermatozoides criopreservados de camello a 70 °C por 10 s logró obtener valores superiores a los parámetros cinéticos, integridad de membrana espermática e integridad de la membrana acrosomal que a una temperatura de 37 °C por 30 s. Estos resultados son opuestos a los encontrados en este estudio y podrían deberse a diversos factores, como la especie, ya que en comparación con las alpacas el semen de camello resulta más resistente al someterlo a diferentes pruebas de evaluación; la edad, debido a que la calidad espermática decrece respecto a parámetros de calidad como concentración, motilidad y morfología por el descenso en los niveles de testosterona en animales más longevos (Tejerina, 2007); el tipo de crioprotector, en ambos casos se utilizó glicerol, pero en concentraciones diferentes, 3 % y 5 %, esto pudo influir sobre la reestructuración de los lípidos y proteínas de membrana afectando a la membrana mitocondrial y acrosomal perjudicando los resultados de los parámetros evaluados (Giuliano, 2015); la alimentación, los camellos criados en el Centro de Reproducción de Camelidos (Dubai, EAU) mantienen altos estándares nutricionales que se complementan con alimento concentrado, mientras que, durante este experimento, la alimentación de los machos fue exclusiva de pasturas cultivadas; el volumen de las pajillas, ya que Malo *et al.*, (2019) utilizó pajillas de 0.5

mL, en cambio en este experimento fueron utilizadas pajillas de 0.25 mL lo cual promueve una rápida transferencia de temperatura por el diámetro de la misma conduciendo a una pérdida de frío (Ferré et al., 2017). Todos estos factores estarían asociados a dos situaciones diferentes.

Primeramente, si los espermatozoides se congelan muy rápido y después se someten a una descongelación lenta, empezará el proceso de “recristalización” en donde los microcristales producidos intracelularmente se agrupan y forman cristales más grandes, que mecánicamente terminan en un fin letal para la célula (Mazur, 1985). En segundo lugar, la congelación lenta más el uso de crioprotectores penetrantes como el glicerol ocasiona daños por estrés osmótico al descongelar las células de forma rápida, ya que se imposibilita al crioprotector abandonar la célula para recuperar el equilibrio osmótico ocasionando la turgencia y lisis celular por entrada de agua (Watson, 1990).

Por lo tanto, una velocidad de descongelamiento óptimo va a depender directamente del método de enfriamiento y congelación utilizados previamente. Se recomienda emplear una velocidad intermedia para no caer ni en el extremo del shock osmótico (descongelamiento rápido) ni en el inicio de proceso de recristalización (descongelamiento lento) minimizando al máximo los efectos nocivos causados por un inadecuado transporte en la membrana, tanto de solutos como de agua, y asociación de cristales de hielo intracelulares respectivamente (Hammerstedt et al., 1990).

VI. CONCLUSIONES

- El uso del método de congelación T5 (7 cm por 10 minutos y 4 cm por 5 minutos) criopreserva de forma más eficiente los espermatozoides de alpaca respecto a los parámetros espermáticos de motilidad total, viabilidad e integridad de membrana plasmática postdescongelación.
- Con el método de descongelación de 37° C aplicado en un tiempo de 30 segundos se obtiene mejores resultados de motilidad total, motilidad progresiva, viabilidad e integridad de membrana plasmática postdescongelación comparado al método de 60° C por 10 segundos.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar la evaluación de parámetros de calidad espermática durante la etapa de refrigeración del semen fresco de alpaca.
- Al evaluar los parámetros espermáticos se debe tener en cuenta la alimentación y altitud en la que vive la población animal evaluada.
- Realizar trabajos de inseminación artificial con el método de congelación T5 (7 cm por 10 minutos y 4 cm por 5 minutos) en combinación con el método de descongelación 37° C por 30 segundos para evaluar la fertilidad.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Aisen E, Alvarez H, Venturio A, Garde J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
2. Al- Bulushi S, Manjunatha B, Bathgate R, Rickard P, De Graaf S. 2019. Artificial insemination with fresh, liquid stored and frozen thawed semen in dromedary camels. *PLoS ONE* 14: 11: e0224992.
3. Aller J, Rebuffi G, Cancino A, Albeiro R. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Archivos de Zootecnia* 52: 15-23.
4. Arizabal, J. 2019. Efecto de tres niveles de congelamiento de espermatozoides de conducto deferente en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de segunda especialidad en biotecnología de la reproducción animal. Puno: Universidad Nacional del Altiplano. 55p.
5. Ávila-Portillo L, Madero J, López C, León M, Acosta L, Gómez C, Delgado L, Gómez C, Lozano J, Reguero M. 2006. Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología* 57 (4): 291-300.
6. Barbas J, Mascarenhas R. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking* 10 (1):49-62.
7. Baumber J, Ball B, Linfor J, Meyers S. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Androlgy* 24: 621- 628.
8. Bérnago N, Medina V, Martínez C, Vagnoni Y, Aisen E. 2012. Efecto de diferentes métodos de reducción de la filancia en el semen de *Lama glama*. En: VI Congreso mundial de camélidos sudamericanos. Arica.
9. Bernardi, S, Allende R, Mazzeo R, Monti J, Marini P. 2011. Evaluación de los

cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *Investigación Veterinaria* 13: (2), 25-38.

10. Boiso I. 2001. Principios básicos de criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad* 18: 127-131
11. Bravo P, Alarcón R, Ordoñez V. 2002. Ejaculatory process and related semen characteristics. *Archives of Andrology* 48: 65-72.
12. Bravo P, Alarcón V. 2013. Preservación de semen y avances recientes en la inseminación artificial de llamas y alpacas. *Spermova* 3(2): 158 – 160.
13. Bravo P, Callo M, Garnica J. 2000b. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Ruminant Research* 38: 91-95.
14. Bravo P, Flores D, Ordoñez C. 1997a. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. *Biology of Reproduction* 57: 520-524.
15. Bravo P, Skidmore J, Zhao X. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science* 62: 173-193.
16. Bravo P. 2002. The reproductive process of south american camelids. Utah: SeagullPrinting. 100p.
17. Buendía P, Soler C, Paolicchi F, Gago G, Urquieta B. 2002. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm Class Analyzer Computer Assisted System. *Theriogenology* 57:1207-1218.
18. Busch W, Waberski D. 2010. Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica. 1º Ed. Zagoza: Acribia S.A. 384p.
19. Bustinza J. 2001. Curso de manejo de alpaca. 1ª Ed. Vol. 2. Juliaca: Univ. Andina Néstor Cáceres. 64p.
20. Canorio N. 2008. Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*). Tesis de Magister en Biología Molecular. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 116p.
21. Carretero M, Neild D, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. 2014. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of Lama glama spermatozoa. *Andrología* 20: 1-9.
22. Ccallo M. 1996. Efecto de la fibrinolisisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina sobre la viscosidad del semen de alpaca y llama. Tesis de Médico Veterinario. Puno: Universidad Nacional del Altiplano. 68p.

23. Correa J, Zavos P. 1994. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42(2): 351–360.
24. Demianowicz W, Strezek J. 1996. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reproduction in Domestic Animals* 31: 279-280.
25. Fernández S, Calderón W. 1965. Métodos de colección de semen de alpaca. Bol. IVITA. Lima. 12 p
26. Ferré L, Grötter L, Cattaneo L, Marini P. 2017. Últimos avances en la criopreservación de semen de animales domésticos. *Taurus* 19: 76-77.
27. Flores N. 2011. Criopreservación de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) utilizando N, N-dimetilformamida al 4 y 7%. Tesis Médico veterinario. Cusco: Universidad Nacional San Antonia de Abad del Cusco. 93p.
28. Flores P, García-Huidobro J, Muñoz C, Bustos-Obregón E, Urquieta B. 2002. Alpaca semen characteristics previous to mating period. *Animal reproduction science* 72 (3-4): 259-66.
29. Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63: 431-444.
30. García W, Alarcón V, Bravo W. 2017. Artificial Insemination of Alpacas with Refrigerated Semen And The Inclusion Of Two Types Of Egg Yolk. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 28 (2): 337-344
31. García W, Alarcón V. 2019. Effect of artificial insemination with fresh semen, with one and two services, on the fertility and natality of alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 30 (2): 760-767
32. García W, Maxi E, Macedo V, Mendoza E, Cárdenas N, Málaga J. 2020. Efecto de dos métodos de crioconservación sobre la calidad seminal y tasa de preñez en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal. *Spermova* 10(2): 74-80.
33. García W, Pacheco J. 2022. Manual de inseminación artificial en alpacas. 1º Ed. Cusco: Kopy Graf. 62p.
34. García W. 2014. Optimización de los protocolos de criopreservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa. Tesis de Doctorado. Bellaterra: Universidad Autònoma de Barcelona. 305p.

35. Garner D, Hafez E. 2002. Espermatozoides y plasma seminal. 7a ed. Mexico D.F: McGraw Hill Interamericana. p. 98-112.
36. Garnica J, Achata R, Bravo P. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science* 32: 85-90.
37. Garnica J, Flores E, Bravo P. 1995. Citric acid and fructose concentrations in seminal plasma of the alpaca. *Small Ruminant Research Res* 18: 95-98.
38. Giuliano S, Casaretto C, Morán M, Huanca W. 2010. Electroeyaculación y Características Seminales de Alpaca. III Simposium Internacional de Investigaciones sobre Camélidos. Organizado por DESCO Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo Septiembre 9 y 10. Arequipa, Perú.
39. Giuliano S, Ferrari M. 2015. Morfometría del núcleo y de la cabeza de espermatozoides de llamas. *Spermova* 5(1): 110-114.
40. Gonzáles M, Huanca T, Cárdenas O. 2011. Evaluación de la fertilidad en alpacas inseminadas con semen refrigerado a diferentes tiempos post inducción de ovulación. *Spermova* 1: 102-103.
41. Gonzáles V. 2004. Efecto de la bulbouresectomía y frecuencia de colección en las características macro y microscópicas del eyaculado de llama (*Lama glama*). Tesis de Ingeniero Zootecnista. La Paz: Universidad Católica Boliviana. 70 p.
42. Graham J, Kunze E, Hammerstedt R. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biology of Reproduction* 43: 55-64.
43. h M. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeables y no permeables. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 81p.
44. Hafez E. 2002. Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez E. S. E., Hafez B., eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: McGraw Hill Interamericana. p. 441-452.
45. Hammerstedt R, Graham J, Nolan J. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive?. *Journal of Andrology* 11:73-88
46. Huanca T, Gonzáles M, Mamani R, Naveros M, Huanca W. 2012. Tasa de ovulación utilizando GnRH, plasma seminal y GnRH + Cópula en alpacas y llamas del CIP-QUIMSACHATA INIA-PUNO. *Spermova* 2(1): 61 - 62

47. Huanca T, Mamani H, Naveros L, Pacheco J, Condor N. 2011. Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos*). *Spermova* 1(1): 98-100.
48. Huanca W, Cordero A, Huanca T, Adams G. 2007. Biotecnologías reproductivas en Camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 15 (1): 195-201.
49. Jang H, Kwon H, Sun W, Hwang S, Hwang I, Kim S, Lee J, Lee S, Lee JW. 2020. Effects of Leucosporidium-derived ice-binding protein (LeIBP) on bull semen cryopreservation. *Veterinary Medicine and Science* 6: 447–453.
50. Jiménez M, Serrano M, Moreno J. 2011. Técnicas de criopreservación seminal. *Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular Comisión de Seminología y Técnicas de Reproducción Asistida* 3 (3): 34- 39.
51. Juárez J, Santiani A. 2019. Porcentaje de viabilidad espermática por citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú* 30 (3): 1175-1183.
52. Lichtenwalner A, Woods G, Weber J. 1996. Seminal collection. Seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology* 46: 293-305.
53. Longobardi V, Kosior M, Pagano N, Fatone G, Staropoli A, Vasseti A, Vinale F, Campanile G, Gasparrini B. 2020. Changes in Bull Semen Metabolome in Relation to Cryopreservation and Fertility. *Animals* 10: 1058-1065.
54. Malo C, Elwing B, Soederstroem L, Lundeheim N, Morrell J, Skidmore J. 2019. Effect of different freezing rates and thawing temperatures on cryosurvival of dromedary camel spermatozoa. *Theriogenología* 125: 43-48.
55. Malo C. 2020. Preservation of the spermatozoa of the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) by chilling and freezing: The effects of cooling time, extender composition and catalase supplementation. *Theriogenology* 153: 9-18
56. Martínez J, Pardo S. 2013. Efecto de la congelación y descongelación sobre la movilidad espermática en bocachico *Prochilodus magdalenae* (*Pisces Characiformes*). *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia Córdoba* 18 (1): 3295-3303.
57. Mazur, P. 1985. Basic concepts in freezing cells. En: *“Deep freezing of boar semen”*. 1º Eds: Uppsala: Swedish university of agricultural sciences. P 91-111.

58. Medeiros C, Forel F, Oliveira A, Rodrigues J. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57: 327-344
59. Morton K, Evans G, Maxwell W. 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 (2): 311-316.
60. Morton K, Vaughan J, Maxwell W. 2008. Continued development of artificial insemination technology in alpacas. Barton: RIRDC. 205p.
61. Ormachea O, Villazón A. 2017. Desarrollo De Un Microscopio De Epifluorescencia De Bajo. *UPB - Investigación & Desarrollo* 17 (1): 5 – 14.
62. Pacheco J, Mamani R, Franco F, Zea O, Pezo D, Velez V. 2014. Osmolarity effect of endosmotic response on epidymis sperm and eyaculated alpaca (*Vicugna pacos*). *Spermova* 4(1): 36 – 38.
63. Palomito H. 1962. Espermatograma y dimensiones de los espermatozoides de la alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 77p.
64. Parks J, Graham J. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranas. *Theriogenology* 38: 209-222.
65. Pérez D, Acosta M, Restrepo G, Camacho C, Pérez J. 2017. Freezing of equine semen under two schemes of addition of dimethylformamide. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 28 (4): 918-927
66. Rateb SA. 2016. Ultrasound-assisted liquefaction of dromedary camel semen. *Small Ruminant Research* 141: 48-55.
67. Ratto M, Huanca W, Adams G. 2010. Ovulation inducing factor: A protein component of llama seminal plasma. *Reproductive Biology Endocrinology* 8: 44.
68. Rodríguez C. 2009. Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Mag. Lima: Univ Nacional Mayor de San Marcos. 72 p.
69. Rodríguez P, Jiménez C, Franco E. 2008. Standardization of an spectrophotometric technique to measure sperm concentration in the bull , stallion , boar , ram and dog. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia* 55: 22–28.

70. Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez N. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology* 7 (3): 303-309.
71. Shojaei H, Kroetsch T, Wilde R, Blondin P, Kastelic J, Thundathil J. 2012. Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology* 77(5): 940–951.
72. Stuart C, Vaughan J, Kershaw C, DeGraaf S, Bathgate R. 2019. Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific Reports*: 9(1): 1-8.
73. Sumar J, Fredriksson G, Alarcón V, Kindahl H, Edqvist L. 1988. Levels of 15keto-13,14-dihydro-PGF_{2a}, progesterone and oestradiol-17B, after induced ovulations in llamas and alpaca. *Acta Veterinaria Scandinavica* 29: 339-346.
74. Sumar J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. Tesis Mg. Uppsala: Swedish University of Agrarian Sciences, Department of Obstetric and Gynaecology Veterinary Medicine Faculty.
75. Sumar J. 1994. Effects of various ovulation induction stimuli in alpacas and llamas. *Journal of Arid Environments* 26: 39-45.
76. Sumar J. 1991. Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. En: *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*. Santiago: FAO pp. 11-148.
77. Sutovsky P, Manandhar G. 2006. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En: J. De Jonge C., Barratt L. R. C., eds. *The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration*. Estados Unidos. Cambridge University Press.
78. Tejerina F. 2007. Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco. Tesis doctoral. León: Facultad de Veterinaria, Universidad de León. 328p.
79. Terreros M, Arriaga I, Huanca W. 2012. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). En: *Resúmenes y Trabajos VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos*. Arica.

80. Terreros M, Huanca W, Arriaga I, Ampuero A. 2015. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 26(3): 420-426
81. Thomas C, Garner D, DeJarnette J, Marshall C. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction* 58: 786-793.
82. Tibary A, Vaughan J. 2006. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research* 61: 283-298.
83. Valdivia M, Ruiz M, Bermudez L. 1999. Criopreservación de semen de alpacas. En: *II Congreso Mundial sobre camélidos*. Cusco.
84. Valdivia M, Suyo M, Manosalva I, Ruiz M, Romero S, Olazabal J. 2000. Cryopreservation and immunoreactivity of proacrosin/acrosin system in alpaca spermatozoa. *Biology of Reproduction* 62: 146-157.
85. Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). En: *RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation*. Kingston.
86. Watson P. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. En: *Marshall's Physiology of Reproduction*. 4^o Ed. Edimburgo: Springer science business media B. V. 747-869p.
87. Watson PF. 1995b. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development* 7: 871-891.
88. Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 111: 69-79.
89. Zirena N. 2015. Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor De San Marcos. 71p.

IX. APÉNDICE

Anexo 1. Fotografías

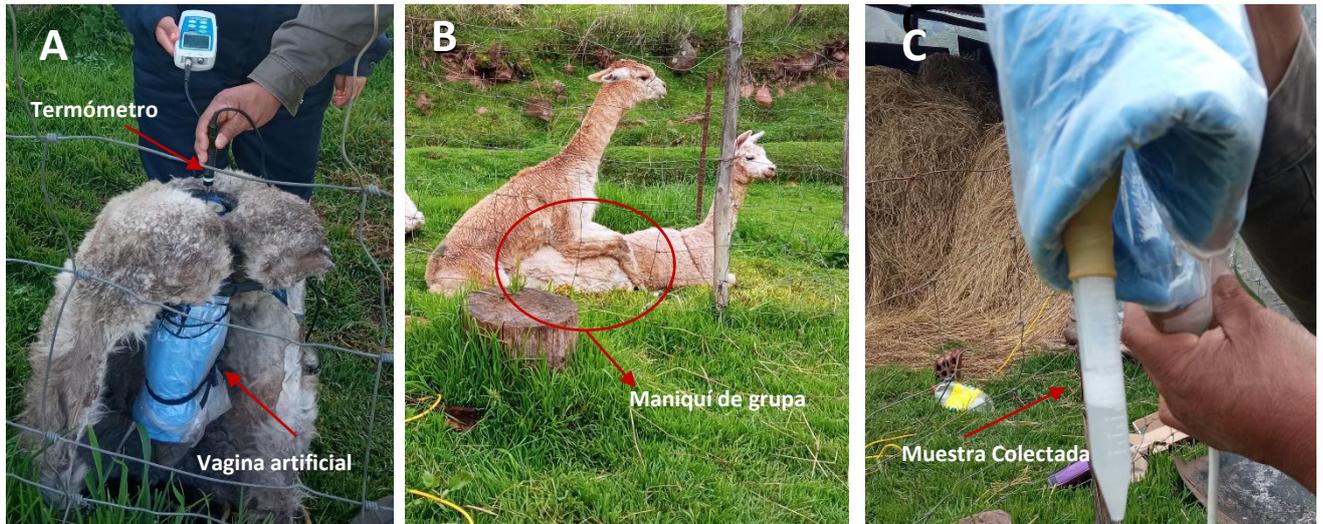


Figura 2. Proceso de colección de semen fresco de alpaca utilizando el método de colección por vagina artificial con maniquí de grupa. A) Acople de la vagina artificial, envuelto por una frazada eléctrica, al maniquí de grupa. B) Trabajo de Cópula con maniquí de grupa. C) Muestra Fresca de eyaculado.

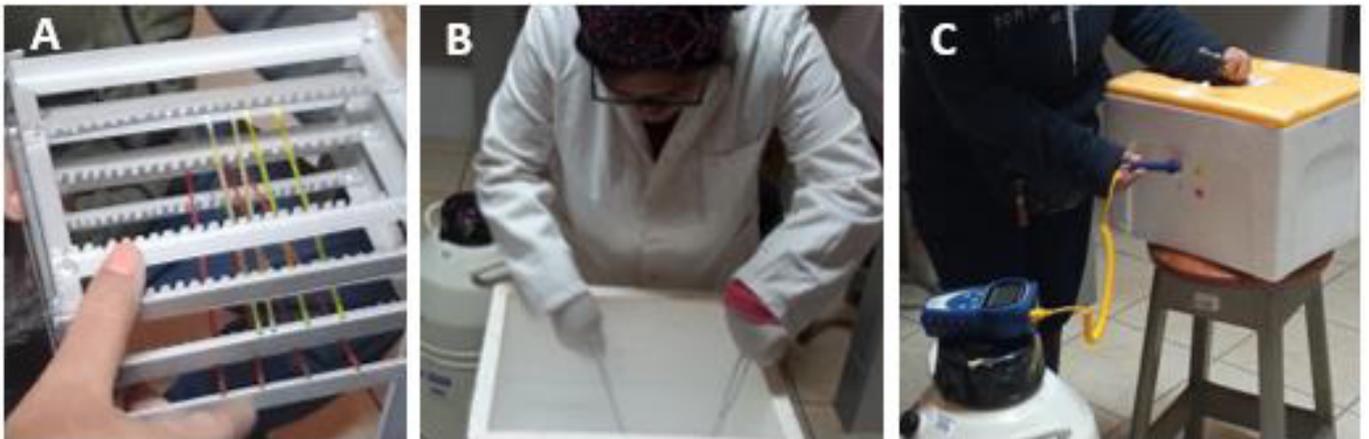


Figura 3. Proceso de criopreservación de semen de alpaca y registro de temperaturas durante el proceso de congelación. A) Estructura de aluminio con gradillas porta pajillas a diferentes alturas. B) Sumergimiento manual de las pajillas en el nitrógeno líquido. C) Medición de la temperatura con el uso del termocupla.

Anexo 2. Datos de las colecciones seminales por cada individuo

Número de colección	Volumen de Eyaculado (mL)				
	Macho 001	Macho 002	Macho 003	Macho 004	POOL final
C1	1.23	1.50	0.20	2.25	5.18
C2	3.50	1.89	2.90	1.70	9.99
C3	3.90	1.20	0.80	0.50	6.40
C4	2.80	2.56	1.30	0.60	7.26
C5	4.50	1.10	1.50	0.50	7.60
C6	3.00	1.20	1.90	1.70	7.80
C7	4.20	0.80	0.50	1.68	7.18
C8	1.20	1.10	1.80	0.80	4.90
C9	4.20	2.10	2.80	1.39	10.49
C10	3.50	2.90	1.80	1.00	9.20
C11	2.80	1.30	2.90	2.69	9.69

Número de colección	Tiempo de Eyaculado (minutos)			
	Macho 001	Macho 002	Macho 003	Macho 004
C1	25	27	20	46
C2	40	20	35.5	50
C3	23	46	26	53
C4	48	50	35	17.5
C5	43	34	42	22
C6	32	39	42	22.5
C7	36	19	26	46
C8	38	34	29	23
C9	45	33	40	34
C10	42	20	18	30
C11	33	24	34	25

Anexo 3. Resumen de la evaluación de parámetros espermáticos en fresco

Numero de colección	Viabilidad	Concentración	Motilidad		Integridad de membrana plasmática	Colección	
	SYBR 14/PI						
	Espermatozoides vivos (%)	millones espermatozoides /mL	Total (%)	Progresiva (%)	Espermatozoides positivos a HOST (%)	Tiempo (min) promedio 4 machos	Volumen (mL) promedio 4 machos
C1	75	206	71.06	5.2	75	29.55	1.30
C2	89.5	118	83.01	3	68	36.4	2.50
C3	71.5	132	68.11	3.8	69.95	37	1.60
C4	74.5	140	69.55	5.6	70	37.6	1.82
C5	71.5	120	65.2	4	73	35.2	1.90
C6	67.25	86	67.41	6	59.04	33.8	1.95
C7	63.48	160	67.53	4.2	45.26	31.7	1.80
C8	65.97	170	60.03	5	46.33	31	1.23
C9	64.71	150	62.13	5.72	47.97	38	2.62
C10	73.96	126	62.03	5	62.78	27.5	2.30
C11	70.92	146	61.04	4.28	61.05	29	2.42

Anexo 4. Datos de la evaluación de parámetros post descongelación por cada tratamiento

TRATAMIENTO 1: 1CM X 15'						
Numero de colección	Temperatura de descongelación	Viabilidad	Concentración	Motilidad		Integridad de membrana
		SYBR14				
		vitalidad (%)	millones espermatozoides /mL	M. Total (%)	M. Progresiva (%)	Host positivos (%)
C1	37°C	38.52	206	20.08	11.38	46.80
	60°C	32.19	206	23.00	2.00	45.76
C2	37°C	21.21	118	17.00	8.00	18.18
	60°C	26.29	118	19.60	8.86	21.39
C3	37°C	55.96	132	18.00	6.31	17.99
	60°C	23.84	132	32.70	29.66	32.89
C4	37°C	22.47	140	28.70	10.13	22.30
	60°C	28.14	140	12.20	4.10	26.00
C5	37°C	26.25	120	15.90	9.76	36.17
	60°C	34.60	120	25.00	5.00	42.78
C6	37°C	29.04	86	14.20	7.50	21.37
	60°C	21.85	86	7.20	4.10	18.32
C7	37°C	14.34	160	12.70	3.46	15.92
	60°C	11.75	160	4.20	0.90	14.98
C8	37°C	22.22	160	14.20	5.10	24.77
	60°C	14.85	160	17.10	5.80	22.94
C9	37°C	21.84	160	12.70	5.30	16.51
	60°C	24.01	160	5.10	2.00	27.91

C10	37°c	13.44	136	3.40	0.98	15.75
	60°c	13.76	136	21.30	5.07	27.75
C11	37°c	15.67	136	18.20	6.11	12.50
	60°c	16.21	136	21.83	10.02	21.54

TRATAMIENTO 2: 4CM X 15'						
Numero de colección	Temperatura de descongelación	Viabilidad	Concentración	Motilidad		Integridad de membrana
		SYBR14		M. Total (%)	M. Progresiva (%)	Host positivos (%)
		vitalidad (%)	millones espermatozoides /mL			
C1	37°c	28.64	206	26.00	17.00	20.60
	60°c	19.47	206	15.50	5.00	15.20
C2	37°c	25.35	118	15.00	5.40	22.60
	60°c	24.54	118	22.45	6.12	18.91
C3	37°c	29.37	132	27.80	7.10	25.60
	60°c	25.83	132	19.33	12.33	16.90
C4	37°c	42.69	140	17.00	9.90	28.30
	60°c	27.8	140	19.76	8.47	20.20
C5	37°c	35.73	120	19.20	9.17	30.45
	60°c	14.28	120	8.70	2.20	10.50
C6	37°c	33.89	86	34.30	8.47	14.57
	60°c	35.42	86	6.90	1.70	35.72
C7	37°c	19.52	160	17.90	7.80	17.47
	60°c	19.78	160	12.00	1.50	16.85
C8	37°c	15.75	160	16.20	8.41	12.51
	60°c	20.61	160	11.70	4.30	17.61
C9	37°c	29.2	160	23.20	9.80	20.90
	60°c	23	160	13.30	5.40	19.80
C10	37°c	30.5	136	20.8	8.5	22.3
	60°c	20.5	136	15.5	6.3	17.5
C11	37°c	27.5	136	21.4	9	21.5
	60°c	26.5	136	14.6	4.1	19.5

TRATAMIENTO 3: 7CM X 15' (MORADO)						
Numero de colección	Temperatura de descongelación	Viabilidad	Concentración	Motilidad		Integridad de membrana
		SYBR14		M. Total (%)	M. Progresiva (%)	Host positivos (%)
		vitalidad (%)	millones espermatozoides /mL			
C1	37°c	36.2	206	30.00	5.09	29.77
	60°c	28.22	206	23.75	10.73	24.96
C2	37°c	39.48	118	12.80	5.44	21.30
	60°c	9.1	118	15.80	10.42	5.30
C3	37°c	36.19	132	15.20	4.50	30.50
	60°c	9.81	132	9.20	3.10	5.80
C4	37°c	17.39	140	15.20	5.70	15.20
	60°c	11.65	140	2.90	0.50	9.70
C5	37°c	34.93	120	13.70	3.20	30.80
	60°c	32.96	120	17.70	4.70	28.70
C6	37°c	29.12	86	22.30	5.90	20.50
	60°c	19.07	86	22.70	6.10	15.60
C7	37°c	26.9	160	22.81	5.90	24.03
	60°c	10.85	160	14.21	7.85	17.72
C8	37°c	23.08	160	35.70	9.13	20.20
	60°c	21.94	160	18.70	6.40	20.00
C9	37°c	31.5	160	19.74	6.91	25.20
	60°c	18.51	160	16.81	3.40	16.81
C10	37°c	35.81	136	18.21	4.81	22.00
	60°c	19.5	136	17.91	4.90	12.90
C11	37°c	28.91	136	21.90	4.63	23.80
	60°c	16.51	136	14.40	7.82	16.60

TRATAMIENTO 4: 4 cm X 10' / 1cmx 5' (VERDE)						
Numero de colección	Temperatura de descongelación	Viabilidad	Concentración	Motilidad		Integridad de membrana
		SYBR14		M. Total (%)	M. Progresiva (%)	Host positivos (%)
		vitalidad (%)	millones espermatozoides /mL			
C1	37°c	28.91	206	18.10	12.00	23.52
	60°c	11.70	206	13.00	6.00	6.80
C2	37°c	29.34	118	25.00	6.00	20.50
	60°c	15.48	118	8.90	0.10	10.50
C3	37°c	44.33	132	21.50	10.61	32.37

	60°C	7.08	132	11.92	6.62	4.30
C4	37°C	28.99	140	20.50	10.46	25.41
	60°C	12.80	140	10.58	0.00	7.50
C5	37°C	45.07	120	24.30	10.20	30.00
	60°C	9.98	120	15.30	6.10	6.20
C6	37°C	23.68	86	16.89	2.40	20.56
	60°C	14.71	86	23.30	8.30	6.50
C7	37°C	21.04	160	31.70	9.10	10.50
	60°C	19.10	160	21.80	9.10	12.30
C8	37°C	10.50	160	34.20	8.32	26.96
	60°C	4.09	160	17.74	3.26	2.30
C9	37°C	28.81	160	25.20	8.50	22.81
	60°C	12.81	160	15.80	4.80	5.21
C10	37°C	30.65	136	23.10	9.30	24.20
	60°C	10.98	136	14.51	6.50	6.14
C11	37°C	27.48	136	25.60	7.00	22.10
	60°C	10.30	136	14.80	3.10	8.90

TRATAMIENTO 5: 7 cm X 10' / 4cmx 5'						
Numero de colección	Temperatura de descongelación	Viabilidad	Concentración millones espermatozoides /mL	Motilidad		Integridad de membrana
		SYBR14		M. Total (%)	M. Progresiva (%)	Host positivos (%)
		vitalidad (%)				
C1	37°C	34.08	206	55.70	43.42	30.5
	60°C	34.51	206	45.50	2.00	29.5
C2	37°C	44.13	118	27.00	8.00	40.12
	60°C	25.9	118	15.50	0.98	11.5
C3	37°C	40.26	132	18.70	4.00	42.5
	60°C	20.16	132	11.76	8.24	18.5
C4	37°C	30.62	140	45.50	3.14	28.86
	60°C	25.28	140	40.50	1.01	23.50
C5	37°C	38.89	120	30.20	6.20	35.2
	60°C	19.74	120	20.50	2.30	18.7
C6	37°C	49.76	86	43.38	13.20	43.20
	60°C	48.95	86	40.50	3.19	45.8
C7	37°C	26.1	160	20.50	3.89	15.6
	60°C	16.96	160	9.80	4.00	14.5
C8	37°C	27.79	160	16.00	8.20	23.5
	60°C	23.18	160	10.20	2.30	20.2
C9	37°C	18.5	160	32.12	11.25	32.34
	60°C	13.17	160	24.28	2.90	22.6
C10	37°C	37.8	136	33.15	13.14	30.51

	60°C	28.9	136	26.81	4.10	23.4
C11	37°C	39.8	136	31.10	9.30	34.1
	60°C	28.9	136	21.70	2.00	22.1

Anexo 5. Cuantificación de la velocidad de enfriamiento rápida y lenta y la velocidad de descongelación rápida y lenta.

AUTOR	VELOCIDAD DE CONGELACION		VELOCIDAD DE DESCONGELACIÓN	
	RAPIDA	LENTA	RAPIDA	LENTA
Jiménez M. <i>et al.</i> , 2011	-50 a -400 °C/min	-0.5 °C a 10°C/min	---	---
Martínez J. <i>et al.</i> , 2013	-27.3 a -29.9 °C/min	-2 a -8.2 °C/min	450 °C/min 7,5 °C/s	112,5 °C/min 1,88 °C/s
Stuart <i>et al.</i> , 2019	-47.8 °C/min	-16 °C/min	126 °C/min 2,1°C/s	37.2 °C/min 0.62 °C/s