

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



**“USO DE LA DIMETILFORMAMIDA EN LA CRIOPRESERVACIÓN
DE SEMEN DE ALPACA (*Vicugna pacos*)”**

Tesis presentada por el Bachiller en Ciencias Agrarias: **RENE CIPRIAN ACHIRCANA**, para optar el Título Profesional de **INGENIERO ZOOTECNISTA**.

ASESORES:

ING. CÉSAR DOMINGO ORDOÑEZ RODRÍGUEZ

MSc. HERNÁN CARLOS CUCHO DOLMOS

MVZ. VIRGILIO ALARCÓN BAYONA

CUSCO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A Dios por su sabiduría.

*Con todo mi cariño para mis padres **Yury Abad y Felipa** por la vida que me dieron, por su amor y su apoyo incondicional, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y por hacer de mi como la persona que soy, son los mejores padres.*

*A mis amados hermanos **Rosmery, Nancy, Vilma, Yuri, Carmen, Neptali** por apoyarme siempre, su comprensión, sus buenos consejos, y motivarme a seguir adelante.*

*Para **Mariela, Cristian, Noelia, Uriel y Adriana** por llenar mis días de felicidad.*

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, y un reconocimiento a los docentes de la Escuela Profesional de Zootecnia por haberme formado como profesional y enseñado lo hermoso que es la Zootecnia.
- Al MSc. Hernán Cucho Dolmos mi eterno agradecimiento, por brindarme su apoyo, sus consejos, enseñanzas hasta la culminación del presente trabajo de investigación.
- Al Ing. Cesar Ordoñez Rodríguez; y MVZ. Virgilio Alarcón Bayona por sus asesoramientos y orientaciones en el proceso experimental, análisis de datos y culminación del presente trabajo de investigación.
- A mis compañeros y amigos Abel Quispe, Noemí Calderón, Nils Flores por su apoyo y por todos los lindos momentos que compartimos durante la ejecución del trabajo de investigación.
- Deseo expresar mis agradecimientos a Elisa, Carmen, Elisbeth, Mónica, Pamela, Muriel, Dounia, Nancy y Wilber por su apoyo en la ejecución del presente trabajo de investigación.
- A todo el personal técnico y administrativo que labora en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) - La Raya; quienes me brindaron todo su apoyo.
- A mis compañeros y amigos Nelson, José Antonio, Ponciano, Víctor Raúl, Wilmar, Alan, Yovana, Gladys y Lupe, quienes me acompañaron y alegraron mi vida universitaria.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS.....	vi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
GLOSARIO.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	2
PROBLEMA OBJETO DE ESTUDIO	2
1.1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	3
1.1.1. Objetivo general.....	3
1.1.2. Objetivos específicos.....	3
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	4
CAPITULO II.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA ALPACA.....	5
2.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACA	5
2.3. COLECCIÓN DE SEMEN	6
2.3.1. Electroeyaculación.....	6
2.3.2. Vagina artificial	7
2.3.3. Desviación de conductos deferentes	7
2.4. EVALUACIÓN DEL SEMEN	8
2.4.1. Características macroscópicas	8
2.4.2. Características microscópicas	11
2.5. SISTEMA COMPUTARIZADO DE ANÁLISIS SEMINAL.....	16

2.5.1.	Integrated Semen Analysis System	17
2.5.2.	Características seminales que evalúa el ISAS.....	17
2.6.	PROCESAMIENTO DE SEMEN	21
2.6.1.	Dilución.....	21
2.6.2.	Enfriamiento - refrigerado	21
2.6.3.	Adición de crioprotector y envasado	21
2.6.4.	Proceso de equilibrado, congelación y almacenamiento.....	22
2.6.5.	Descongelación	22
2.7.	CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA	23
2.7.1.	Diluyentes de semen	24
2.7.2.	Crioprotectores de semen.....	27
2.8.	ANTECEDENTES DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA ...	32
CAPITULO III.....		37
MATERIALES Y MÉTODOS.....		37
3.1.	LUGAR DE ESTUDIO.....	37
3.2.	MATERIALES Y EQUIPOS.....	37
3.2.1.	De los animales	37
3.2.2.	Equipos y materiales para la colección de semen.....	38
3.2.3.	Equipos y materiales de laboratorio	39
3.2.4.	Equipo y material de escritorio.....	41
3.3.	INSTALACIONES	42
3.4.	METODOLOGÍA	42
3.4.1.	Selección de los animales	42
3.4.2.	Colección de semen	42
3.5.	EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL SEMEN DE ALPACA.....	45
3.5.1.	Volumen	45
3.5.2.	Color.....	46
3.5.3.	Filancia	46
3.5.4.	pH.....	46
3.6.	EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN DE ALPACA	47

3.6.1.	Motilidad y concentración espermática	48
3.6.2.	Vitalidad espermática.....	48
3.6.3.	Morfometría espermática	49
3.6.4.	Funcionalidad de la membrana espermática.....	50
3.7.	PROCESAMIENTO DE SEMEN	51
3.7.1.	Dilución.....	51
3.7.2.	Refrigerado.....	53
3.7.3.	Adición del crioprotector	53
3.7.4.	Equilibrado.....	54
3.7.5.	Empajillado	54
3.7.6.	Congelación y almacenado.....	54
3.7.7.	Descongelado.....	55
3.8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	56
CAPITULO IV		58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		58
4.1.	EVALUACIÓN MICROSCÓPICA PARA EL OBJETIVO 1.....	58
4.1.1.	Evaluación microscópica de espermatozoides colectados por desviación del conducto deferente	58
4.1.2.	Evaluación microscópica de semen colectado por electroeyaculación64	
4.2.	EVALUACIÓN MICROSCÓPICA PARA EL OBJETIVO 02.....	70
4.2.1.	Evaluación microscópica de espermatozoides colectados por desviación de conductos deferentes.....	70
4.2.2.	Evaluación microscópica de semen colectado por electroeyaculación79	
CAPITULO V		90
CONCLUSIONES		90
CAPITULO VI		91
RECOMENDACIONES.....		91
CAPITULO VII		92
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		92
ANEXOS.....		99

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Color espermático de alpacas colectado por desviación de conducto deferente (DCD) y electroeyaculación (EE).	9
Cuadro 2. Volumen y pH de semen de alpaca colectado por desviación de conducto deferente (DCD), electroeyaculación (EE) y Vagina artificial (VA).....	10
Cuadro 3. Concentración, motilidad y vitalidad espermática del semen de alpacas colectada por desviación de los conductos deferentes (DCD), electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA).....	13
Cuadro 4. Tipo de motilidad y parámetros cinéticos de velocidad espermática evaluada en ISAS.	18
Cuadro 5. Motilidad de espermatozoides móviles progresivos (EMP) y móviles no progresivos (EMNP) en semen fresco de alpacas evaluados en ISAS.	19
Cuadro 6. Parámetros cinéticos de velocidades de espermatozoides de alpaca evaluadas en el ISAS.....	19
Cuadro 7. Parámetros de evaluación morfométrica del espermatozoide de alpaca determinadas en el ISAS.	20
Cuadro 8. Porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, móviles no progresivos y motilidad total en semen refrigerado y descongelado de alpacas.	32
Cuadro 9. Parámetros cinéticos de velocidad de espermatozoides de alpaca colectados por electroeyaculación determinadas en ISAS.....	33
Cuadro 10. Valores de motilidad, vitalidad y funcionalidad de membrana espermática en semen refrigerado y descongelado de alpaca.....	35
Cuadro 11. Porcentaje de vitalidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA.....	58
Cuadro 12. Motilidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA.....	60
Cuadro 13. Porcentaje de EMP y EMNP en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD, utilizando tres niveles de DMFA.	61
Cuadro 14. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA.....	63
Cuadro 15. Vitalidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.....	64

Cuadro 16. Motilidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.....	66
Cuadro 17. Porcentaje de EMP y EMNP en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.....	68
Cuadro 18. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.....	69
Cuadro 19. Vitalidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.	71
Cuadro 20. Motilidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.	72
Cuadro 21. Porcentaje de EMP y EMNP en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.	74
Cuadro 22. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.	75
Cuadro 23. Morfometría espermática en semen fresco y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.	77
Cuadro 24. Reacción total de la funcionalidad de membrana espermática en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.	78
Cuadro 25. Vitalidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.	79
Cuadro 26. Motilidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.	81
Cuadro 27. Porcentaje de EMP y EMNP en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de de DMFA y GLI.	83
Cuadro 28. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.	84
Cuadro 29. Morfometría espermática en semen fresco y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.	86
Cuadro 30. Reacción total de la funcionalidad de membrana espermática en semen descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.	87

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Variación de la vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA.	59
Gráfico 2. Variación de la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA.	61
Gráfico 3. Variación de la vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.	65
Gráfico 4. Variación de la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.	67
Gráfico 5. Variación de la vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD utilizando DMFA y GLI.	71
Gráfico 6. Variación de la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD utilizando DMFA y GLI.	73
Gráfico 7. Variación de la funcionalidad de membrana espermática en semen fresco y descongelado de alpacas colectadas por DCD utilizando DMFA y GLI.	78
Gráfico 8. Variación de la vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE utilizando DMFA y GLI.	80
Gráfico 9. Variación de la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE utilizando DMFA y GLI.	82
Gráfico 10. Variación de la reacción total de la funcionalidad de membrana espermática en semen fresco y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de típicos cambios morfológicos en espermatozoides humanos sometidos a estrés hipoosmótico.	16
Figura 2. Parámetros de motilidad obtenidos por el CASA.	17
Figura 3. Parámetros de evaluación morfométrica del espermatozoide de llama.	20
Figura 4: Flujograma de proceso de congelación de semen.	56

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1. Instalaciones del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS – La Raya	37
Foto 2. Grupo de alpacas macho utilizados para la colección de semen.....	38
Foto 3. Materiales para la colección de semen.....	39
Foto 4. Microscopio de contraste de fases, fluorescencia, platina térmica, videocámara y computadora ejecutando el programa ISAS v.1.2.	40
Foto 5. Equipos utilizados: baño maría, medidor de pH digital y balanza de precisión. ...	41
Foto 6. Colección de semen por el método de electroeyaculación.	43
Foto 7. Recuperación de espermatozoides por el método DCD.	45
Foto 8. Patrón utilizado para determinar el volumen de espermatozoide colectado por DCD	46
Foto 9. Evaluación del color y volumen de semen colectado por EE.....	47
Foto 10. Fotograma de la motilidad espermática observada a través del ISAS.	48
Foto 11. Frotis de tinción de eosina nigrosina y campo microscópico para la prueba de vitalidad: espermatozoide vivo (verde) y muerto (rojo).	49
Foto 12. Kit de tinción Hemacolor® y espermatozoides capturados en el módulo de morfometría del ISAS.....	50
Foto 13. Reacción espermática al estrés hipoosmótico: con reacción (verde) y sin reacción (rojo).	51
Foto 14. Reactivos para la preparación de dilutor base Tris.	52
Foto 15. Dilutores base tris: predilutor, dilutor A y dilutor B con diferentes niveles de crioprotector.....	53
Foto 16. Congelación tipo horizontal de pajillas de semen en vapores de nitrógeno líquido y tanque de nitrógeno para almacenamiento.	55
Foto 17. Descongelación de pajillas de semen y evaluación microscópica de semen descongelado.	55

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Reactivos para la preparación de predilutor y dilutor base Tris.....	99
ANEXO 2. Resultados de evaluación macroscópica y microscópica de espermatozoides recuperados por desviación del conducto deferente	100
ANEXO 3. Resultados de evaluación macroscópica de espermatozoides recuperados por electroeyaculación.	102
ANEXO 4. Análisis de Variancia para el objetivo 1 de las características microscópicas en muestra equilibrado y descongelado de semen de alpacas colectadas por DCD.....	104
ANEXO 5. Análisis de variancia para el objetivo 1 de las características microscópicas en muestra equilibrado y descongelado de semen de alpaca colectadas por EE.	107
ANEXO 6. Análisis de variancia para el objetivo 2 de las características microscópicas en muestra equilibrado y descongelado de semen de alpaca colectado por DCD.	111
ANEXO 7. Análisis de variancia para el objetivo 2 de las características microscópicas en muestra equilibrado y descongelado de semen de alpaca colectado por EE.	115

GLOSARIO

ANVA:	Análisis de varianza
ALH:	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
BCF:	Frecuencia de batida de la cabeza
CASA:	Computer Assisted Sperm Analysis
CS:	Camélidos Sudamericanos
CV:	Coefficiente de variabilidad
DMFA:	Dimetilformamida
DCD:	Desviación de Conductos Deferentes
DS:	Desviación estándar
EE:	Electroejaculación
EMP:	Espermatozoides móviles progresivos
EMNP:	Espermatozoides móviles no progresivos
GLI:	Glicerol
HOST:	HipoOsmotic Swelling Test.
ISAS:	Integrated Semen Analysis System
LIN:	Índice de linealidad
PC:	Post-copula
PI:	Pieza intermedia.
SAS:	Statistical Analysis System
STR:	Índice de rectitud
VA:	Vagina artificial
VAP:	Velocidad media
VCL:	Velocidad curvilínea
VSL:	Velocidad rectilínea
WOB:	Índice de oscilación

RESUMEN

El estudio “**Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*)**”, se realizó de noviembre 2013 a diciembre 2014, se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS – La Raya, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. El objetivo del estudio fue determinar la acción crioprotectora de la dimetilformamida (DMFA) en la congelación de semen de alpaca. La colección de semen se hizo de 03 alpacas macho por el método de desviación de conductos deferentes (DCD) y 03 machos por electroeyaculación (EE). La dilución de semen se hizo en dilutor base Tris y refrigerado por 2.5 horas hasta 4 °C; luego la muestra fue dividida en alícuotas para cada tratamiento: 5, 7 y 9% de DMFA para el objetivo 01 (03 tratamientos) y más 7% de glicerol para el objetivo 02 (04 tratamientos). La segunda dilución fue con base Tris + nivel de crioprotector y equilibrado por 01 hora. La congelación se hizo en forma horizontal sobre vapores de nitrógeno líquido y descongelado después de 06 días. Para el objetivo 1, en semen descongelado no existe diferencia ($p>0.05$) entre los 03 tratamientos para vitalidad, motilidad y parámetros de velocidad espermática tanto en DCD y EE. Para el objetivo 2, por el método DCD no hay diferencia ($p>0.05$) en muestras descongeladas con niveles de DMFA y glicerol para vitalidad, motilidad, funcionalidad de membrana y parámetros de velocidad y por el método EE no se encontró diferencia ($p>0.05$) para vitalidad y funcionalidad de membrana espermática, pero si existe diferencia ($p<0.01$) para motilidad y parámetros de motilidad espermática, con mayor porcentaje para 7 y 9% de DMFA. Asimismo, se encontró diferencia ($p<0.01$) en las medidas de morfometría espermática entre espermatozoides frescos y descongelados obtenidos por DCD y EE. Se concluye que el uso de DMFA y glicerol en la criopreservación de semen obtenido por DCD ofrece respuestas similares, mientras para semen obtenido por EE el uso de 7 y 9% de DMFA mejora la calidad espermática.

Palabras clave: criopreservación, semen, alpaca, dimetilformamida, glicerol.

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, la crianza de los camélidos es una actividad de mayor importancia e impacto en el desarrollo socio económico de la población altoandina, no solo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales, sino por su utilización como una fuente alimenticia de proteína de origen animal y como un recurso para la producción de fibra de buena calidad (Huanca *et al.*, 2007).

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante Inseminación Artificial (IA), ha causado gran impacto en la reproducción animal, debido a que favorece el comercio nacional e internacional de razas o líneas genéticas y formación de bancos de germoplasma (Aller *et al.*, 2003). En la actualidad la IA en camélidos con semen congelado no está muy desarrollada, pero hay un interés considerable en su aplicación. Investigaciones previas encaminadas a la mejora de la IA en alpacas ha tenido éxito limitado debido a la diferente fisiología reproductiva con relación a otras especies domésticas. Factores como el largo periodo de apareamiento y las características propias del semen (bajo volumen, baja concentración y plasma seminal viscoso), han impedido el desarrollo de métodos viables de preservación de semen (Morton y Maxwell, 2006).

La creciente demanda de fibra superfina de alpaca y carne con bajo porcentaje de colesterol ha promovido la obtención de animales genéticamente superiores. La implementación de biotecnologías reproductivas es indispensable para acelerar el progreso genético en estas especies, ya que presentan un intervalo generacional prolongado con gestaciones de 350 días. Por lo tanto, es necesario estudiar las características del semen y su manejo para poder implementar planes de reproducción asistida tale como producción de embriones *in vitro* e inyección intracitoplasmática de un espermatozoide y así se podrían acortar los tiempos generacionales (Giuliano y Santa Cruz, 2011).

CAPITULO I

PROBLEMA OBJETO DE ESTUDIO

Los bajos porcentajes de preñez, obtenidos mediante la inseminación artificial con semen congelado, utilizando como crioprotector el glicerol, con resultados que van de 0 – 30% de fertilidad (Bravo *et al.*, 2000; Vaughan *et al.*, 2003; Aller *et al.*, 2003), hacen que se haga necesaria la realización de más investigaciones sobre el comportamiento de otros crioprotectores en la congelación de semen de alpacas. Solo se optará por esta técnica, cuando la fertilidad de semen descongelado sea aceptable y que presente resultados comparables con los obtenidos con el uso de semen fresco y refrigerado (Mesa, 2010).

En los últimos años se han venido realizando trabajos sobre el manejo de semen para su preservación, pero las características que presenta este tipo de muestra son muy desalentadoras, ya que la técnica de extracción seminal no ha sido estandarizada y sólo se obtienen eyaculados con bajo volumen, alta viscosidad y una baja concentración de espermatozoides y una alternativa es el uso de espermatozoides del epidídimo ya que se encuentran en un nivel de maduración notable y su manejo en el laboratorio es muy satisfactorio (Díaz, 2014).

El principal obstáculo para el desarrollo de las Técnicas de Reproducción Asistida en los camélidos es la viscosidad del plasma seminal, ya que impide la mezcla homogénea del semen con un dilutor, lo que limita el contacto entre la membrana del espermatozoide y compuestos crioprotectores durante la criopreservación (Kershaw-Young y Maxwell, 2012b). Los esfuerzos para el desarrollo y aplicación de biotecnologías reproductivas no han sido desarrollados en forma programada y continua, sino como esfuerzos individuales y aislados e incluso algunos investigadores consideran que no es posible desarrollar y aplicar estas tecnologías por los pobres resultados obtenidos (Huanca *et al.*, 2007).

Para lo cual se planteó las siguientes preguntas:

Problema general

¿Cuál es la acción crioprotectora de la dimetilformamida en la congelación de semen de alpaca, colectado por desviación del conducto deferente y electroeyaculación?

Problemas específicos

- ¿Cuál es el porcentaje adecuado de dimetilformamida en la preparación de dilutores de semen de alpaca colectados por desviación del conducto deferente y electroeyaculación?
- ¿Existe diferencia entre el efecto del glicerol y la dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca colectado por desviación del conducto deferente y electroeyaculación?

1.1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

1.1.1. Objetivo general

Determinar la acción crioprotectora de la dimetilformamida en la congelación de semen de alpaca, colectado por desviación del conducto deferente y electroeyaculación.

1.1.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar el porcentaje adecuado de uso de dimetilformamida en la preparación de dilutores de semen de alpaca colectados por desviación del conducto deferente y electroeyaculación.
- 2) Comparar el efecto del glicerol y la dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca colectado por desviación del conducto deferente y electroeyaculación.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Hay muy poca información disponible sobre el uso de dilutores de semen en los camélidos. La mayoría de los dilutores, así como las técnicas de refrigeración y congelación, utilizado en semen de alpacas y llamas en los últimos 20 años se han adaptado de los desarrollados para el toro y el carnero (Adams *et al.*, 2009).

En caballos, el glicerol ha sido el crioprotector más usado para la congelación de semen, pero este tiene efectos tóxicos en el espermatozoide, que podrían ser evitados mediante el uso de crioprotectores alternos como la dimetilformamida (Alvarenga y Papa, 2011). La sensibilidad de los espermatozoides a los efectos nocivos del glicerol, para especie tales como conejos, gallinas y peces, el glicerol ha demostrado ser ineficaz y las amidas son una alternativa a la congelación de los espermatozoides de estas especies (Zimmermann, 2007).

Los crioprotectores derivados de amidas por poseer un menor peso molecular con relación al glicerol, llevan a un menor estrés osmótico de las células espermáticas, los cuales se caracterizan por penetrar al citoplasma del espermatozoide, reemplazando el agua intracelular y evitando así la formación de cristales de hielo (Alvarenga *et al.*, 2005). A pesar de que existe muy poca información acerca de la dimetilformamida dentro de la congelación como agente crioprotector para espermatozoides en los camélidos, existe una gran cantidad de datos relacionados con el uso de este compuesto en el congelamiento de semen de otras especies, arrojando resultados superiores y de mejor calidad para la congelación de semen.

CAPITULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA ALPACA

El comportamiento sexual de cada especie es singular y en el caso de los camélidos sudamericanos presentan características muy peculiares, como la posición coital y su temperamento nervioso, hacen que la obtención de semen presente serias dificultades (Bustinza, 2001). La conducta sexual en el macho es característica; el macho persigue a la hembra tratando de montarla, si la hembra está en celo acepta la monta, esta actividad es larga pudiendo durar hasta 50 minutos, el macho no se mostrará agresivo mientras este montando a la hembra (Sepúlveda, 2011). Observaciones en campo indican que alpacas y llamas machos, muestran un incremento de libido a medida que se acercaba la estación sexual (enero a abril), para luego disminuir notablemente en la época de secas (mayo a noviembre) (García *et al.*, 2005).

2.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACA

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y también las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino, la porción líquida de dicha suspensión, que se forma durante el eyaculado, se conoce como plasma seminal (Hafez y Hafez, 2002), el cual actúa como un vehículo para el transporte de espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino, nuevas investigaciones pusieron de relieve un papel importante del plasma seminal en la funcionalidad de los espermatozoides, la integridad y la capacidad de fertilización (Kershaw-Young y Maxwell, 2012b).

La composición bioquímica del plasma seminal de los camélidos ha sido descrita y tiene sales y azúcares a concentraciones similares al semen del carnero y de toro, la concentración de fructosa y ácido cítrico es mucho menor en el plasma

seminal de alpaca y camello en comparación con el carnero y toro, muy probablemente debido a la ausencia de las glándulas vesiculares en camélidos, que son la principal fuente de fructosa y ácido cítrico en otras especies (Vaughan *et al.*, 2003).

Se postula que los glicosaminoglicanos (GAG), puede ser la causa de la viscosidad son abundantes en el plasma seminal de alpaca. Sin embargo, las enzimas GAG no reducen la viscosidad, mientras que las proteasas si lo hacen, esto indica que las proteínas son responsables de la viscosidad observada en el plasma seminal (Kershaw-Young y Maxwell, 2012a).

2.3. COLECCIÓN DE SEMEN

La obtención de eyaculados de calidad en forma repetible es dificultoso en camélidos sudamericanos, debido no solo a la peculiar postura adoptada durante la cópula o la duración de la misma (5 a 60 minutos) han ocasionado en estas especies un retraso en el estudio de las características del semen, también a la necesidad de contar con la cooperación del macho y el método a seguir en la colección de semen, debe guardar relación con el comportamiento sexual de los machos dentro de cada especie (Giuliano, 2012).

Las técnicas de colección de semen están bastante desarrolladas en rumiantes domésticos en los cuales ya es un procedimiento de rutina, pero en camélidos, dadas las especiales características reproductivas, anatómicas y fisiológicas, la colección es bastante dificultosa y no existe un protocolo recomendado y una técnica optima, así como su manejo posterior (Pacheco, 2008).

2.3.1. Electroeyaculación

La colección de semen por electroeyaculación (EE), introducido por Fernández-Baca y Calderón (1966), no fue usada por largos años debido a la contaminación de semen con orina y los efectos dolorosos de aplicar descarga

eléctrica dentro del recto del macho (Bravo *et al.*, 2013), sin embargo, este método de colección fue reintroducido por Director *et al.* (2007).

La electroeyaculación es un método alternativo de recolección de semen que no necesita de la cooperación del macho y que permite obtener eyaculados sin espuma y sin impurezas, de calidad igual o superior a los obtenidos mediante vagina artificial (VA), la desventaja de este método es la necesidad de profesionales y equipo especializado para realizar anestesia general, un protocolo correcto de preparación y estimulación eléctrica (Giuliano, 2012).

2.3.2. Vagina artificial

Esta técnica fue desarrollada por Sumar y Leyva (1981), implementaron por primera vez en alpaca el uso de la vagina artificial (VA), quienes construyeron un maniquí en forma de una hembra en posición de cópula, basándose en el hecho de que los camélidos machos montan a toda hembra que esté en posición decúbito esternal, modificando la VA usada para vacunos y ovinos (Gonzales, 2008).

La utilización de VA en combinación con una hembra receptiva es la técnica óptima para obtener semen de buena calidad, usado con fines de IA, teniendo en cuenta de usar una fuente de calor continuo y la característica que imite a la cerviz (Vaughan *et al.*, 2003).

La extracción de semen con VA presenta la ventaja de no necesitar un equipo de costo elevado y que puede ser llevado a cabo por técnicos especializados y la principal desventaja que presenta es que se necesita contar con cierta cantidad de días dedicados al entrenamiento de los machos (Giuliano, 2012).

2.3.3. Desviación de conductos deferentes

Con el fin de obtener espermatozoides libres de secreción de las glándulas anexas, se desarrollaron técnicas donde los espermatozoides se colectan directamente de su reservorio (la cola del epidídimo), desviando quirúrgicamente

los conductos deferentes hacia la cara interna del muslo, formando un punto de colección permanente en la piel, desde donde se puedan coleccionar continuamente sin la necesidad de tener hembra receptiva (Paricahua, 2001; Quintano, 2001).

La ventaja de usar espermatozoide de epidídimo o del conducto deferente, consisten en que estas células presentan movilidad progresiva y el manejo en el laboratorio es sencillo por la ausencia de viscosidad característica del plasma seminal y la desventaja es que estos protocolos se utilizan en espermatozoides provenientes de animales de matadero (espermatozoides epididimarios) o que con el tiempo inutilizan reproductivamente al macho (canalización de los conductos deferentes) (Giuliano, 2012).

Teniendo en cuenta las características, ventajas y desventajas de los métodos de extracción de semen, los métodos de EE y VA serían los adecuados para implementar protocolos de evaluación, investigación, inseminación artificial y producción de embriones in vitro (Giuliano, 2012).

2.4. EVALUACIÓN DEL SEMEN

Existe alta variabilidad de las diferentes características seminales evaluadas entre diferentes machos y época de colección, es así como los mejores resultados fueron obtenidos durante la época de lluvia (Huanca *et al.*, 2011).

2.4.1. Características macroscópicas

a. Color

El color de los eyaculados varía según la concentración de espermatozoides, de blanco lechoso a blanco cristalino (cuadro 1), y al grado de contaminación con otros fluidos, asimismo el color puede ser modificado por la presencia de elementos anormales (Sumar y Leyva, 1981). El color blanco lechoso y sus tonalidades provienen de la secreción de las glándulas anexas, en cambio las tonalidades de

color crema nos indicarían la presencia de concentraciones altas de espermatozoides en los eyaculados (Paricahua, 2001).

Cuadro 1. Color espermático de alpacas colectado por desviación de conducto deferente (DCD) y electroeyaculación (EE).

Método de colección	Color predominante	Autor
DCD	100% de blanco cremoso.	Paricahua (2001), Cárdenas (2002)
DCD	77.78% de blanco transparente.	Quintano (2001)
DCD	40% de blanco lechoso y 40% de blanco cristalino.	López (2014), Meza (2014)
DCD	100% de blanco lechoso.	Pérez <i>et al.</i> (2014)
DCD	60% de blanco lechoso.	Quispe (2015b)
DCD	50% de blanco lechoso.	Calderón (2015)
EE	58.33% de blanco lechoso intenso.	Cayo (2013)
EE	66.67% de blanco lechoso.	Franco (2015)
EE	66.67% de blanco cristalino.	Quispe (2015a)

Fuente: Elaboración propia.

b. Volumen

El volumen de semen varía según la especie animal, dentro de una misma especie, según el estado fisiológico del macho, la edad, tamaño, número y tipo de colección, por factores higiénicos y alimentarios. A diferencia del carnero y toro, en camélidos aproximadamente el 85% de la eyaculación es el plasma seminal y las células de espermatozoides son el 15% restantes (Garnica *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 1997).

En alpacas, los testículos promedio son de 3 - 5 cm de longitud y 15 - 18 gr de peso, que equivale a 0.02 – 0.03% del peso corporal en comparación con el 0.18% en los toros y el 1.4% en los carneros (Vaughan *et al.*, 2003). En consecuencia, los camélidos producen menos espermatozoides al día en comparación con el carnero y toro (Kershaw - Young y Maxwell, 2012a). En alpacas el volumen de semen varía de acuerdo con el método de colección (cuadro 2), se reporta valores de 0.035 – 0.48 ml por DCD, de 1.0 - 1.63 ml por el método de EE y de 1.17 - 4 ml por VA.

Cuadro 2. Volumen y pH de semen de alpaca colectado por desviación de conducto deferente (DCD), electroeyaculación (EE) y Vagina artificial (VA).

Método de colección	Volumen (ml)	pH	Autor
DCD	0.48 ± 0.21	7.25 ± 0.26	Paricahua (2001)
DCD	0.09 ± 0.02	6.5	Quintano (2001)
DCD	0.09 ± 0.03	6.35 ± 0.23	Cárdenas (2002)
DCD	0.024 ± 0.011	-	López (2014)
DCD	0.021 ± 0.013	-	Meza (2014)
DCD	0.021 ± 0.011	-	Quispe (2015b)
DCD	0.035	-	Calderón (2015)
EE	1.4	-	Ordoñez <i>et al.</i> (2012)
EE	1.58 ± 0.76	-	Cayo (2013)
EE	1.63 ± 0.19	-	Franco (2015)
EE	1.63 ± 0.67	-	Quispe (2015a)
VA	1.24 ± 1.17	7.65 ± 0.66	Huanca <i>et al.</i> (2011)
VA	1.2 ± 0.7	7.74 ± 0.6	Gonzales <i>et al.</i> (2011)
VA	4.0	-	Paucar (2011)
VA	1.5 ± 0.9	-	Alarcón <i>et al.</i> (2012)
VA	1.62 ± 1.82	7.54 ± 0.41	Huanca <i>et al.</i> (2012)
VA	1.17	-	Olaguivel y Naveros (2014)

Fuente: Elaboración propia.

c. pH

En las alpacas, los valores de pH proporcionados por varios autores se acercan mucho a la neutralidad con cierta tendencia a la alcalinidad ligera (cuadro 2). El pH aumenta en el semen contaminado con orina, sobre todo después de la electroeyaculación, y podría usarse el papel indicador para determinar si hay contaminación con orina (Sumar, 2002). El pH de semen de la alpaca está comprendido entre 7.1 a 8.3 y el de la llama entre 7.2 a 8.6 (Hanzen *et al.*, 2014).

d. Viscosidad y filancia

El semen de camélidos es altamente viscoso con una baja concentración de espermatozoides, esta viscosidad presente en el plasma seminal es el mayor impedimento sobre la investigación de la criopreservación de semen y otras

tecnologías reproductivas asistidas (Kershaw - Young y Maxwell, 2012b). Por otra parte, la filancia se define como la capacidad de formación de hilo y es, por lo tanto, una característica reológica diferente a la viscosidad (Giuliano, 2012). Debido a esta alta viscosidad del plasma seminal, el movimiento de los espermatozoides es lento (Sumar y Leyva, 1981).

Ordoñez *et al.* (2012) encontró 16.0 mm de filancia en semen de alpacas colectadas por EE. Ríos (2014) reporta 36.19 mm de filancia en semen de alpacas colectadas por aspiración vaginal. Naveros y Contreras (2014) encontraron 22.3 – 25.5 mm en semen de alpacas macho obtenido por VA. Olaguivel y Naveros (2014) encontraron una filancia de 37.3 mm para semen normal y 5.0 mm para semen tratado con colagenasa, en muestras obtenidas de alpacas por VA.

2.4.2. Características microscópicas

La valoración microscópica tiene gran importancia porque nos permite determinar la verdadera calidad del semen, necesaria para implementar planes de manejo reproductivo y los métodos tradicionales de estimación de la calidad del eyaculado en diferentes especies se han basado principalmente en la evaluación de la movilidad individual, la morfología espermática y el número total de espermatozoides (Giuliano, 2012).

a. Motilidad Espermática

La motilidad de los espermatozoides es un elemento importante para apreciar la calidad y observar el grado de energía de estos, es determinada inmediatamente a la colección para ver la intensidad del movimiento espermático (Sumar y Leyva, 1981). El porcentaje de espermatozoides motiles es considerado como un indicativo de la viabilidad celular y un método indirecto de evaluar la actividad metabólica (Juyena, 2011).

En alpacas debido a la alta viscosidad del plasma seminal, no es posible observar la “motilidad masal” (no hay remolinos) y la motilidad progresiva individual es muy lenta comparado al espermatozoide de ovino y bovino (Sumar, 2002). Bustinza (2001) recomienda usar solamente eyaculados con una motilidad igual o mayor a 60% para realizar la criopreservación de semen de alpacas.

Para semen de alpacas obtenido por vagina artificial, Olaguivel y Naveros (2014) evaluaron la motilidad, obteniendo un promedio de 22.38% y 40.60%, para eyaculados sin colagenasa y con colagenasa, respectivamente; encontrando diferencia significativa para el grupo de colagenasa ($p \leq 0.05$) y la motilidad post descongelación tuvo un promedio de 12.50% y 24.57% para el grupo control y la colagenasa respectivamente, existiendo diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Cuba (2000) colectando muestras de semen de alpaca por vagina artificial y tratado con colagenasa obtuvo una motilidad en semen fresco de 76.94%, refrigerado 66.67%, equilibrado 62.78% y 34.10% de motilidad en semen descongelado.

b. Concentración espermática

Es muy importante determinar de forma precisa del número de espermatozoides, para de esta forma calcular el número de hembras que pueden ser inseminadas, esta expresada como el número de células espermáticas por ml, es una característica muy variable que depende de la secreción de testosterona por los testículos, aumenta con la edad y tamaño del animal igualmente modificado por factores como la alimentación, edad, salud, tamaño testicular, importante (Hafez y Hafez, 2002).

La concentración espermática en alpacas varía de 30 000 a 150 millones de espermatozoides/ml y varía considerablemente entre machos, eyaculados y procedimiento de colección de semen (Vaughan *et al.*, 2003).

La alta concentración espermática en muestras colectadas por DCD es debido a que son puramente espermatozoides y están exentos de secreciones de las glándulas bulbouretrales y de la próstata (Cárdenas, 2002), para este método de colección, la concentración espermática va de 139 - 346 millones de espermatozoides/ml (cuadro 3).

Cuadro 3. Concentración, motilidad y vitalidad espermática del semen de alpacas colectada por desviación de los conductos deferentes (DCD), electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA).

Método colección	Concentración (10 ⁶ /ml)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	Autor
DCD	-	-	86.25	Paricahua (2001)
DCD	238.7 ± 44.3		62.47 ± 12.52	Quintano (2001)
DCD	263.67 ± 90.69	68.34 ± 7.61	67.08 ± 10.04	Cárdenas (2002)
DCD	-	56.60 ± 8.55	49.85 ± 9.19	Quintanilla (2009)
DCD	346.26 ± 154.04	44.25 ± 26.27	-	López (2014)
DCD	252.57 ± 123.72	32.57 ± 15.94	64.30 ± 9.54	Meza (2014)
DCD	151.03 ± 70.59	17.03 ± 9.76	74.5 ± 7.64	Quispe (2015b)
DCD	139.64 ± 96.71	23.08 ± 14.57	81.81 ± 7.13	Calderón (2015)
EE	62.0	16.05		Ordoñez <i>et al.</i> (2012)
EE	84.08 ± 62.92	55.42 ± 8.15	59.2 ± 7.87	Cayo (2013)
EE	36.51 ± 11.68	57.96 ± 15.71	-	Franco (2015)
EE	21.69 ± 30.78	20.73 ± 22.04	-	Quispe (2015a)
VA	80.48 ± 69.35	45.9 ± 26.1	52.32 ± 19.18	Huanca <i>et al.</i> (2011)
VA	141.0 ± 86.0	51.3 ± 22.5	-	Gonzales <i>et al.</i> (2011)
VA	87.99	70.72	71.72	Paucar (2011)
VA	80.3 ± 25.5	69.0 ± 14.4	70.8 ± 12.7	Alarcón <i>et al.</i> (2012)
VA	71.87 ± 97.46	41.4 ± 28.3	-	Huanca <i>et al.</i> (2012)
VA	110.18 – 112.36	58.36-62.73	78.27–84.45	Olaguivel y Naveros (2014)

Fuente: Elaboración propia.

c. Vitalidad Espermática

Sorensen (1991) indica que los espermatozoides vivos no permiten el ingreso de colorantes supra vitales, mientras que los muertos los absorben; es decir

la membrana espermática representa una barrera al paso de las mencionadas tinciones al medio celular.

El porcentaje de espermatozoides vivos se determina coloreando una muestra de semen con tinción de eosina – nigrosina, considerando espermatozoides vivos aquellos donde el colorante no penetró en la cabeza (Alarcón *et al.*, 2012).

Se ha utilizado el porcentaje de espermatozoides vivos en una muestra como verificación de la motilidad y este valor siempre será mayor que el porcentaje de motilidad. En la práctica se debe considerar a los espermatozoides vivos pero anormales como muertos, para determinar el porcentaje de vivos normales (Giuliano, 2012).

d. Morfología y morfometría espermática

La morfología del espermatozoide es un componente esencial de la evaluación seminal, en muchas especies la disminución del porcentaje de espermatozoides normales esta correlacionado con una disminución de la fertilidad (Ordoñez *et al.*, 2012).

Al evaluar la morfología espermática encontramos diferentes formas de espermatozoides. Las formas normales se agrupan en los que tienen cabeza normal y flagelo completamente entero y no enrollado, presentan en promedio una longitud de cabeza de 5.47 μm , un ancho de cabeza de 3.4 μm , una longitud caudal de 40.94 μm y una longitud total de 46.03 μm respectivamente (Gonzales, 2008).

e. Funcionalidad de membrana espermática

Jeyendran *et al.* (1984) indican que la evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide es importante para evaluar la fertilidad del macho y una membrana integra es fundamental para el metabolismo

espermático y una adecuada capacitación y reacción acrosómica al momento de la fecundación.

La prueba de endosmosis (*HypoOsmotic Swelling Test*, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con el medio externo, para tener esta respuesta la membrana plasmática del espermatozoide debe estar integra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (Jeyendran *et al.*, 1984).

El hinchamiento y enrollamiento del flagelo provocado por la entrada de agua en las células con la membrana funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo (Quinteros-Moreno, 2003).

Vásquez *et al.* (2012) aplicaron la prueba hipoosmótica en espermatozoides epididimarios de alpaca, encontrando una reacción espermática del 60% en una solución hipoosmótica de 150 mOsm/kg durante 15 minutos de incubación a 37 °C.

Pacheco *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la osmolaridad de distintas soluciones y la presencia o no del plasma seminal sobre la respuesta al test hipoosmótico en espermatozoides de alpaca, utilizando espermatozoides colectados por VA y DCD, e incubando en una solución hipoosmótica de 50, 100 y 150 mOsmol a 37 °C por 30 minutos. La reacción de endosmosis para espermatozoides colectados por DCD fue de 53.37, 38.96 y 21.51% en soluciones de 50, 100 y 150 mOsmol respectivamente y la reacción endosmótica para espermatozoides colectados por vagina artificial fue de 73.87, 55.80 y 18.73% para soluciones de 50, 100 y 150 mOsmol respectivamente.

Quispe (2015b) al evaluar la reacción hipoosmótica de espermatozoides de alpacas colectado por DCD, no reporta diferencias ($p > 0.05$) al comparar dos tiempos de exposición (5 y 15 minutos) para la reacción total al estrés hipoosmótico,

mientras para soluciones de 100, 125, 150, 175 y 200 mOsm/kg reporta diferencias ($p < 0.01$) entre estas, teniendo mejor respuesta las soluciones de 100, 125, 150 para 5 y 15 minutos de exposición.

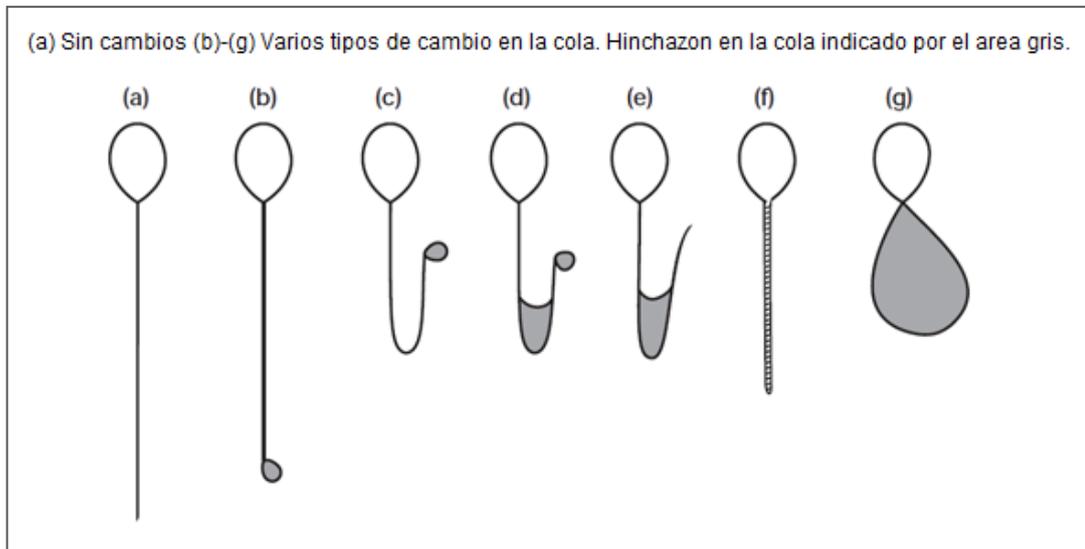


Figura 1. Representación esquemática de típicos cambios morfológicos en espermatozoides humanos sometidos a estrés hipoosmótico.

Fuente: Adaptado de Jeyendran *et al.* (1984) por Mellisho (2010).

Debido a que los espermatozoides de CS no presentan movilidad progresiva, es necesario determinar si en el eyaculado existe una población de espermatozoides inmóviles con las membranas funcionales e íntegras, por lo tanto, el porcentaje de movilidad espermática no sería un estimador de la calidad del eyaculado y que la presencia de espermatozoides inmóviles o con poca movilidad sería una condición inherente de estas especies (Giuliano, 2012).

2.5. SISTEMA COMPUTARIZADO DE ANÁLISIS SEMINAL

Quinteros-Moreno (2003) indica que los sistemas computarizados de análisis espermático (*Computer Assisted Sperm Analysis, CASA*, por sus siglas en inglés) están en el mercado desde hace décadas, y menciona a Dott y Foster (1979) quienes fueron los primeros en proponer este sistema, basándose en la toma de fotografías sucesivas y medición de imágenes.

Jasko *et al.* (1990) señalan que el estudio de la motilidad, la concentración, la morfología y morfometría espermática que anteriormente se hacían de una manera subjetiva, hoy en día se puede realizar mediante el uso de métodos computarizados, y la implementación de estos métodos disminuye en gran medida el factor subjetivo del análisis seminal (citado por Rodríguez, 2013).

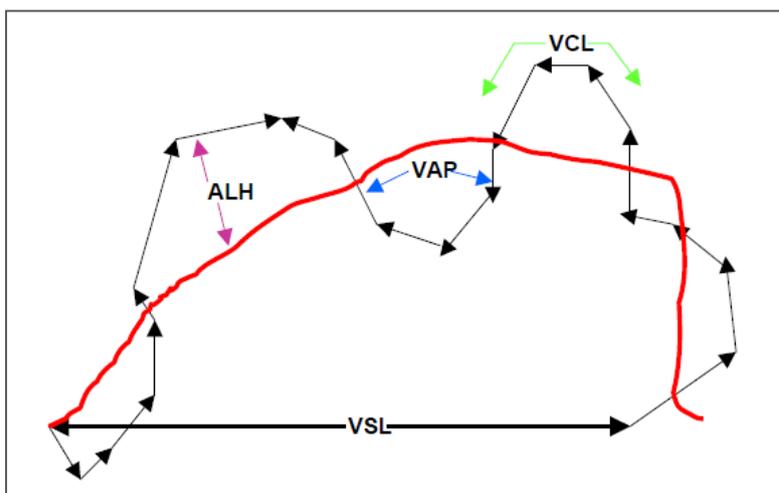


Figura 2. Parámetros de motilidad obtenidos por el CASA.

Fuente: Quinteros-Moreno (2003).

2.5.1. Integrated Semen Analysis System

Es un sistema CASA basado en el análisis de imágenes, hecha por la empresa Projects i Serveis R+D S.L. (PROISER), que fue fundada en el 2004 por un equipo de desarrolladores de sistema CASA (SCA 96, SCA 98 y SCA 2002), con más de 15 años de experiencia en análisis seminal por análisis de imagen por computadora. El *Integrated Semen Analysis System* (ISAS) puede ser considerado como el más completo y como el sistema más fácil de usar en el mercado, que además trabaja en diferentes condiciones de hardware y sistema operativo.

2.5.2. Características seminales que evalúa el ISAS

a. Motilidad y concentración espermática

PROISER (2010) indica que el módulo de motilidad del ISAS realiza un análisis automático de la motilidad y la concentración espermática en tiempo real;

además el sistema ofrece una amplia gama de parámetros cinéticos (figura 2; cuadro 4).

Cuadro 4. Tipo de motilidad y parámetros cinéticos de velocidad espermática evaluada en ISAS.

Parámetro	Unidad	Descripción
Según el tipo de motilidad del espermatozoide		
Estáticos	%	Son todos los espermatozoides que no muestran movimiento alguno.
Móviles no progresivos	%	Son todos los espermatozoides que muestran movimiento, pero no es progresivo.
Móviles progresivos	%	Son todos los espermatozoides que muestran movimiento progresivo.
Parámetros Cinéticos de Velocidad		
Velocidad Curvilínea (VCL)	µm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
Velocidad Rectilínea (VSL)	µm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide del primer punto al último punto de su trayectoria
Velocidad Media (VAP)	µm/s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media.
Índice de Linealidad (LIN)	%	Relación porcentual entre la VSL y VCL.
Índice de Rectitud (STR)	%	Relación porcentual entre la VSL y VAP.
Índice de Oscilación (WOB)	%	Relación porcentual entre la VAP y VCL.
Amplitud del Desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH)	µm	Desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
Frecuencia de Batida de la Cabeza (BCF)	Hz	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo.

Fuente: Quinteros-Moreno (2003).

Los valores de motilidad y parámetros cinéticos de velocidad de espermatozoides de alpaca determinados por el ISAS, se muestra en los cuadros 5 y 6.

b. Vitalidad espermática

El módulo de vitalidad del ISAS realiza un análisis automático del porcentaje de células viables en la muestra, para lo cual utiliza técnicas de fluorescencia como la tinción de DuoVital (naranja de acridina y yoduro de propidio, como fluorocromos) y otras como la tinción de Eosina-Nigrosina o simplemente la prueba de HOST.

Cuadro 5. Motilidad de espermatozoides móviles progresivos (EMP) y móviles no progresivos (EMNP) en semen fresco de alpacas evaluados en ISAS.

Autor	Tipo de colección	EMP (%)		EMNP (%)	
		Media	± DS	Media	± DS
Cayo (2013)	EE	3.488	3.540	49.125	21.591
Franco (2015)	EE	2.365	5.762	55.593	14.400
Quispe (2015a)	EE	0.93	1.41	20.46	22.11
López (2014)	DCD	3.11	1.22	41.14	25.25
Meza (2014)	DCD	2.723	1.146	29.851	14.953
Quispe (2015b)	DCD	0.275	0.398	16.883	9.603
Calderón (2015)	DCD	2.043	1.629	21.04	13.284

EE: electroeyaculación; DCD: desviación de conducto deferente

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 6. Parámetros cinéticos de velocidades de espermatozoides de alpaca evaluadas en el ISAS.

Parámetros de velocidad	Ordoñez <i>et al.</i> (2012)	Franco (2015)	Quispe (2015a)	López (2014)	Calderón (2015)
	EE	EE	EE	DCD	DCD
VCL (µm/s)	68.23 ± 17.73	42.30 ± 15.57	47.38 ± 25.53	59.3 ± 14.9	57.17 ± 15.84
VSL (µm/s)	19.92 ± 8.14	9.21 ± 5.15	6.79 ± 2.76	14.9 ± 3.9	14.27 ± 4.65
VAP (µm/s)	38.22 ± 13.36	23.78 ± 9.99	18.81 ± 8.33	30.9 ± 7.9	29.89 ± 6.54
LIN (%)	52.97 ± 14.56	24.02 ± 13.35	22.44 ± 18.95	25.2 ± 2.4	25.06 ± 4.23
STR (%)	29.35 ± 9.89	43.16 ± 22.25	42.09 ± 17.74	48.3 ± 3.3	47.02 ± 7.58
WOB (%)	56.64 ± 15.35	56.78 ± 11.00	47.51 ± 16.98	52.2 ± 3.0	53.67 ± 7.24
ALH (µm)	2.78 ± 1.27	0.38 ± 0.71	0.13 ± 0.21	2.5 ± 0.5	2.01 ± 0.94
BCF (Hz)	7.64 ± 2.90	1.35 ± 2.85	0.28 ± 0.50	3.5 ± 1.4	2.41 ± 1.41

EE: electroeyaculación; DCD: desviación de conducto deferente

Fuente: Elaboración propia.

c. Morfología y morfometría espermática

Soler *et al.* (2005) indica que el módulo de morfometría del ISAS realiza un análisis automático de la morfología y la morfometría espermática a partir de muestras teñidas; además el análisis morfométrico que realiza el ISAS aporta un total de 14 parámetros (cuadro 7) como: tamaño (longitud, anchura, perímetro y área) y forma de la cabeza (elipticidad, elongación, rugosidad, y regularidad),

porcentaje del acrosoma, nivel de color de la cabeza, tamaño (área y anchura) e inserción (ángulo y distancia) de la pieza intermedia (figura 3).

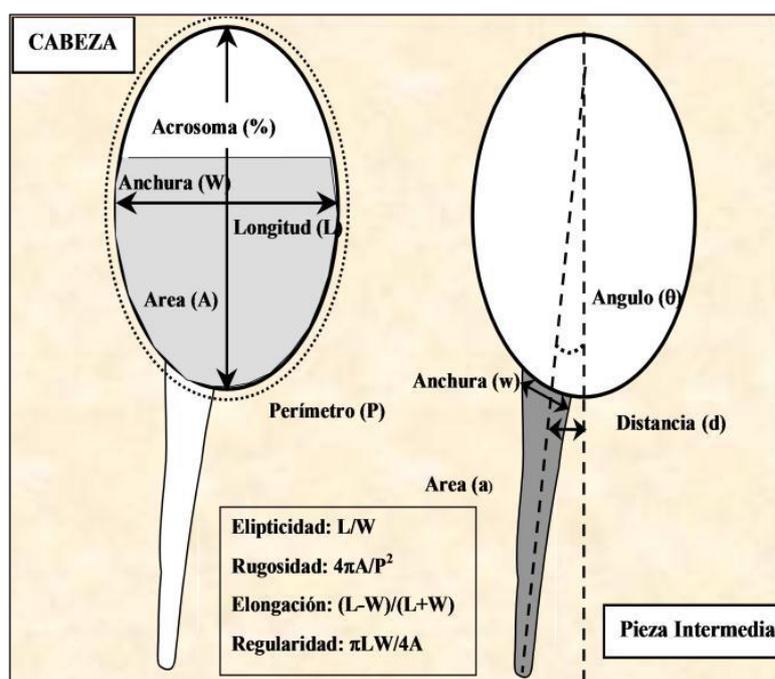


Figura 3. Parámetros de evaluación morfométrica del espermatozoide de llama.

Fuente: Soler *et al.* (2005).

Cuadro 7. Parámetros de evaluación morfométrica del espermatozoide de alpaca determinadas en el ISAS.

Parámetros morfométricos	López (2014)	Calderón (2015)	Ordoñez <i>et al.</i> (2012)	Franco (2015)
	DCD	DCD	PC	EE
Largo (µm)	5.888 ± 0.463	5.624 ± 0.455	5.888 ± 0.619	5.839 ± 0.585
Ancho (µm)	3.161 ± 0.343	3.110 ± 0.291	3.499 ± 0.326	3.155 ± 0.344
Área (µm²)	15.205 ± 1.791	14.337 ± 1.885	15.024 ± 1.805	15.026 ± 2.417
Perímetro (µm)	17.333 ± 1.585	15.963 ± 1.243	17.525 ± 1.444	16.934 ± 1.474
Acrosoma (%)	55.983 ± 5.805	58.712 ± 5.382	46.577 ± 9.964	-
Elipticidad *	1.886 ± 0.264	1.823 ± 0.212	1.697 ± 0.235	1.867 ± 0.238
Rugosidad *	0.642 ± 0.082	0.707 ± 0.053	0.619 ± 0.075	0.658 ± 0.061
Elongación *	0.302 ± 0.060	0.288 ± 0.051	0.253 ± 0.063	0.298 ± 0.057
Regularidad *	0.961 ± 0.048	0.960 ± 0.044	1.080 ± 0.112	0.966 ± 0.045
Ancho PI (µm)	1.201 ± 0.457	1.063 ± 0.398	1.767 ± 0.466	-
Área de PI (µm²)	3.082 ± 0.783	2.552 ± 0.725	3.657 ± 0.997	-
Distancia Inserción	0.198 ± 0.147	0.170 ± 0.120	0.242 ± 0.198	-
Angulo Inserción	8.223 ± 6.742	8.166 ± 8.25	7.848 ± 5.806	-

*: Variables no dimensionales; PI: Pieza Intermedia.

Fuente: Elaboración propia

2.6. PROCESAMIENTO DE SEMEN

El procesamiento de semen consiste en varias etapas, que comprende desde la dilución hasta obtener el semen descongelado.

2.6.1. Dilución

La evaluación macroscópica y microscópica del semen es con el fin de determinar su calidad y para determinar el número de dosis que se pueden obtener de un eyaculado, garantizando su eficiencia. Para hacer una adecuada dilución se utiliza la concentración, el volumen del semen, el porcentaje de espermatozoides vivos, muertos y los anormales (Bustinza, 2001). Una pajilla de 0.5 ml con semen diluido debe contener entre 10 a 16 millones de espermatozoides (Cuba, 2000; Cárdenas, 2002; Alarcón *et al.*, 2012; Cayo, 2013).

2.6.2. Enfriamiento - refrigerado

Para el proceso de refrigeración se necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura, como la yema de huevo (Choez, 2010). La refrigeración es la disminución de la temperatura para lograr la inmovilidad o casi inmovilidad. Se logra enfriando gradualmente hasta 4 - 5 °C en un tiempo de 2 – 2.5 horas (Baca, 1998; Cuba, 2000).

2.6.3. Adición de crioprotector y envasado

Las pajillas de cloruro de polivinilo (de 0.25 - 0.50 ml) son las más difundidas por sus ventajas de ocupar menos área de almacenamiento, mejor supervivencia, mejores índices de concepción y buena congelación. Es recomendable la adición del dilutor más el crioprotector, en tres fracciones iguales cada 15 minutos (Baca, 1998; Cuba, 2000)

En un experimento con espermatozoides del epidídimo, se investigó la congelación de semen en pellets y pajuelas, obteniendo mejor recuperación en espermatozoides congelados en forma de pellets (Morton y Maxwell, 2006).

El semen diluido puede ser envasado en forma de pellets (Franco, 2015) y en pajuelas francesas de 0.25 ml (Cuba, 2000) y 0.5 ml (Cárdenas, 2002; Aller *et al.*, 2003; Cayo, 2013; Quispe, 2015a) y sellado con alcohol polivinílico.

2.6.4. Proceso de equilibrado, congelación y almacenamiento

El tiempo recomendado para el equilibrado es de 45 a 60 minutos y entre 4 – 5 °C de temperatura (Baca, 1998; Cuba, 2000; Aller *et al.*, 2013; Paucar, 2011; Cayo, 2013; Franco, 2015; Quispe, 2015a).

La congelación en forma horizontal se hace en un depósito de tecnopor, donde se vierte NL hasta una altura de 4 cm, donde las pajillas son colocadas en una gradilla a una altura de 4.5 cm por sobre el NL, y se congela con los vapores por 8 minutos y posteriormente sumergidas en NL (Cárdenas, 2002), posteriormente son transferidos a cilindros de plástico (globets) fijados en varillas de aluminio (portaglobets), estos a su vez dentro de las canastillas.

En el método vertical las pajillas son colocados en portaglobets y sujetando la parte superior del portaglobets con hilos a la altura del cuello del balón criogénico, evitando el contacto con el NL, de esta forma se utiliza solo el vapor del nitrógeno líquido por un tiempo de 20 minutos (Paucar, 2011; Cayo, 2013; Quispe, 2015a).

2.6.5. Descongelación

La descongelación se realiza a 35 °C durante 30 segundos (Aller *et al.*, 2003; Cárdenas, 2002), a 20 segundos (Paucar, 2011), por un minuto (Cuba, 2000), a 37 °C por 30 segundos (Cayo, 2013; Quispe, 2015a; Franco, 2015).

Cuba (2000) evaluó la motilidad y vitalidad de semen congelado a diferentes tiempos de descongelado: 24 horas, 7, 15 y 30 días, obteniendo una motilidad de

34.17, 33.89, 34.17 y 34.17% y una vitalidad de 54.69, 55.22, 54.36 y 54.81%, respectivamente, indicando que no hay diferencia ($p>0.05$) entre los diferentes tiempos de evaluación.

2.7. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA

En 1949 investigadores británicos Polge, Smith y Parkes informaron que los espermatozoides pueden ser protegidos de los riesgos de la congelación adicionándoles glicerol, el cual al agregarse a los diluyentes permite sobrevivir a los espermatozoides a temperaturas (-196 °C) extremadamente bajas (Choez, 2010).

El efecto de la criopreservación sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides es un factor que debe ser considerado en protocolos de tecnologías de reproducción asistida. La fertilidad del semen es el factor más importante para tener en cuenta para implementar nuevas técnicas o procedimientos en programas de IA (Aller *et al.*, 2003).

La conservación de estructuras espermáticas y de su capacidad fertilizante exige de reducción o interrupción reversible del metabolismo celular, esto se consigue mediante el uso de dilutores y la refrigeración o congelación que deprimen el metabolismo. Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir, en la célula espermática, daños letales o subletales los cuales comprometen su funcionalidad (Choez, 2010).

Se han utilizado la refrigeración y el congelamiento profundo de semen para preservar espermatozoides de alpaca y llama, sin embargo, los porcentajes de preñez han sido menores a los obtenidos en otras especies, aun cuando los espermatozoides conservan la movilidad y funcionalidad de sus membranas (Giuliano, 2012).

La conservación del semen en nitrógeno líquido tiene como objetivo fundamental prolongar la viabilidad de los gametos masculinos de forma indefinida, ya que a temperatura ambiente o de refrigeración los espermatozoides degeneran con cierta rapidez, debidos principalmente al agotamiento de las reservas energéticas (Hammerstedt *et al.*, 1990).

2.7.1. Diluyentes de semen

La conservación y el mantenimiento de la vitalidad de los espermatozoides ha sido mejorada en los últimos años con la ayuda de diversos dilutores utilizados en otros rumiantes, lo que ha mejorado enormemente los porcentajes de fertilidad encontrados en los diferentes trabajos de investigación realizados (Pacheco, 2008).

Bearden y Fuquay (2000) mencionan que, debido al daño producido en los espermatozoides durante su procesamiento y almacenamiento, los primeros investigadores de la inseminación artificial crearon los diluyentes de semen. Los cuales no solo tendrían que servir para aumentar el volumen del eyaculado, sino que también deberían proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento y extender su tiempo de vida (Hafez y Hafez, 2002).

Quintano (2001) menciona que en general un buen diluyente seminal debe ser isotónico con respecto al semen, tener capacidad buffer, proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento desde temperatura corporal a 5° C, proveer una adecuada combinación de nutrientes para los espermatozoides y estar libre de microorganismos infecciosos.

a. Componentes de los dilutores

Quintano (2001) menciona que los componentes básicos de los diluyentes son:

- Agua, que se comporta como solvente de los componentes similares y del diluyente.

- Sustancias disueltas iónicas, para mantener la osmolaridad y amortiguar el pH del medio.
- Sustancias orgánicas con capacidad para impedir el choque del frío (por lo general yema de huevo o leche).
- Agentes crioprotectores como glicerol.
- Azúcares simples como fuente de energía o di- y trisacáridos como crioprotectores adicionados.
- Aditivos tales como enzimas que pueden mejorar la fertilidad.
- Antibióticos para controlar el crecimiento microbiano.

b. Factores que pueden dañar los espermatozoides

Los factores que pueden alterar o dañar a los espermatozoides son:

- Oxígeno: es un factor que provoca excitación en los espermatozoides, que hace que se muevan, con lo que el movimiento los agota, eliminando sus reservas y causar muerte.
- Temperatura: el espermatozoide sale a una temperatura aproximada de 37 °C. de ahí para abajo se conserva bien; si bajamos hasta la congelación el aguante depende de la especie. Pero de 42 °C para arriba destruye totalmente a los espermatozoides, pues sus estructuras proteicas son destruidas.
- Acción de sustancias químicas: pueden provocar el llamado shock químico, estas sustancias puede estar como residuos en aparatos recolectores, que parece que puedan estar limpios, pero luego aparecen y reaccionan.
- Luz: la luz intensa, sobre todo el rayo de sol directo, debido al contenido de infrarrojos elimina los espermatozoides. La luz intensa activa al espermatozoide igual que el oxígeno, con lo que se fatiga y muere.

- pH: un pH alcalino provoca una excitación igual que el oxígeno. Un pH ácido paraliza al espermatozoide.
- Características del agua: se recomienda el uso de agua bidestilada sin agentes pirógenos. El agua de uso corriente es muy dañina.

c. Dilutores

Como los componentes bioquímicos del plasma seminal de camélidos son similares a otras especies de ganado doméstico, es razonable sugerir que los diluyentes de semen utilizado para la criopreservación de espermatozoides de especies como el carnero y el toro serían adecuados para el almacenamiento de semen de los camélidos. Sin embargo, a pesar de los intentos que utilizan lactosa, sacarosa, citrato - fructosa y basado en tampones, además de los dilutores comerciales disponibles comercialmente fabricados para otras (Bravo *et al.*, 2000).

La yema de huevo, leche y glicerol son los componentes más adicionados para la protección de los espermatozoides frente al descenso de temperatura. Las lipoproteínas presentes en la leche y la yema de huevo protegen a los espermatozoides del choque térmico (Pineda y Pinilla, 2007).

Sandoval (2005) el Tris por su capacidad amortiguadora, osmótica y el ser de baja toxicidad, aun en altas concentraciones, es empleado en la criopreservación de semen para, entre otros aspectos, neutralizar los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides.

Para llevar a cabo su misión el dilutor debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA), controlar el pH del medio (Bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (sales NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano mediante la adición de antibióticos (Avila, 2009).

La mejor supervivencia antes de la congelación y después de la descongelación se obtuvo para el semen congelado en el medio de lactosa (Morton y Maxwell, 2006).

El uso de los dilutores leche descremada, Tris y Tes no afecta los porcentajes de integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal durante el proceso de congelamiento/descongelamiento de espermatozoides de alpaca (Banda *et al.*, 2010).

Quintano (2001) utilizando tres dilutores: dilutor de base Tris, dilutor base Tris + 20% de yema de huevo y dilutor base Tris + 20% de yema de huevo + 5% de suero feta, obtuvo una motilidad en semen fresco de 65.6, 67.37 y 64.81% respectivamente y a las 6 horas (refrigerado) obtuvo 10.65, 56.29 y 58.31% de motilidad para espermatozoides recuperados por desviación de los conductos deferentes.

Paucar (2011) utilizando cuatro dilutores comerciales como: Andromed, Bioxcell, Camelidil, Sales de Tyroides, en la criopreservación de semen obtenido por vagina artificial y post-copula, reportando mejor respuesta en semen diluido con dilutor comercial Camelidil.

2.7.2. Crioprotectores de semen

Ashwood – Smith (1987) clasificaron los crioprotectores en dos grupos: alcoholes (etilenglicol, propilenglicol, glicerol) y amidas y sugirieron que un crioprotector ideal debe tener un bajo peso molecular, tener buena solubilidad en el agua y tener mínima toxicidad a los espermatozoides (Citado por Zimmermann, 2007). Por el hecho de que la mayoría de las amidas poseen menor peso molecular que el glicerol (peso molecular del glicerol es de 92, de la metilformamida es 59 y de la dimetilformamida es 73), tales agentes crioprotectores deben inducir menor

daño osmótica penetrando la membrana plasmática del espermatozoide más rápido (Zimmermann, 2007).

La criopreservación permite el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, por lo que es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil. El fin de los protocolos de criopreservación es el de obtener mejores resultados en relación con la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelamiento (Choez, 2010).

El uso de crioprotectores alternativos se ha planteado como una medida para disminuir el estrés osmótico durante el proceso de congelación de semen equino, ya que se ha reportado que el glicerol parece tener efectos tóxicos en espermatozoides de esta especie (Alvarenga *et al.*, 2005).

Varios experimentos se realizaron tanto con espermatozoides de eyaculado y de epidídimo, para determinar el diluyente óptimo, tasa de crioprotector para la congelación de semen de alpaca. Los espermatozoides del epidídimo responden mejor a la congelación y descongelación de la misma manera como el semen eyaculado, pero no están atrapados dentro del plasma seminal (Morton y Maxwell, 2006).

En un estudio para evaluar dos dilutores y dos crioprotectores en el congelamiento de semen de alpaca recogido por VA, licuados por acción mecánica, concluyo que el dilutor con leche descremada + yema + glucosa y el crioprotector etilenglicol brindaron los mejores resultados, donde la motilidad post-descongelación fue del 30% y una alta correlación con las estimaciones de espermatozoides vivos y la reacción del acrosoma y se recomienda su uso en la criopreservación de semen de alpacas (Santiani *et al.*, 2005).

Aller *et al.* (2003) usando 6% de glicerol y 8% de dimetilsulfoxido en la congelación de semen de llama, obtuvo resultados de 20.4% post descongelado con una motilidad individual de 54.3 % en semen fresco.

Choez *et al.* (2014) usaron un dilutor de leche descremada - yema de huevo y fructosa para la recuperación y dilución de los espermatozoides epididimarios de alpaca, y evaluaron diferentes concentraciones de tres crioprotectores (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 y 1.75 M), obteniendo resultados con porcentajes más altos de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal en los grupos congelados de 1 M con glicerol, etilenglicol y DMSO, encontrando una motilidad de 23.0, 6.8 y 22.0% respectivamente.

a. Glicerol

El glicerol, también conocido como glicerina o 1,2,3-propanotriol, es un compuesto alcohólico con tres grupos –OH (hidroxilos). Posee un aspecto de líquido viscoso, no tiene color, pero si un característico olor, además de un sabor dulce. Además, el glicerol es un compuesto higroscópico, lo que quiere decir que tiene la capacidad de ceder o absorber la humedad presente en el medio ambiente que lo rodea. Y es fácilmente soluble en agua, y se descompone en ebullición a una temperatura de 290 °C. Es un compuesto líquido a temperatura ambiente (a unos 25 °C).

El glicerol, por su bajo peso molecular le permite ingresar a la célula y reemplazar osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento. Esto combinado con una velocidad de congelamiento lenta disminuye la formación de cristales de hielo intracelulares (Salamon y Maxwell, 2000)

Garañones de baja congelabilidad aparentemente son más sensibles a un estrés osmótico inducido por glicerol, con relación a los garañones de alta

congelabilidad, en función de probables diferencias en la permeabilidad de la membrana plasmática. Los factores determinantes de estas variaciones deben estar relacionados a las variaciones de la composición de la membrana plasmática (Alvarenga y Papa, 2011).

En camélidos sudamericanos, el glicerol ha sido prácticamente el crioprotector más empleado en los protocolos de criopreservación, además la concentración óptima de glicerol utilizada en los diluyentes está limitada por su toxicidad que a su vez depende de la especie, de la tasa de enfriamiento y congelamiento, de la composición del diluyente y del método de adición al mismo (Carretero *et al.*, 2013)

b. Dimetilformamida

La dimetilformamida es un líquido casi incoloro, de elevado punto de ebullición, inflamable, fuertemente polar e higroscópico, con un leve olor a amoníaco. Es miscible en agua y en varios disolventes orgánicos.

Los compuestos derivados de amidas presentan una mayor protección celular debido a que son compuestos orgánicos con puntos de ebullición elevados, presentan excelentes propiedades disolventes y son bases muy débiles, además son compuestos polares y pueden unirse entre sí, mediante enlaces por puentes de hidrógeno; esta propiedad las hace capaz de formar en distintas condiciones el catión o el anión de una sal, constituyéndola en una molécula de tipo anfótero. Tiene un peso molecular de 73.09 gr/mol, la formula molecular es C_3H_7NO , su punto de fusión es $-60.5\text{ }^{\circ}C$ y el punto de ebullición es de $153\text{ }^{\circ}C$.

Las amidas demostraron mayor eficiencia en la congelación de semen de diversas especies animales y presentan resultados bastante favorables en los parámetros espermáticos evaluados, en especial en garañones que presentan resultados desfavorables con el uso de glicerol (Alvarenga *et al.*, 2000).

El bajo peso molecular de este agente comparado con el glicerol induce a un menor daño osmótico; Varner *et al.* (1987) indica que las características fisicoquímicas ideales que un agente crioprotector debe cumplir son: bajo peso molecular, alta solubilidad en medios acuosos, y principalmente baja toxicidad celular (Citado por Pineda y Pinilla, 2007)

Pineda y Pinilla (2007) reportan que se el uso del diluyente INRA – dimetilformamida – yema de huevo en la criopreservación de semen de caballo tiene mayor motilidad espermática (57.48%) que el diluyente Lactosa – glicerol – yema de huevo que presento una motilidad de 50.21%, obteniendo una diferencia significativa ($p < 0.05$) para porcentajes de motilidad y espermatozoides vivos entre los dos diluyentes.

Mesa (2010) en un estudio realizado en caballos criollos colombianos, al comparar la dimetilformamida con el glicerol se determinó que como agente crioprotector es una excelente alternativa para mejorar la motilidad espermática, la integridad de membrana y la viabilidad, reportando una motilidad espermática post-descongelado de 90.26% con DMFA y de 79.03% con glicerol encontrando diferencia altamente significativa ($p < 0.05$).

Restrepo *et al.* (2011) indican que el uso del glicerol y la DMFA en concentraciones de 5% proveen una protección similar del semen canino durante la criopreservación por congelación rápida.

Carretero *et al.* (2013) reportan que el semen de llama tratado con 0.1% de colagenasa y congelado en dilutor a base de lactosa, yema de huevo y 7% de dimetilformamida presenta un mayor porcentaje ($p \leq 0.05$) de movilidad espermática en comparación a la muestra congelada con diluyente a base de lactosa, yema de huevo y 7% de glicerol.

2.8. ANTECEDENTES DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA

En los últimos años se han venido realizando trabajos sobre el manejo de semen para su preservación, pero las características que presenta este tipo de muestra son muy desalentadoras, ya que la técnica de extracción seminal no ha sido estandarizada y sólo se obtienen eyaculados con bajo volumen, alta viscosidad y una baja concentración de espermatozoides.

Cuba (2000) colectando muestras de semen de alpaca por vagina artificial y tratado con colagenasa obtuvo una motilidad 34.10% de motilidad y 54.77% de espermatozoides vivos en semen descongelado, muestras congeladas en un dilutor base Tris + 25% de yema de huevo y 15 % de glicerol.

Cárdenas (2002) obtiene 35.10% de motilidad en muestras descongeladas, utilizando un dilutor base Tris + 30% de yema de huevo y 5% de glicerol.

Cuadro 8. Porcentaje espermatozoides móviles progresivos, móviles no progresivos y motilidad total en semen refrigerado y descongelado de alpacas.

Autor	Tipo de colección	Tipo de semen	EMP (%)	EMNP (%)	MT (%)
			Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
Cayo (2013)	EE	Refrigerado	5.90 ± 1.97	54.77 ± 3.17	60.67 ± 2.48
		Descongelado	1.48 ± 1.95	16.12 ± 6.86	17.59 ± 6.69
Franco (2015)	EE	Refrigerado	1.44 ± 2.38	45.50±18.82	46.94
		Descongelado	0.14 ± 0.33	15.55±11.05	15.69±11.21
Quispe (2015a)	EE	Descongelado	0.04 ± 0.12	10.53 ± 8.65	10.77 ± 8.67
Quispe (2015a)	PC	Descongelado	1.66 ± 0.63	15.24 ± 1.16	16.91 ± 0.99
Flores <i>et al.</i> (2015)	EE	Refrigerado	2.90 ± 2.50	31.80 ± 8.30	34.7 ± 9.4
		Descongelado	0.70 ± 0.76	9.70 ± 1.80	10.4 ± 2.2

EMP: Espermatozoides móviles progresivos; EMNP: espermatozoides móviles no progresivos; MT: motilidad total; PC: post-copula; EE: electroeyaculación.

Fuente: Elaboración propia.

Canorio (2008) encontró para espermatozoide descongelado 34.42% de motilidad en un dilutor Tes + Tris + 20% de yema de huevo + dimetilacetamida (0.375 M) y para el caso de dimetilsulfoxido (0.250 M) la movilidad presentaba un

valor promedio de 33.45%. Para vitalidad al descongelado encontró 55.32% para dimetilacetamida y 49.90% con dimetilsulfoxido.

Banda *et al.* (2010) en un estudio sobre el efecto de tres dilutores y tres crioprotectores diferentes (tris + 6% glicerol, tes + 0.375 M dimetilacetamida y leche descremada + 0.2 M etilenglicol) en la criopreservación de semen epididimario de alpaca, donde la motilidad obtenida con el grupo leche descremada fue significativamente mejor que el grupo Tes ($p < 0.05$) y estadísticamente similar al grupo Tris ($p > 0.05$); para semen congelado con dilutor tris + glicerol, reportan 14.0% de motilidad, 32.6% de vitalidad y 24.3% de integridad de membrana.

Paucar (2011) comparando cuatro tipos de dilutores (Camelidil, Bioxcell, Andromed y Sales de tyrodes) y glicerol como crioprotector, en la congelación de semen obtenido por PC y VA, muestra mejor resultado con uso de dilutor comercial camelidil para semen obtenido por PC, teniendo un valor superior en comparación al semen obtenido por VA, para semen equilibrado reporta 58.33% de motilidad y en semen descongelado obtuvo 17.78% de motilidad y 52.22% de vitalidad.

Cuadro 9. Parámetros cinéticos de velocidad de espermatozoides de alpaca colectados por electroeyaculación determinadas en ISAS.

Parámetros de velocidad	Flores <i>et al.</i> (2015)		Franco (2015)		Quispe (2015a)
	Equi.	Desc.	Refrig.	Desc.	Desc.
VCL ($\mu\text{m/s}$)	50.3 \pm 11.0	36.7 \pm 12.4	64.25	27.36	19.94
VSL ($\mu\text{m/s}$)	12.6 \pm 3.0	9.5 \pm 3.9	14.56	5.70	3.94
VAP ($\mu\text{m/s}$)	25.8 \pm 3.0	18.9 \pm 5.3	35.20	13.61	8.40
ALH (μm)	-	-	0.43	0.13	0.28
BCF (Hz)	-	-	1.82	0.30	0.74

Equi: Equilibrado; refrig: refrigerado; desc: descongelado.

Fuente: Elaboración propia.

Cayo (2013) utilizando un dilutor base Tris + 25% de yema de huevo + 7% de glicerol en la congelación de semen obtenido por EE, obteniendo valores de vitalidad de 53.33% en semen refrigerado y 39.00% en semen descongelado.

Zirena (2014) congelo muestras cuya motilidad inicial fue mayor a 35%, mediante dos tipos físicos de tratamiento de la viscosidad del semen, como la acción mecánica mediante pasaje de semen por aguja y la otra sometida a agitación manual, no encontró diferencia significativa entre tratamientos ($p>0.05$).

Terreros *et al.* (2015) trabajando con muestras epididimarias de alpaca con una motilidad inicial de 68.9% y probando el efecto de tres crioprotectores a una concentración final de 7%, obtuvieron mejores resultados de motilidad con uso de dimetilsulfoxido en la congelación de semen (31.1%) seguido de glicerol (23.9%) y etilenglicol (8.3%) y para la integridad funcional de la membrana espermática post-descongelación en la alpaca obtuvieron mayor reacción con uso de dimetilsulfoxido (28.7%), seguido de glicerol (26.4%) y etilenglicol (17.8%). La mayor respuesta a la fecundación *in vitro* se obtuvo en semen congelado con dimetilsulfoxido (46.6%).

Quispe (2015a) hizo la congelación de semen de alpaca colectado por EE y PC utilizando dilutor base Tris + 25% de yema de huevo + 7% de glicerol como crioprotector, obteniendo mayor viabilidad para semen obtenido por PC (cuadro 8), reportando 53.33% de vitalidad en semen refrigerado y 39.00% al descongelado.

Franco (2015) evaluó el efecto de la congelación de semen de alpacas colectado por electroeyaculación en forma de pellets y utilizando tres dilutores (Andromed, Triladyl y tris), obteniendo mejores resultados de motilidad utilizando el dilutor Triladyl (cuadro 8), en comparación a los dilutores Andromed y Tris.

Flores *et al.* (2015) utilizaron dos niveles de dimetilformamida (4 y 7%) en la congelación de semen de alpaca y no observaron diferencias significativas ($p>0.05$) en el porcentaje de espermatozoides MNP y MP entre el semen descongelado con 4 y 7%, pero observó mejor respuesta cuando fue usado 4% de dimetilformamida

(cuadro 8). Asimismo, evaluaron los parámetros cinéticos de velocidad en semen equilibrado y descongelado (cuadro 9).

Cuadro 10. Valores de motilidad, vitalidad y funcionalidad de membrana espermática en semen refrigerado y descongelado de alpaca.

Autor	Tipo de colección	Tipo de semen	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	HOST (%)
			Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
Zirena (2014)	VA	Refrigerado	47.47±20.59	62.17±13.40	38.50±11.16
		Descongelado	18.68±15.61	34.00±20.61	22.82±9.37
Ccalta (2017)	PC	Refrigerado	15.63±7.95	37.75±3.67	31.04±6.74
		Descongelado	8.28±2.40	17.37±1.93	13.10±4.76
Ccalta (2017)	DCD	Refrigerado	24.34±5.36	33.36±8.20	35.52±8.20
		Descongelado	9.34±3.10	16.56±8.88	14.92±1.07
Quispe (2018)	VA	Refrigerado	34.37±10.85	61.58±11.65	-
		Descongelado	4.94±2.27	44.97±9.43	41.31±5.74
Quispe (2018)	PC	Refrigerado	34.83±18.10	56.87±6.84	-
		Descongelado	9.65±29.31	39.07±9.70	47.17±9.52
García <i>et al.</i> (2017)	PC	Refrigerado	48.90±0.5	58.30±3.3	39.80±3.4

VA: vagina artificial; PC: post-copula; DCD: desviación de conductos deferentes.

Fuente: Elaboración propia.

Ccalta (2017) utilizando 1.5 mg de ciclodextrina cargada con colesterol (CLC) en el proceso de congelación de semen obtenido por DCD y PC obteniendo mejores resultados en comparación al grupo control y muestras tratadas con 3 mg de CLC, usando DMFA como crioprotector.

García *et al.* (2017) evaluaron la inclusión de dos tipos de yema de huevo (fresco y en polvo) sobre la respuesta a la inseminación artificial con semen refrigerado mantenido en dos diferentes tiempos (15 °C/8 h y 5 °C/24 h), no hallaron diferencia ($p>0.05$) entre el tipo de yema de huevo sobre la motilidad, viabilidad y HOST en espermatozoides mantenidos a 15 °C y 5 °C. En el cuadro 10, se muestra valores de semen refrigerado a 5 °C con uso yema de huevo fresco, donde se obtuvo mayor porcentaje de preñes (33.3%).

Quispe (2018) comparando dos tipos de congelación (rápida y lenta) de semen de alpaca obtenido por VA y PC, reporta diferencia significativa ($p < 0.05$) entre estos dos tipos de congelación, siendo los valores de curva de congelación rápida (cuadro 10) mejor que la curva de congelación lenta, las muestras de semen fueron diluidas en tris y congeladas con uso de 7% de DMFA.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en los meses de noviembre 2013 a diciembre 2014, se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS – La Raya, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicado en el Distrito de Marangani, Provincia de Canchis, Departamento de Cusco, en las coordenadas: 14°28.448' Lat. Sur, 71°02.753' Long. Oeste y una altitud de 4133 msnm (GPS Garmin© Oregón 300).



Foto 1. Instalaciones del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos
CICAS – La Raya

3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1. De los animales

Para la colección de semen, se utilizaron 06 alpacas macho de la raza Huacaya, tres machos con desviación de los conductos deferentes (DCD) y tres machos enteros para la colección de semen por electroeyaculación.



Foto 2. Grupo de alpacas macho utilizados para la colección de semen.

3.2.2. Equipos y materiales para la colección de semen

a. Equipos

- Electroeyaculador (ElectroJac5®).
- Ecógrafo (Agroscan ARL 575 de 5/7.5 MHz).
- Balanza tipo reloj (capacidad de 100 Kg).

b. Materiales

- Sogas.
- Jabón.
- Hoja de afeitar.
- Vaselina neutra.
- Xilacina (Dormi-Xyl®2, Agrovvet Market)
- Ketamina (Halatal KT, Montana)
- Jeringas de 5 y 10 ml.
- Jeringa de tuberculina.
- Aguja hipodérmica N° 21.
- Tubos Eppendorf
- Suero fisiológico.
- Papel toalla
- Tubos Falcón de 50 ml.
- Gel de ecografía
- Guante quirúrgico.
- Colchón.



Foto 3. Materiales para la colección de semen.

3.2.3. Equipos y materiales de laboratorio

a. Equipos

- Microscopio de contraste de fases, fluorescencia, platina térmica (UOP–UB200i) y videocámara (Proiser ISAS 782C) (foto 4).
- Computadora (con programa ISAS v.1.2).
- Baño maría (Ovan®).
- Refrigeradora.
- Termómetro digital (Multi - thermometer, -50 °C a +300 °C).
- Balanza digital de precisión (Highland-Adam Equipment, 120g x 0.001g).
- Thermocouple (OaktonTemp 10K).
- Medidor de pH Digital (METLER TOLEDO SevenCompact™ S220).
- Micropipeta de 10 µl y 100 µl (BOECO Germany SP Series).
- Micropipeta de 1000 µl (Jencons SEALPETTE).

b. Materiales

- Portaobjetos.
- Tubos Falcon de 15 y 50 ml.

- Cubreobjetos.
- Filtro de nylon (3.5", 25/PK - Agtech)
- Tips de 10, 100 y 1000 μ l.
- Tubos Ependorff.
- Pajillas de 0.5 ml.
- Globets y porta globets.
- Canastillas.
- Tanque de Nitrógeno (MVE).
- Corta pajillas.
- Termo descongelador.
- Hervidor eléctrico.
- Caja de tecnopor.
- Gradilla.



Foto 4. Microscopio de contraste de fases, fluorescencia, platina térmica, videocámara y computadora ejecutando el programa ISAS v.1.2.

c. Reactivos e insumos

- Tris ($C_4H_{11}NO_3 \geq 99.9\%$ - Trizma® base, Sigma-Aldrich).
- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7 \geq 99.0\%$ - Merk KGaA).
- Fructosa (D – Fructosa, $C_6H_{12}O_6 \geq 99.0\%$ - Merk KGaA).
- Glicerol ($C_3H_5(OH)_3 \geq 85.0\%$ - Merk KGaA).
- Dimetilformamida (N,N-Dimetilformamida, $C_3H_7NO \geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich).
- Citrato de Sodio Dihidratado (Calbiochem®, EMD Millipore Corp.).
- Agua bidestilada.

- Formaldehído al 40%.
- Yema de huevo.
- Colorante de Hancock (Hancock Stain, ARS).
- Kit de coloración Hemacolor® (Merck KGaA).
- Aceite de inmersión (Merck KGaA).
- Nitrógeno líquido.
- Alcohol polivinílico.
- Alcohol isopropílico.
- Alcohol de 96°.



Foto 5. Equipos utilizados: baño maría, medidor de pH digital y balanza de precisión.

3.2.4. Equipo y material de escritorio

- Lapiceros.
- Cuaderno.
- Calculadora.
- Cronómetro.
- Plumones indelebles.
- Cinta masking.
- Computadora con paquete estadístico (SAS v. 8).
- Cámara fotográfica.
- GPS (Garmin© Oregón 300).

3.3. INSTALACIONES

Se utilizó los ambientes del Laboratorio de Biotecnologías de la Reproducción del CICAS - La Raya y un corral con enmallado de alambres para el manejo de los machos, durante la colección de semen.

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Selección de los animales

Los animales fueron seleccionados del plantel de reproductores del CICAS-La Raya, con edad de entre 5 – 6 años, aparentemente sanos, sin problemas reproductivos, con fertilidad comprobada y que muestren respuesta a los métodos de colección de semen.

Para el método de colección por DCD se tenían cinco machos, con el conducto deferente desviado de las cuales se seleccionaron y codificaron tres machos y para la colección por EE se preseleccionaron cinco machos y de los cuales se escogieron y codificaron tres machos, por tener mejor respuesta a la colección.

3.4.2. Colección de semen

a. Colección de semen por el método de electroeyaculación

Esta actividad se realizó en un espacio protegido de la luz solar, se siguió con la metodología y técnica descrito por Director *et al.* (2007).

- Se hizo el registro de peso individual, para determinar la dosis de anestésico a utilizar.
- Medición de la distancia ano-próstata, determinado con la ayuda de un transductor ecográfico y una regla milimetrada.
- El día de la colección los animales fueron mantenidos en ayunas dentro de un cerco y fueron sedados con la aplicación de una solución de

Ketamina al 10% (3.5 – 4 mg/Kg PV) y una solución de Xilacina al 2% (0.2 mg/Kg PV), por vía intravenosa, con el fin de mantener sedado por un lapso promedio de 15 minutos.

- Una vez sedado, el macho fue colocado sobre un colchón en posición decúbito lateral y se hizo el lavado del prepucio con 20 ml de suero fisiológico temperado a 37 °C y también se hizo la limpieza de las heces presentes en el recto del animal.
- Para la estimulación eléctrica, la sonda fue lubricado con gel de ecografía y se introdujo cuidadosamente por el recto a la profundidad determinada anteriormente por el ecógrafo, ubicando los electrodos sobre la mitad caudal de la próstata. El voltaje fue aumentado gradualmente de 1 V hasta 12 V, alternando periodos de estimulación propiamente dicha de 3 segundos separados entre sí por intervalos de reposo de 1 segundo, la erección se logró entre 5 - 6 V y la eyaculación a 8 - 12 V.
- El eyaculado obtenido se mantuvo en baño maría a 37 °C, hasta el momento de la evaluación y posterior dilución.



Foto 6. Colección de semen por el método de electroeyaculación.

La frecuencia de colección por este método fue de una colecta por semana para cada macho, hasta completar con los eyaculados necesarios para la investigación. Un eyaculado con menor volumen, baja concentración de espermatozoides, alto contenido de plasma y presencia de orina, fueron descartados.

b. Recuperación de espermatozoides por Desviación de Conductos Deferentes

Para esta actividad se usó machos, a los que en trabajos anteriores se practicó la desviación de conductos deferentes. La colección de semen se realizó de la siguiente manera:

- Se trasladó a los animales a un lugar tranquilo y provisto de sombra.
- Primero se hizo la sujeción, derribo y la inmovilización del macho en posición de cubito lateral y se verificaba que la fistula o punto de colección, esté libre de pelos y si presentaba se afeitaba todo el borde de la fistula con una hoja de afeitar, agua y jabón.
- Para la recolección se realizó la limpieza de la fistula con papel toalla humedecido con suero fisiológico a 37 °C.
- Se hicieron masajes a nivel del testículo y epidídimo con el fin de estimular la salida de los espermatozoides por la fistula en forma de pequeñas gotas (foto 8), las que se aspiraron con una jeringa de tuberculina humedecida con 0.1 ml de predilutor (Anexo 1) y se depositó en un tubo eppendorf que contenía 0.3 ml de dilutor a 37 °C.
- Luego de la colección se aplicó vaselina neutra a la fistula, con el fin de evitar el secado y cierre de la misma.
- La muestra obtenida se mantuvo en baño maría a 37 °C hasta su evaluación y dilución posterior.

La recuperación de espermatozoides fue de un solo conducto en todos los machos.

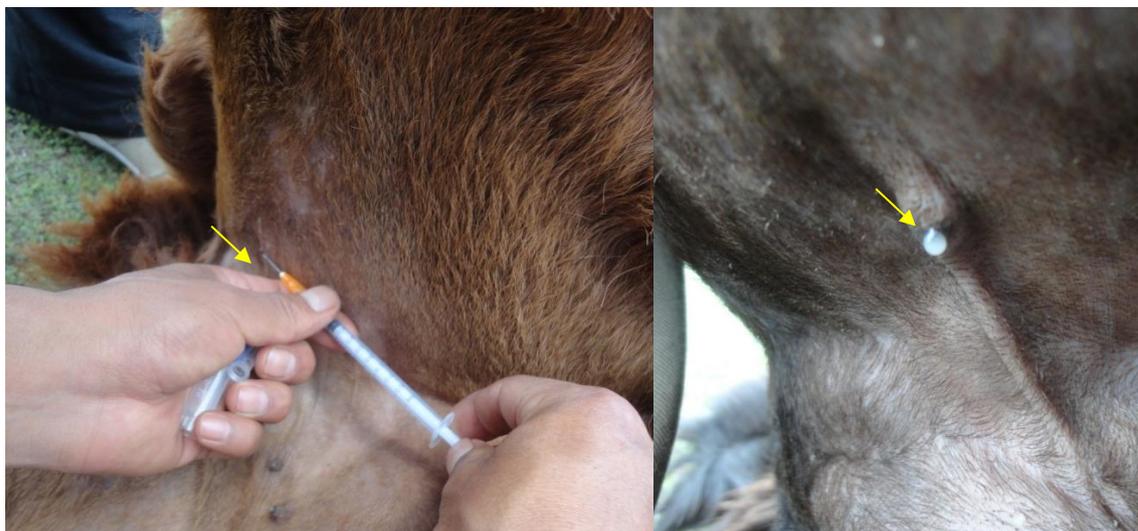


Foto 7. Recuperación de espermatozoides por el método DCD.

La frecuencia de colección aplicado a este método fue de una colecta por semana para cada macho, realizando las colectas hasta completar con las muestras necesarios para la investigación. Las muestras con baja concentración y con presencia de cuerpos extraños fueron descartados.

3.5. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL SEMEN DE ALPACA

La evaluación de las características macroscópicas del semen de alpaca obtenido por DCD y EE, se realizó inmediatamente después de la colección.

3.5.1. Volumen

Se determinó por observación directa, para semen colectado por EE se registró comparando con la escala graduada del tubo colector y fue expresado en ml (foto 8). Para la muestra obtenido por DCD, se siguió según indicado por López (2014) quien hizo una comparación del tamaño de gota observada en la fistula al momento de la colección, con una escala de gotas que va del 1 a 10 μ l en un portaobjetos, finalmente multiplicado por la cantidad de gotas colectadas (foto 9).

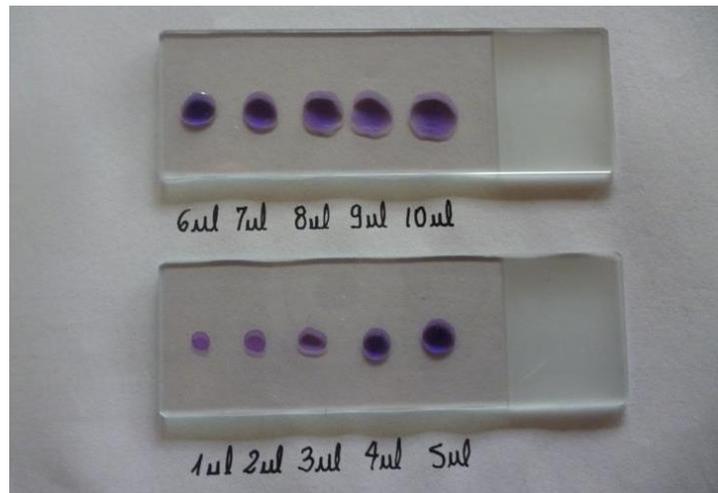


Foto 8. Patrón utilizado para determinar el volumen de espermatozoide colectado por DCD

Fuente: López (2014).

3.5.2. Color

Se determinó mediante la observación directa de las muestras, para EE se tomó en cuenta las tonalidades de blanco: lechoso, lechoso claro y cristalino (foto 9) y para DCD se tomó en cuenta el color de las gotas al momento de la colección (blanco lechoso y blanco cremoso).

3.5.3. Filancia

Para medir la filancia del semen, se aspiró 10 μ l de semen con una micropipeta, 5 μ l se depositaron sobre un portaobjetos y se levantó la micropipeta para observar el hilo de semen que forma, registrando con una regla milimetrada la distancia donde el hilo se rompe. Esta evaluación se realizó para semen colectado por EE, después de obtenido la muestra.

3.5.4. pH

Se determinó en un medidor de pH Digital, solamente se trabajó con muestras obtenidas por EE por poseer mayor volumen. Se utilizó 1 ml de muestra de semen que fue separada a un tubo de ensayo, luego se introdujo el electrodo

del medidor en la muestra y el equipo calcula automáticamente el pH. Se hizo una medición por cada muestra colectada.

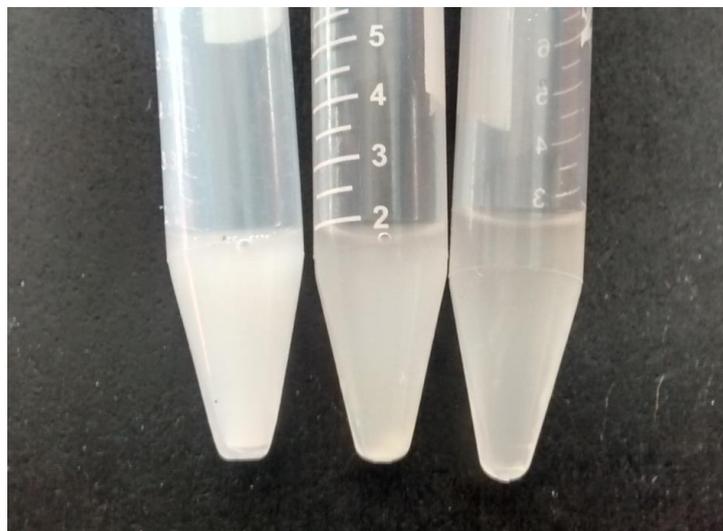


Foto 9. Evaluación del color y volumen de semen colectado por EE.

3.6. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN DE ALPACA

La evaluación de las características microscópicas del semen de alpaca colectado por el método de DCD y EE, se realizó en cuatro etapas:

Para el objetivo 01.

- Semen fresco: motilidad, concentración y vitalidad espermática.
- Semen refrigerado: motilidad y vitalidad espermática.
- Semen equilibrado: motilidad y vitalidad espermática.
- Semen descongelado: motilidad y vitalidad espermática.

Para el objetivo 02.

- Semen fresco: motilidad, concentración, vitalidad, morfometría y la funcionalidad de membrana espermática.
- Semen refrigerado: motilidad y vitalidad espermática.
- Semen equilibrado: motilidad y vitalidad espermática.
- Semen descongelado: motilidad, vitalidad, morfometría y la funcionalidad de membrana espermática.

La evaluación de la morfometría y funcionalidad de membrana espermática se evaluó al inicio, la mitad y al final de la etapa experimental.

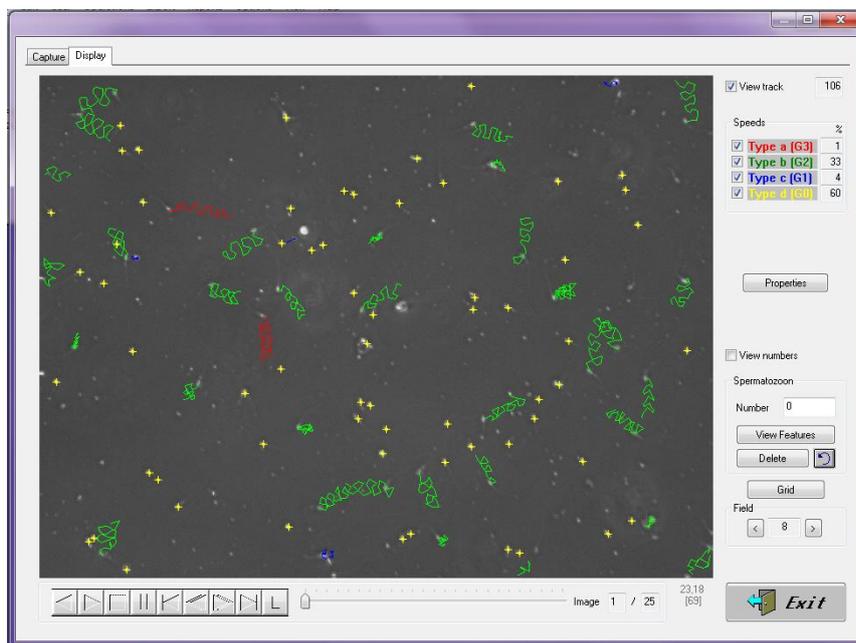


Foto 10. Fotograma de la motilidad espermática observada a través del ISAS.

3.6.1. Motilidad y concentración espermática

Para el análisis de la motilidad y la concentración se procedió a colocar 5 μ l de la muestra de semen en una lámina portaobjetos (temperada a 37 °C), luego fue cubierta con una laminilla cubreobjetos a la misma temperatura y observado con un objetivo de 10X de microscopio y analizada en el módulo de Motilidad del *Integrated Semen Analysis System* (ISAS® v.1.2), se tomaron 10 fotogramas con una configuración de 25 fotos/segundo (foto 10). Posteriormente los fotogramas se corrigieron ya que el programa reconoce otras partículas como espermatozoides lo que nos llevaría a errores (PROISER, 2010).

3.6.2. Vitalidad espermática

La vitalidad espermática se determinó por coloración vital de Hancock (tinción de eosina – nigrosina). Para esto, sobre un portaobjetos previamente identificado y calentado a 37 °C, se coloreó 10 μ l de semen con 10 μ l de colorante,

luego se homogenizó y después de 30 segundos se realizó el frotis (foto 11), dejando secar a temperatura ambiente. La muestra fue observada en un microscopio en un objetivo de 40X, en el módulo de vitalidad del ISAS, tomando entre 15 a 30 fotografías, se contaron un mínimo de 200 espermatozoides, considerando espermatozoides vivos aquellos donde el colorante no penetró en la cabeza (foto 11). Fue expresado en porcentaje de espermatozoides vivos.



Foto 11. Frotis de tinción de eosina nigrosina y campo microscópico para la prueba de vitalidad: espermatozoide vivo (verde) y muerto (rojo).

3.6.3. Morfometría espermática

La tinción para morfometría se hizo por el kit de coloración Hemacolor® (foto 12).

- Se realizó un frotis empleando 5 μ l de muestra, una vez secada fueron teñidas con la técnica de coloración de Hemacolor®, que consiste en:
 - Realizar 5 inmersiones de la muestra por 1 seg. en la solución 1 (solución de fijación, contiene metanol).
 - Realizar 3 inmersiones por 1 seg. en la solución 2 (reactivo de coloración rojo, contiene eosina 1.37g/l + PO_4^{3-}).
 - Realizar 6 inmersiones por 1 seg. en la solución 3 (reactivo de coloración azul, contiene azure 1.7 g/l + PO_4^{3-}).

- Realizar 2 inmersiones de 10 seg. en la solución 4 (solución tampón, con pH 7.2).
- La muestra se dejó secar en posición vertical a temperatura ambiente.
- La evaluación morfométrica fue visualizada en un objetivo de 100X bajo aceite de inmersión, en el módulo de morfometría del ISAS (foto 12), se capturaron un mínimo 200 cabezas de espermatozoides por muestra.

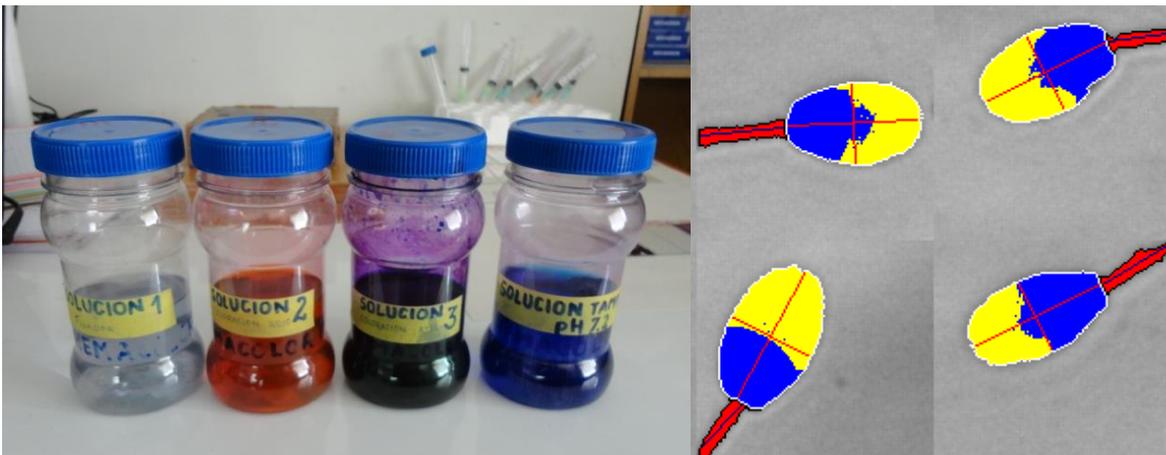


Foto 12. Kit de tinción Hemacolor® y espermatozoides capturados en el módulo de morfometría del ISAS.

3.6.4. Funcionalidad de la membrana espermática

Esta evaluación se realizó con la prueba de HOST (*Hipo Osmotic Swelling Test*), que consiste en la exposición de los espermatozoides en un medio hipoosmótico.

- La solución hipoosmótica fue preparada por 0.061 gr de citrato de sodio dihidratado, 0.112 gr de fructosa y 10 ml de agua bidestilada, con una osmolaridad calculada de 125 mOsm/l. La solución formolada fue preparada de 1 ml de la propia solución hipoosmótica más 3 μ l de formaldehído al 40%.
- En un vial, 25 μ l de muestra de semen fue incubado en 100 μ l de medio hipoosmótico previamente temperado, por espacio de 15 minutos a 37 °C.
- Para detener la reacción se añadió 31 μ l de la solución formolada, fue homogenizada y enfriada a temperatura ambiente.

- Posteriormente 5 μ l de la muestra incubada se puso sobre un portaobjetos, cubierto por un cubreobjetos y fue evaluado en el microscopio a un objetivo de 40X, donde se tomaron de 15 a 20 fotografías en el módulo de vitalidad del ISAS. Se contabilizaron un mínimo de 200 espermatozoides por muestra.

El conteo y clasificación de los espermatozoides fueron de acuerdo con Mellisho, (2010). Se consideraron espermatozoides con membrana funcional los que reaccionarán al estrés hipoosmótico mediante la hinchazón de la parte distal de la cola espermática, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados. Los resultados se expresaron en porcentaje de reacción total de espermatozoides con membrana funcional.

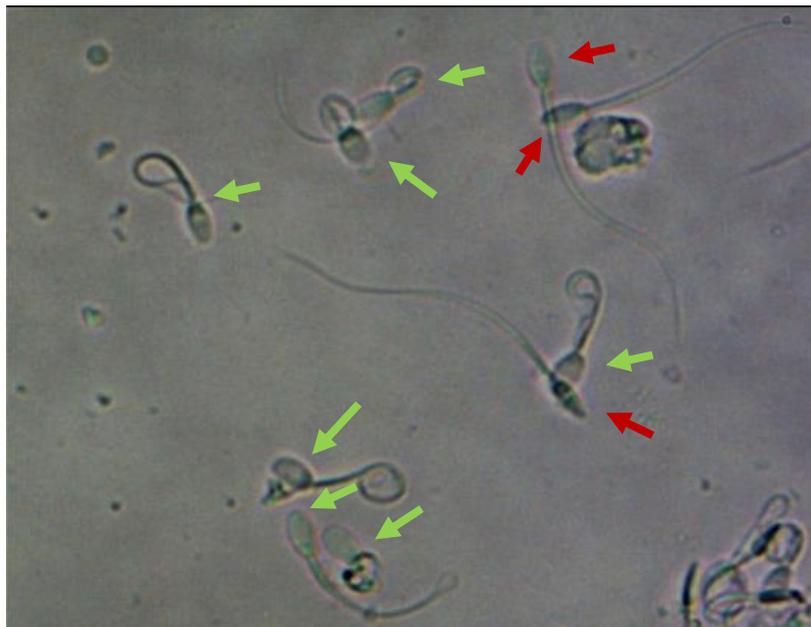


Foto 13. Reacción espermática al estrés hipoosmótico: con reacción (verde) y sin reacción (rojo).

3.7. PROCESAMIENTO DE SEMEN

3.7.1. Dilución

Después de la evaluación de semen fresco, las muestras con una buena concentración y motilidad espermática fueron diluidos con dilutor base Tris (ver

3.7.2. Refrigerado

El enfriamiento se hizo en un recipiente con agua a 37 °C que rodeaba al tubo colector y fue colocado en la refrigeradora, de tal manera que la temperatura descienda gradualmente desde los 37 °C hasta los 4 °C en un tiempo de 2.5 horas.

3.7.3. Adición del crioprotector

Para el objetivo 01: En este proceso el semen refrigerado, fue dividido en tres tratamientos y colocado en un tubo eppendorf rotulado y mantenido en refrigeración a 4 °C y a cada tubo se adicionó el dilutor “B” (ver anexo 1) a 4 °C con un nivel de 5, 7 y 9% de dimetilformamida, la adición de dilutor esta fraccionado en dos partes iguales, cada fracción se añadió a un intervalo de 15 minutos, la adición se hizo dentro del refrigerador, para evitar los cambios de temperatura, vertiendo lentamente por las paredes del tubo colector y luego fue homogenizado.

Para el objetivo 02: se sigue los pasos anteriores, en este caso la muestra de semen fue dividido en 4 alícuotas, cada uno representa un tratamiento tenemos con 5, 7 y 9% de dimetilformamida y 7% de glicerol. La adición de dilutor fue igual que para el Objetivo 01.

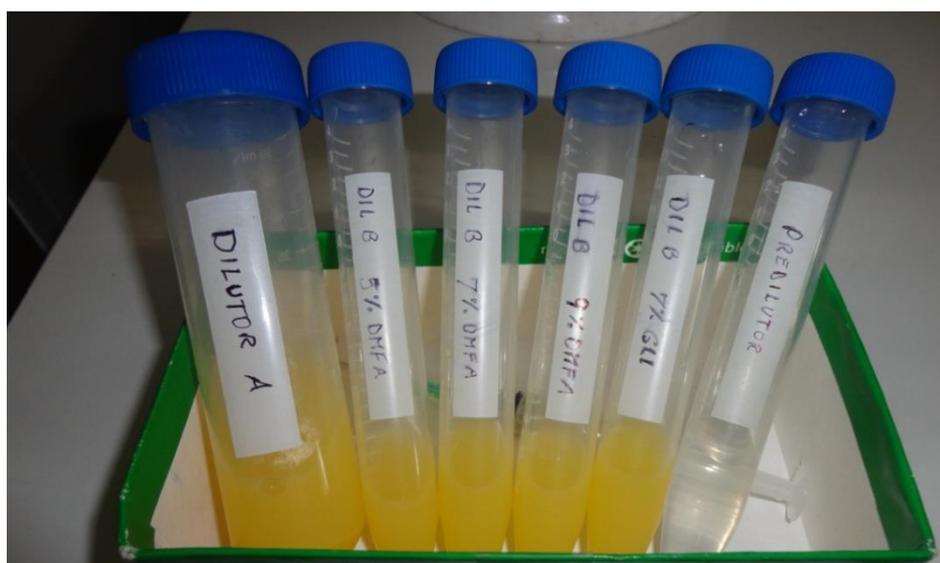


Foto 15. Dilutores base tris: predilutor, dilutor A y dilutor B con diferentes niveles de crioprotector.

3.7.4. Equilibrado

Después de la adición del dilutor B, la muestra fue mantenida en el refrigerador a 4 °C durante 1 hora más, con la finalidad de que los espermatozoides entren en equilibrio con el crioprotector con el fin de evitar la cristalización en el congelado.

3.7.5. Empajillado

Previamente se hizo el rotulado de las pajillas, codificadas con la identificación del macho, porcentaje de crioprotector y fecha de colección los que fueron mantenidos en refrigeración. Luego se procedió a cargar manualmente en las pajillas de 0.5 ml, con ayuda de una jeringa de tuberculina modificada para facilitar esta operación, se dejó un espacio de aire y fue sellado con alcohol polivinílico y fue colocado inmediatamente en una bandeja con agua temperada a 4 °C, todo esto se hizo dentro de la refrigeradora para evitar los cambios de temperatura.

3.7.6. Congelación y almacenado

Se usó el método de congelación horizontal, para lo cual se utilizó una caja de tecnopor en donde se vertió una porción de nitrógeno líquido con una altura de 2 cm, las pajillas de semen se secaron cuidadosa y rápidamente con papel toalla y luego se ubicó sobre una gradilla, a una altura de 5 cm sobre el nitrógeno líquido, donde se congelaron con los vapores de nitrógeno, este proceso tuvo una duración de 15 minutos, pasado este tiempo las pajillas se dejaron caer en el nitrógeno líquido, por espacio de 10 minutos. Culminado la congelación, las pajillas se ubicaron en los globets y portaglobets y colocados en canastillas dentro del tanque de nitrógeno, para ser almacenados a -196 °C.



Foto 16. Congelación tipo horizontal de pajillas de semen en vapores de nitrógeno líquido y tanque de nitrógeno para almacenamiento.

3.7.7. Descongelado

La descongelación se hizo después de 6 días de congelada la muestra, con una pinza de plástico se procedió a sacar las pajillas del tanque de nitrógeno, rápida y cuidadosamente fue sumergido en agua temperada a 37 °C, durante 30 segundos, para luego secarlos y hacer la respectiva evaluación microscópica.



Foto 17. Descongelación de pajillas de semen y evaluación microscópica de semen descongelado.

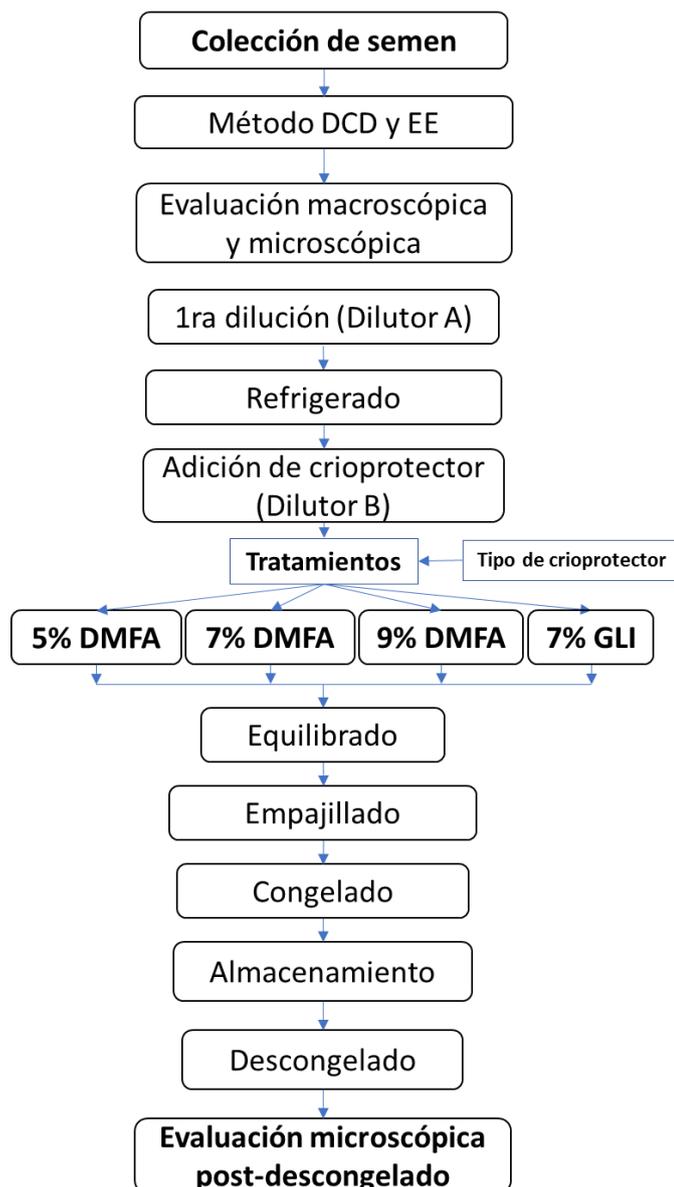


Figura 4: Flujograma de proceso de congelación de semen.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación de las variables macroscópicas (volumen, filancia, pH y color) y microscópicas en semen fresco y refrigerado se hicieron utilizando la estadística descriptiva.

La normalidad de las variables microscópicas en semen equilibrado y descongelado (motilidad, parámetros cinéticos de velocidad, vitalidad, funcionalidad de membrana y morfometría espermática) fueron verificados en el

Test de Shapiro-Wilk, para lo cual los datos porcentuales fueron transformados a su valor Arcoseno ($y' = \text{Arcoseno } \sqrt{Y}$).

Las variables microscópicas en semen equilibrado y descongelado (motilidad, parámetros cinéticos de velocidad, vitalidad, funcionalidad de membrana) fueron analizadas en un Diseño Completamente al Azar Jerárquico o anidado y la comparación de medias se utilizó el test de Duncan. El modelo aditivo lineal aplicado a la investigación es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + C(A)_{k(j)} + \varepsilon_{ijk}$$

Dónde:

i = Tratamientos (3)

j = Animales (5)

k = Colectas (5)

Y_{ijk} = Es la observación de la k-esima colecta de semen dentro del j-esimo macho en el i-esimo nivel de CLC.

μ = Media poblacional

T_i = Es el efecto del i-esimo nivel de CLC (tratamiento).

A_j = Es el efecto del j-esimo animal.

$C(A)_{k(j)}$ = Es el efecto de la k-esima colecta dentro de j-esimo animal.

ε_{ijk} = Error experimental.

Las variables morfométricas de la cabeza (largo, ancho, área, perímetro, acrosoma, elipticidad, rugosidad, elongación, regularidad) y de la pieza intermedia (ancho, área, distancia de inserción y ángulo de inserción) del espermatozoide fueron analizadas con la prueba de Kruskal – Wallis

Todos los análisis estadísticos fueron realizados, utilizando el programa estadístico SAS v.8.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA PARA EL OBJETIVO 1

4.1.1. Evaluación microscópica de espermatozoides colectados por desviación del conducto deferente

a. Vitalidad espermática

Los datos obtenidos de vitalidad espermática en semen de alpaca, en las etapas de equilibrado y descongelado con niveles de 5, 7 y 9% de DMFA, se muestra en el cuadro 11. No se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para la etapa de equilibrado y descongelado, lo que nos indica que los tres niveles de DMFA protegen de igual forma los espermatozoides ante el shock frío.

Cuadro 11. Porcentaje de vitalidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Equilibrado		ns				
T1: 5% DMFA	13	52.820 a	11.467	21.709	30.11	66.67
T2: 7% DMFA	13	54.034 a	7.512	13.902	38.24	64.52
T3: 9% DMFA	13	55.457 a	6.620	11.936	43.08	67.31
Descongelado		ns				
T1: 5% DMFA	13	44.369 a	9.275	20.903	31.67	57.89
T2: 7% DMFA	13	44.686 a	7.443	16.657	32.18	60.61
T3: 9% DMFA	13	47.529 a	7.318	15.396	36.78	60.00

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos en semen equilibrado son superiores a Ccalta (2017), Banda *et al.* (2010) y en semen descongelado es superior a Banda *et al.* (2010) que usaron dilutor Tris y glicerol en la congelación y Ccalta (2017) que congelo semen de alpaca por DCD utilizando un dilutor tris y DMFA, asimismo es

inferior a Canorio (2008) que utilizo dilutor Tes + Tris y como crioprotector dimetilacetamida y/o dimetilsulfoxido, diferencia que puede ser también al tipo de tinción utilizado (eosina – nigrosina, fluorocromos), la temperatura utilizada en la preparación y manipulación de la muestra, el porcentaje de vitalidad inicial de la muestra y al tipo de crioprotector utilizado, ya que muestras con uso de glicerol tienen menor motilidad al descongelado y muy al contrario cuando se usó las amidas se observa resultados superiores.

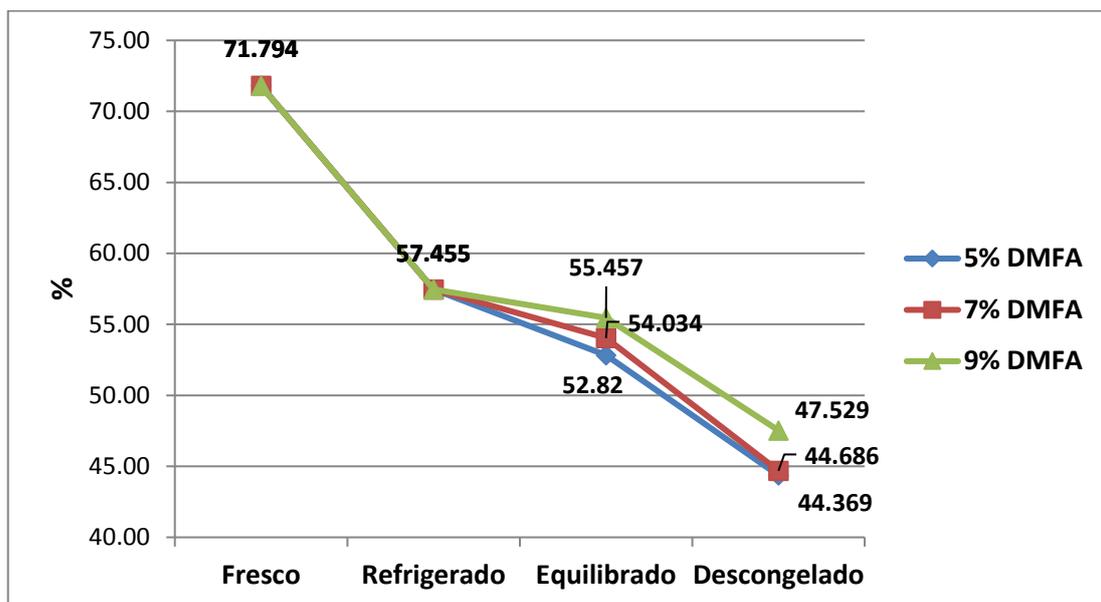


Gráfico 1. Variación de la vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA.

En el gráfico 1, se observa que la vitalidad desciende de 71.79% en fresco, hasta 57.45% en estado de refrigeración (4 °C) de ahí se mantiene entre 52.82 y 55.46% en la etapa de equilibrado, para disminuir hasta 44 y 47.5% de espermatozoides vivos en muestra descongelada. También se observa que el dilutor con 9% de DMFA, protege mejor del shock frío.

b. Motilidad espermática

La motilidad espermática viene a ser la suma del porcentaje de espermatozoides motiles progresivos (EMP) y espermatozoides motiles no

progresivos (EMNP), los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 12, para semen equilibrado y descongelado con niveles de 5, 7 y 9% de DMFA. El análisis de datos de motilidad en semen de alpaca para las etapas de equilibrado y descongelado, indican que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) entre los tres niveles de DMFA.

Cuadro 12. Motilidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Equilibrado		ns				
T1: 5% DMFA	13	32.239 a	15.770	48.915	10.300	63.433
T2: 7% DMFA	13	31.821 a	15.678	49.269	11.702	61.368
T3: 9% DMFA	13	30.786 a	16.780	54.504	5.759	64.438
Descongelado		ns				
T1: 5% DMFA	13	16.345 a	11.487	70.279	5.392	46.927
T2: 7% DMFA	13	12.606 a	8.824	69.995	1.227	31.563
T3: 9% DMFA	13	15.432 a	10.211	66.170	3.256	35.909

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$).

Para muestras de semen equilibrado, los resultados obtenidos son superiores a Ccalta (2017). Y en semen descongelado, Cárdenas (2002), Canorio (2008) Choez *et al.* (2014) y Terreros *et al.* (2015) encontraron una motilidad superior a nuestro estudio, mientras Ccalta (2017) y banda *et al.* (2010) muestran resultados similares. Esta diferencia es posiblemente al tipo de dilutor y crioprotector usado, ya que el uso de dimetilsulfoxido muestra mayor motilidad post-descongelado, también influye el método de evaluación realizada sea subjetivo y objetivo, bajo un sistema CASA y la calidad inicial de la muestra.

En el gráfico 2, se observa como la motilidad espermática asciende en el momento de la refrigeración para luego descender en el equilibrado y tener hasta un 15% de motilidad en semen descongelado, lo que nos indica que la mayoría de

los espermatozoides pierden movimiento en la congelación que disminuye de 34% en la refrigeración hasta 12% en el descongelado.

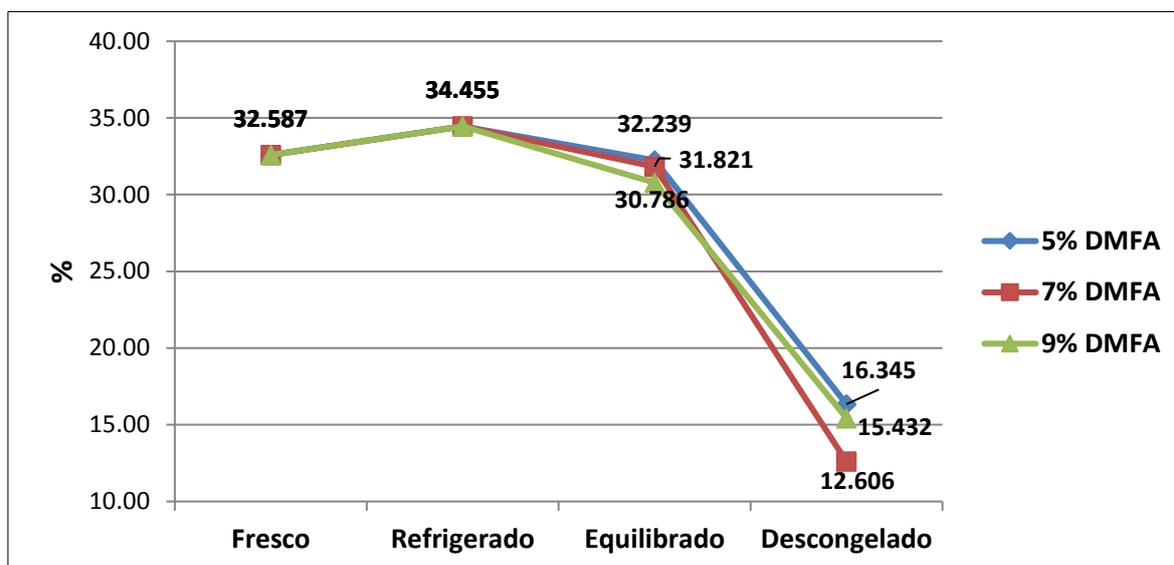


Gráfico 2. Variación de la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA.

c. Motilidad de espermatozoides progresivos y no progresivos.

En el cuadro 13, se muestran los resultados para los espermatozoides móviles progresivos (EMP) y espermatozoides móviles no progresivos (EMNP) en muestras de semen equilibrado y descongelado con 5, 7 y 9% de nivel de DMFA.

Cuadro 13. Porcentaje de EMP y EMNP en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD, utilizando tres niveles de DMFA.

Momento de evaluación	N	EMP (%)		EMNP (%)	
		Media	± DS	Media	± DS
Equilibrado		ns		ns	
T1: 5% DMFA	13	0.331 a	0.272	31.908 a	15.804
T2: 7% DMFA	13	0.687 a	0.526	31.135 a	15.314
T3: 9% DMFA	13	0.380 a	0.429	30.406 a	16.548
Descongelado		ns		ns	
T1: 5% DMFA	13	0.358 a	0.420	15.987 a	11.552
T2: 7% DMFA	13	0.252 a	0.350	12.355 a	8.729
T3: 9% DMFA	13	0.212 a	0.327	15.220 a	10.224

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Tanto para EMP y EMNP no se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes niveles de DMFA en la etapa de equilibrado y descongelado. Pero podemos observar que las muestras descongeladas con 5 y 9% de DMFA, tienen mayor porcentaje de motilidad.

No se tiene información sobre EMP y EMNP en muestra refrigerada, equilibrado y descongelado, para este tipo de evaluación. Ya que esta información solo puede ser obtenida a través de una evaluación en un sistema CASA.

d. Parámetros de Velocidad

Los valores de Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad rectilínea (VSL), Velocidad media (VAP), Amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH) y Frecuencia de batida de la cabeza (BCF) de semen equilibrado y descongelado se muestran en el cuadro 14.

Para VCL, se observa que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes niveles de DMFA en semen equilibrado y descongelado. En la evaluación de VSL, Se encontró diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre tratamientos en semen equilibrado y diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes niveles de DMFA en semen descongelado. Para VAP se observa diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los niveles de DMFA en muestras equilibradas y no observa diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los niveles de DMFA en muestras descongeladas. Sobre los valores de ALH y BCF se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos en muestras equilibradas y descongeladas (cuadro 14). Para los valores de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF se observa que, en semen descongelado, se tuvo mayor respuesta a la congelación con uso de 5% de DMFA.

No hay estudios anteriores en donde se muestra resultados de parámetros de velocidad en semen descongelado de alpaca para este método de colección.

Cuadro 14. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de tres niveles de DMFA

Parámetros de velocidad		VCL		VSL		VAP		ALH		BCF	
Momento de evaluación	N	Media (µm/s)	± DS	Media (µm/s)	± DS	Media (µm/s)	± DS	Media (µm)	± DS	Media (Hz)	± DS
Equilibrado		*		**		*		ns		ns	
T1: 5% DMFA	13	67.03 a	9.99	15.89 a	2.43	36.35 a	4.74	0.47 a	0.40	0.81 a	0.93
T2: 7% DMFA	13	55.10 b	7.73	13.07 b	2.88	31.65 a	4.96	0.63 a	0.57	1.12 a	1.08
T3: 9% DMFA	13	52.74 b	7.07	12.91 b	2.87	30.96 a	4.99	0.44 a	0.48	0.89 a	0.99
Descongelado		*		*		ns		ns		ns	
T1: 5% DMFA	13	53.16 a	15.11	13.13 a	4.28	29.32 a	8.82	0.39 a	0.52	0.78 a	1.20
T2: 7% DMFA	13	46.26 ab	16.68	10.38 b	3.48	24.41 ab	8.78	0.23 a	0.31	0.70 a	0.88
T3: 9% DMFA	13	42.32 b	15.18	9.87 b	3.61	24.13 b	9.15	0.18 a	0.24	0.39 a	0.64

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

4.1.2. Evaluación microscópica de semen colectado por electroeyaculación

a. Vitalidad espermática

La media de espermatozoides vivos de alpaca hallados en muestras equilibradas y descongeladas, para tratamientos con 5, 7 y 9% de nivel de DMFA, no es significativa ($p>0.05$) para los diferentes niveles de DMFA, pero se observa que hay mayor porcentaje de espermatozoides vivos con 7 y 9% de DMFA, en muestras descongeladas (cuadro 15).

Cuadro 15. Vitalidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Equilibrado		ns				
T1: 5% DMFA	5	54.768 a	9.674	17.664	43.68	65.96
T2: 7% DMFA	5	52.104 ab	13.196	25.323	34.29	70.37
T3: 9% DMFA	5	50.594 b	10.483	20.720	36.14	60.71
Descongelado		ns				
T1: 5% DMFA	5	43.848 a	5.886	13.423	38.89	51.02
T2: 7% DMFA	5	46.068 a	7.617	16.535	39.29	58.97
T3: 9% DMFA	4	47.275 a	3.857	8.158	42.86	52.27

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$).

Para semen equilibrado, los valores obtenidos son inferiores al reporte de Quispe (2018), Zirena (2014) y García *et al.* (2017) para semen obtenido por VA y PC, pero es similar a Cayo (2013) para semen obtenido por EE. En semen descongelado los resultados obtenidos son superiores a Paucar (2011), Cayo (2013) y Zirena (2014) quienes usaron glicerol como crioprotector y Ccalta (2017) que utilizo DMFA como crioprotector, pero tuvo una baja calidad espermática al inicio de la congelación. Asimismo, los resultados son similares a los reportes de

Quispe (2018) cuando hizo una congelación rápida del semen de alpaca, utilizando un dilutor tris y DMFA. Esta diferencia podría ser al tipo de colección, al efecto individual del macho, los medios de dilución, el tipo de crioprotector, la calidad inicial de la muestra, el tipo de tinción empleado y el tipo de congelación. Asimismo, cuando el crioprotector empleado fue glicerol se reporta valores inferiores, lo que nos indica que la DMFA ofrece mayor protección frente al glicerol.

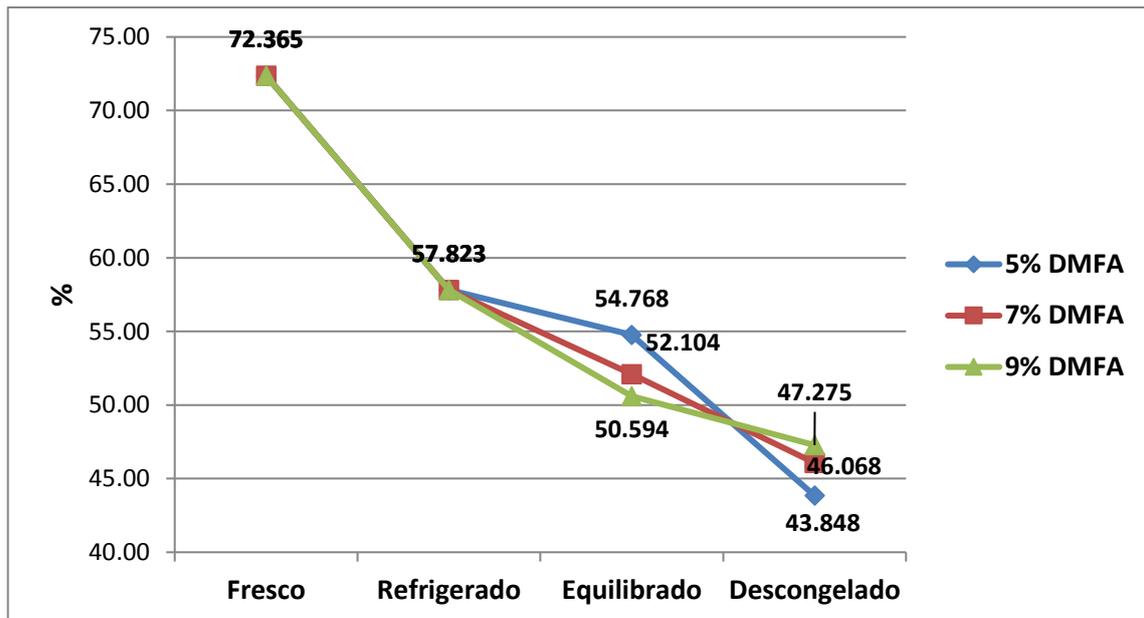


Gráfico 3. Variación de la vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.

El gráfico 3, nos muestra que la muerte espermática se da durante las diferentes etapas del proceso de congelación, en su mayoría en la refrigeración, consecuencia del cambio de temperatura. Las muestras con 9% de DMFA tienen mayor porcentaje de espermatozoides vivos.

b. Motilidad espermática

Los resultados de motilidad espermática promedio, obtenida de alpacas macho por el método de EE, no es significativo ($p > 0.05$) entre los diferentes niveles de DMFA para semen equilibrado y descongelado (cuadro 16).

Cuadro 16. Motilidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Equilibrado		ns				
T1: 5% DMFA	5	25.932 a	11.192	43.160	12.791	37.860
T2: 7% DMFA	5	32.491 a	13.389	41.207	16.514	49.351
T3: 9% DMFA	5	32.395 a	13.850	42.754	10.976	45.024
Descongelado		ns				
T1: 5% DMFA	5	11.446 a	6.699	58.527	5.495	21.667
T2: 7% DMFA	5	8.562 a	6.352	74.195	2.564	19.369
T3: 9% DMFA	4	10.211 a	5.067	49.623	5.625	16.554

Letras distintas muestran diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$).

En muestras obtenidas por los métodos de EE, VA y PC, Cayo (2013), Paucar (2011), Zirena (2014) y García *et al.* (2017) reportan valores superiores de motilidad al equilibrado, mientras Flores *et al.* (2015) y Quispe (2018) obtienen valores similares de motilidad y Ccalta (2017) reporta valores muy inferiores, debido a que la motilidad inicial es también baja.

Para semen descongelado, los valores obtenidos son inferiores a Cuba (2000), Paucar (2011), Cayo (2013), Olaguivel y naveros (2014), Zirena (2014), Franco (2015), Quispe (2015a) en semen obtenido por VA, EE y PC. Mientras se obtuvo valores motilidad post-descongelado similares a Flores *et al.* (2015), Quispe (2015a), Ccalta (2017) y Quispe (2018) en muestras de semen obtenido por EE y PC.

Esta diferencia posiblemente se debe al tipo de semen obtenido, ya que las muestras obtenidas por PC tienen mayor respuesta de motilidad post-descongelado, también al dilutor utilizado, tipo de crioprotector, el método de congelación y la motilidad inicial de la muestra. Asimismo, al tipo de evaluación microscópica, factores propios del animal y la estacionalidad reproductiva.

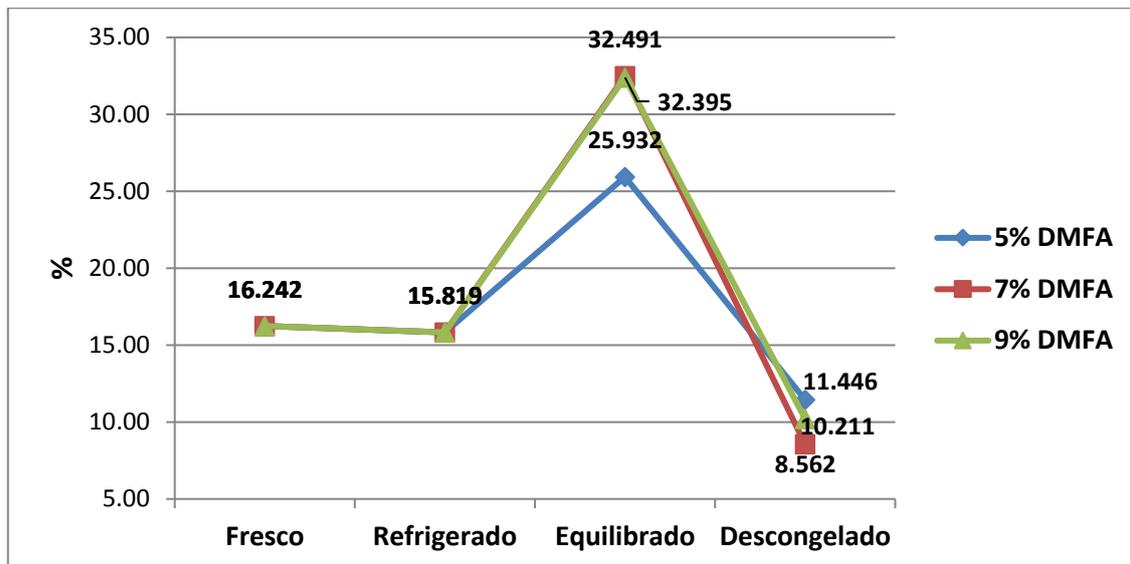


Gráfico 4. Variación de la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.

El gráfico 4, nos muestra como la motilidad observada en semen fresco y refrigerado, se incrementa en el proceso de equilibrado, para luego descender en el descongelado. Esta variación posiblemente se debe a la presencia de plasma seminal, el cual disminuye su filancia a medida que transcurre el tiempo, lo que se traduce en una mayor motilidad.

c. Motilidad de espermatozoides progresivos y no progresivos

Los resultados de motilidad promedio de EMP y EMNP en semen de alpaca, obtenido por EE, para los diferentes tratamientos, se muestran en el cuadro 17. No se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los diferentes niveles de DMFA, para muestras de semen equilibrado y descongelado.

Cayo (2013) y Quispe (2015a) reportan valores superiores de EMP en semen descongelado de alpaca, cuyo crioprotector usado en ambos casos fue el glicerol. Para EMNP, los resultados reportados por Cayo (2013) y Franco (2015) son superiores a los resultados obtenidos en semen equilibrado y similares a los resultados de Flores *et al.* (2015).

Para semen descongelado los resultados obtenidos son similares a Quispe (2015a) y Flores *et al.* (2015), pero son menores a Cayo (2013) y Franco (2015) en semen obtenido por EE y Quispe (2015a) para semen obtenido por PC. Las diferencias observadas son similares a las mencionadas para la motilidad espermática.

Cuadro 17. Porcentaje de EMP y EMNP en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.

Momento de evaluación	N	EMP (%)		EMNP (%)	
		Media	± DS	Media	± DS
Equilibrado		ns		ns	
T1: 5% DMFA	5	1.213 a	0.900	24.719 a	10.863
T2: 7% DMFA	5	1.399 a	1.575	31.093 a	12.175
T3: 9% DMFA	5	1.537 a	0.789	30.858 a	13.755
Descongelado		ns		ns	
T1: 5% DMFA	5	0.460 a	0.472	10.986 a	6.751
T2: 7% DMFA	5	0.320 b	0.444	8.241 a	5.999
T3: 9% DMFA	4	0.377 ab	0.440	9.834 a	4.998

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

d. Parámetros de velocidad

Los resultados de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF obtenido en espermatozoides de alpaca, se muestran en el cuadro 18, donde se observa que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos en muestras equilibradas y descongeladas, observando que 5% de DMFA presenta mayor VCL, VSL, VAP, ALH y BCF.

En semen equilibrado, los valores obtenidos de VCL, VSL y VAP son similares a Flores *et al.* (2015) e inferiores a Franco (2015), mientras los valores obtenidos en el tratamiento con 7% de DMFA es superior a Franco (2015). Para semen descongelado, los resultados obtenidos con 5 y 7% de DMFA, son superiores a Flores *et al.* (2015) para los valores de VCL y VSL, mientras se obtuvo valores similares de VAP. Por otra parte, Franco (2015) reporta valores inferiores de VCL, VSL, VAP y ALH, pero valores superiores de BCF.

Cuadro 18. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de tres niveles de DMFA.

Parámetros de velocidad		VCL		VSL		VAP		ALH		BCF	
Momento de evaluación	N	Media (µm/s)	± DS	Media (µm/s)	± DS	Media (µm/s)	± DS	Media (µm)	± DS	Media (Hz)	± DS
Equilibrado		ns		ns		ns		ns		ns	
T1: 5% DMFA	5	57.89 a	15.12	11.89 a	4.46	24.72 a	6.84	0.84 a	0.76	1.69 a	1.33
T2: 7% DMFA	5	60.88 a	14.55	13.09 a	4.17	27.19 a	5.53	1.21 a	1.33	2.27 a	2.28
T3: 9% DMFA	5	55.74 a	12.33	11.50 a	2.74	25.96 a	5.85	1.02 a	0.67	1.68 a	0.43
Descongelado		ns		ns		ns		ns		ns	
T1: 5% DMFA	5	40.71 a	17.65	10.11 a	4.60	18.59 a	7.65	0.41 a	0.36	1.09 a	0.76
T2: 7% DMFA	5	39.72 a	22.22	9.09 a	5.35	17.35 b	8.99	0.16 b	0.21	0.49 a	0.70
T3: 9% DMFA	4	33.68 a	14.55	8.28 a	3.63	17.19 b	7.76	0.28 a	0.36	0.63 a	0.95

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Quispe (2015a) reporta valores inferiores de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF en semen descongelado. Pero en general las muestras de semen congeladas con glicerol (Franco, 2015 y Quispe, 2015a) reportan valores inferiores a los criopreservados con DMFA (Flores *et al.*, 2015), por lo que esta diferencia sea posiblemente al uso de crioprotector, el proceso de congelación, al tipo de dilutor empleado, el método de congelación, la época reproductiva y factores propios del animal.

4.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA PARA EL OBJETIVO 02

Al no haber diferencias significativas en los tres niveles de DMFA, en las diferentes variables microscópicas tanto para DCD y EE, en el presente objetivo se tomaron los tres niveles de DMFA y uno de glicerol. Por lo que se evaluó dos variables más como la morfometría y la funcionalidad de membrana espermática.

4.2.1. Evaluación microscópica de espermatozoides colectados por desviación de conductos deferentes

a. Vitalidad espermática

El análisis de los valores promedios de vitalidad espermática obtenida en la etapa de equilibrado y descongelado de semen de alpaca, indica que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$), mostrando que los diferentes niveles de DMFA y de glicerol ofrecen la misma acción crioprotectora, ante el shock frío. Pero se observa una mayor respuesta con uso de 7 y 9% de DMFA (cuadro 19).

Los resultados obtenidos para espermatozoides vivos son superiores a Ccalta (2017) tanto en semen equilibrado y descongelado, quien uso DMFA como crioprotector. Para espermatozoide descongelado nuestro resultado es superior a lo reportado por Banda *et al.* (2010) en muestras diluidas con leche descremada y es inferior a lo reportado por Canorio (2008) que utilizo dimetilacetamida y/o dimetilsulfoxido como crioprotectores.

Cuadro 19. Vitalidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Equilibrado		ns				
T1: 5% DMFA	17	49.108 b	8.151	16.597	35.71	64.95
T2: 7% DMFA	17	49.660 ab	7.388	14.877	32.47	66.23
T3: 9% DMFA	17	48.966 b	7.273	14.853	36.47	58.59
T4: 7% GLI	17	51.304 a	6.999	13.642	39.00	64.23
Descongelado		ns				
T1: 5% DMFA	16	39.749 a	6.623	16.661	28.99	52.94
T2: 7% DMFA	17	42.087 a	6.818	16.200	34.31	56.30
T3: 9% DMFA	16	43.246 a	8.610	19.909	34.59	61.69
T4: 7% GLI	17	40.899 a	7.879	19.265	29.84	55.80

Letras distintas muestran diferencia estadística significativas ($p > 0.05$).

Esta diferencia con otros autores podría ser al tipo de dilutor y crioprotectores utilizados, también podría variar de acuerdo con el tipo de tinción utilizado, la temperatura utilizada en la preparación y manipulación de la muestra al momento de la evaluación y a la calidad inicial de la muestra de semen.

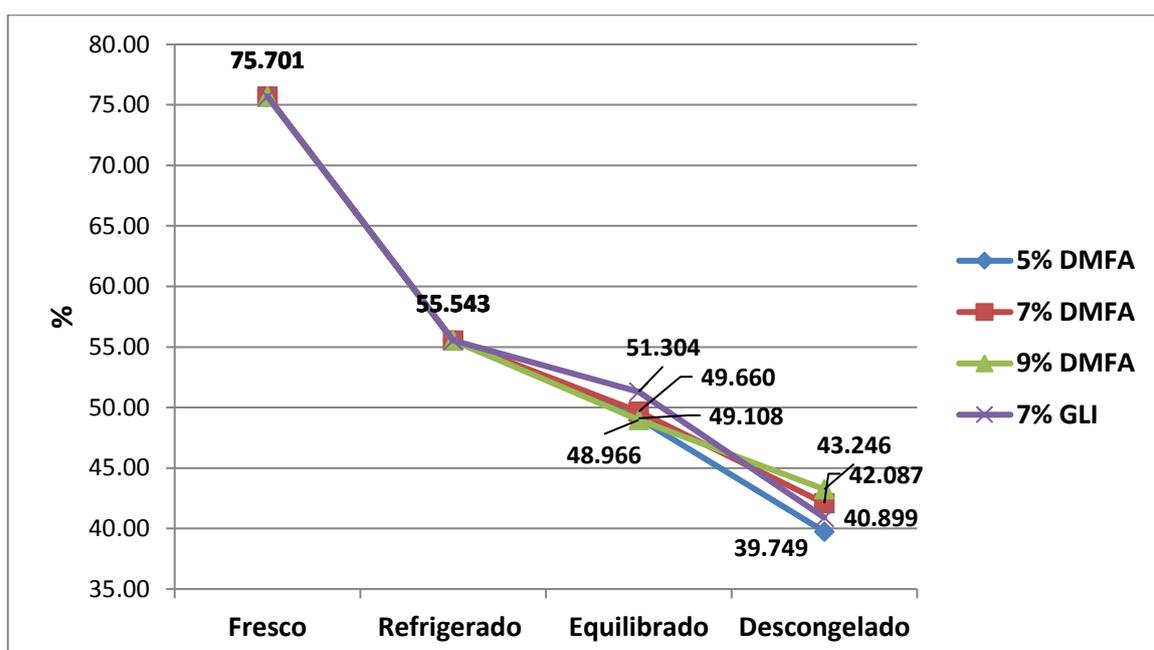


Gráfico 5. Variación de la vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD utilizando DMFA y GLI.

El gráfico 5, muestra que la etapa de mayor muerte celular sucede después de la colección en la etapa de refrigeración, asimismo podemos observar que el glicerol tiende a tener mayor acción protectora que la DMFA en la etapa de equilibrado mas no en la etapa de descongelado.

b. Motilidad espermática

Para los valores medios de motilidad espermática de semen de alpaca en la etapa de equilibrado y descongelado con uso de DMFA y glicerol, no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$), pero se observa que las muestras con 7% de DMFA, tiene mejor respuesta a la criopreservación (cuadro 20).

Cuadro 20. Motilidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Equilibrado		ns				
T1: 5% DMFA	17	30.394 a	11.974	39.395	10.635	48.201
T2: 7% DMFA	17	30.737 a	14.149	46.032	12.146	59.368
T3: 9% DMFA	17	29.592 a	14.430	48.762	10.680	56.769
T4: 7% GLI	17	28.503 a	12.526	43.945	11.620	54.302
Descongelado		ns				
T1: 5% DMFA	16	13.402 a	9.858	73.556	4.157	34.307
T2: 7% DMFA	17	14.157 a	9.108	64.340	5.414	38.995
T3: 9% DMFA	16	12.508 a	9.467	75.690	3.279	40.271
T4: 7% GLI	17	11.490 a	7.550	65.713	2.013	28.741

Letras distintas muestran diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$).

Para muestras de espermatozoides descongelados, Cárdenas (2002), Canorio (2008), Choez *et al.* (2014) y Terreros *et al.* (2015) encontraron una motilidad superior a nuestro estudio, mientras Ccalta (2017) obtuvo resultados inferiores en muestras de semen equilibrado y descongelado, y Banda *et al.* (2010) obtuvo resultados similares. Esta diferencia podría ser al tipo de dilutor, a los

crioprotectores usados (dimetilsulfoxido, glicerol y DMFA), al método de evaluación realizado (objetiva y subjetiva), a la motilidad inicial de la muestra, tipo de obtención de muestras de semen, y a factores propios del animal.

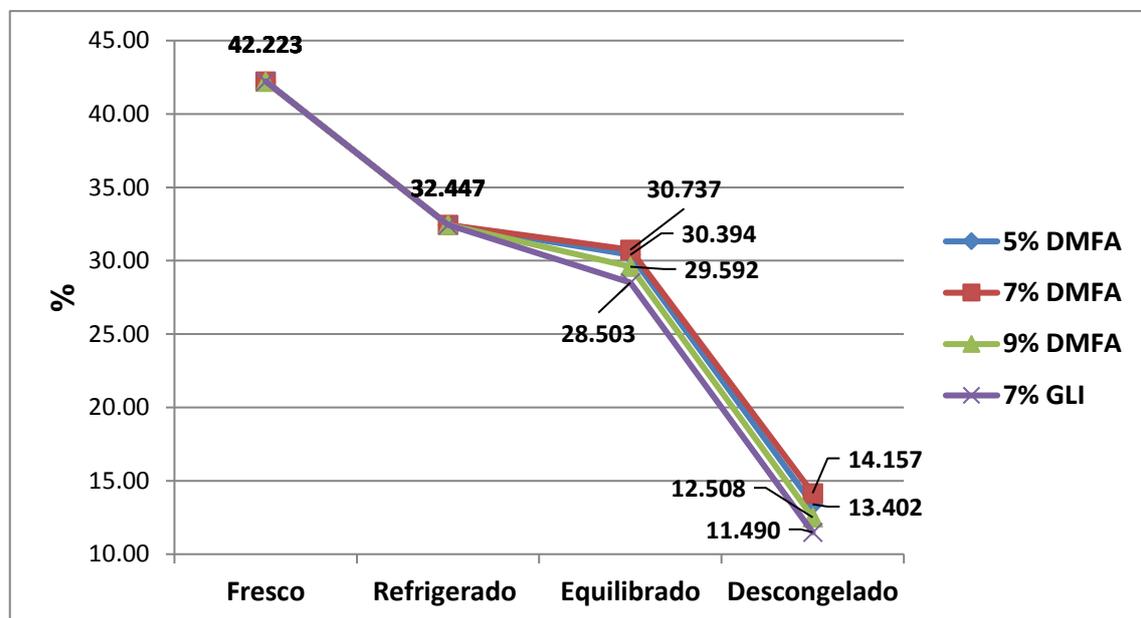


Gráfico 6. Variación de la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD utilizando DMFA y GLI.

En el gráfico 6, se observa que la mayor pérdida de motilidad se da en la etapa de refrigerado y la congelación, momentos en que la temperatura disminuye, también se observa que la motilidad con niveles de DMFA es mayor comparado al glicerol.

c. Motilidad de espermatozoides progresivos y no progresivos

El análisis de los resultados promedios de espermatozoides móviles progresivos (EMP) y no progresivos (EMNP) para semen equilibrado y descongelado, indica que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los diferentes niveles de DMFA y GLI, las muestras congeladas con un nivel de 5% de DMFA, tienen mejor respuesta que los demás tratamientos.

Los valores de EMNP obtenido en semen descongelado, son inferiores a los valores de Cayo (2013), Franco (2015) y superiores a los reportes de Quispe

(2015a) y Flores *et al.* (2015), esto en muestras obtenidas por EE. Diferencia que posiblemente sea al tipo de semen, los protocolos de congelación y factores propios del animal.

Cuadro 21. Porcentaje de EMP y EMNP en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.

Momento de evaluación	N	EMP (%)		EMNP (%)	
		Media	± DS	Media	± DS
Equilibrado		ns		ns	
T1: 5% DMFA	17	0.747 ab	0.690	29.647 a	11.656
T2: 7% DMFA	17	0.579 ab	0.636	30.158 a	13.811
T3: 9% DMFA	17	0.512 b	0.401	29.079 a	14.247
T4: 7% GLI	17	0.937 a	0.615	27.567 a	12.441
Descongelado		ns		ns	
T1: 5% DMFA	16	0.483 a	0.387	12.919 a	9.632
T2: 7% DMFA	17	0.209 b	0.295	13.947 a	9.010
T3: 9% DMFA	16	0.263 b	0.226	12.245 a	9.329
T4: 7% GLI	17	0.336 ab	0.241	11.154 a	7.505

Letras distintas muestran diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$).

d. Parámetros de Velocidad

Los resultados medios obtenidos de los parámetros de velocidad (VCL, VSL, VAP, ALH y BCF) se muestran en el cuadro 22.

Para semen equilibrado, existe diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre los diferentes niveles de DMFA y glicerol, para VCL, VSL, VAP y ALH; mientras no se halló diferencia ($p > 0.05$) entre tratamientos para BCF.

En semen descongelado se halló diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos para VCL, pero se halló diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre tratamientos para VSL, ALH y BCF, no se encontró diferencias ($p > 0.05$) entre tratamientos para el parámetro VAP. Asimismo, nos indica que 5% de DMFA y 7% de glicerol muestran resultados superiores después del proceso de congelación (cuadro 22).

Cuadro 22. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI

Parámetros de velocidad		VCL		VSL		VAP		ALH		BCF	
Momento de evaluación	N	Media (µm/s)	±DS	Media (µm/s)	±DS	Media (µm/s)	±DS	Media (µm)	±DS	Media (Hz)	±DS
Equilibrado		**		**		**		*		ns	
T1: 5% DMFA	17	63.47 b	8.48	15.75 b	2.56	34.57 b	2.75	1.06 ab	0.80	2.11 a	1.72
T2: 7% DMFA	17	56.09 c	8.09	13.85 c	2.65	32.14 c	3.90	0.72 b	0.65	1.45 a	1.59
T3: 9% DMFA	17	47.36 d	7.87	11.96 d	2.19	28.25 d	3.35	0.69 b	0.48	1.46 a	1.19
T4: 7% GLI	17	71.76 a	8.79	18.08 a	3.43	37.19 a	3.70	1.47 a	0.89	2.38 a	1.65
Descongelado		*		**		ns		**		**	
T1: 5% DMFA	16	60.94 a	7.85	14.79 a	2.91	30.22 a	4.24	0.84 a	0.65	1.61 a	1.39
T2: 7% DMFA	17	52.82 bc	8.79	12.66 b	2.20	27.76 a	4.33	0.33 b	0.51	0.70 b	1.03
T3: 9% DMFA	16	47.71 c	8.32	12.44 b	2.08	26.63 a	3.51	0.30 b	0.28	0.73 b	0.92
T4: 7% GLI	17	60.12 ab	12.75	14.94 a	3.81	29.13 a	6.48	0.80 a	0.71	1.87 a	1.85

Letras distintas muestran diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$).

No se tiene información sobre VCL, VSL, VAP, ALH y BCF en muestras de semen refrigerado y/o equilibrado y descongelado de alpaca, para este método de colección.

e. Morfometría espermática

Los resultados obtenidos de morfometría espermática para las variables medibles de la cabeza y la pieza intermedia, se observa en el cuadro 25, para muestras evaluadas en fresco y descongelado. El análisis de datos nos indica que se observa diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre los espermatozoides evaluados en semen fresco y los espermatozoides de los diferentes tratamientos con DMFA y GLI en semen descongelado. Lo que claramente nos indica que hay variación en el tamaño de la cabeza entre fresco y descongelado.

En el cuadro 23, al comparar el tamaño de espermatozoides en fresco con muestras descongeladas, nos muestra que los espermatozoides descongelados con 5, 7 y 9% de nivel de DMFA, tienden a incrementar el largo, ancho y área de la cabeza, mientras se observa disminución del tamaño para 7% de glicerol. La variable perímetro es igual para los diferentes niveles de DMFA, pero disminuye con GLI. En tanto para el % de acrosoma se observa que disminuye en todos los niveles de DMFA y glicerol.

Esta diferencia en la morfometría fue reportada por Ccalta (2017), quien observó incremento de largo, ancho y área de la cabeza espermática ($p < 0.01$) cuando se usaba DMFA como crioprotector, en muestras de semen de alpaca obtenidas por DCD. También fue observada en espermatozoides congelados de oso pardo (Álvarez *et al.*, 2008) usando 8% de glicerol, donde se encontró diferencia ($p < 0.01$) entre espermatozoides evaluados en fresco y descongelado. Los espermatozoides descongelados eran más pequeños, tal como se observa en este trabajo al usar glicerol.

Cuadro 23. Morfometría espermática en semen fresco y descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.

Parámetros morfométricos	Fresco		Desc 5% DMFA		Desc 7% DMFA		Desc 9% DMFA		Desc 7% GLI		Test de Kruskal - Wallis	
	N = 1983		N = 1881		N = 1991		N = 1949		N = 1830			
	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS		
Cabeza	Largo (µm)	5.454	0.456	5.490	0.509	5.508	0.497	5.508	0.492	5.414	0.506	<.0001
	Ancho (µm)	3.146	0.310	3.244	0.360	3.242	0.363	3.264	0.352	3.196	0.336	<.0001
	Área (µm ²)	14.198	2.063	14.558	2.296	14.563	2.312	14.647	2.263	14.143	2.236	<.0001
	Perímetro (µm)	17.089	1.791	17.035	1.635	17.095	1.597	17.040	1.619	16.507	1.585	<.0001
	Acrosoma (%)	56.088	6.003	53.621	7.341	55.151	6.991	54.500	7.073	54.551	7.395	<.0001
	Elipticidad*	1.746	0.185	1.707	0.199	1.714	0.195	1.701	0.190	1.706	0.192	<.0001
	Rugosidad*	0.616	0.080	0.632	0.072	0.628	0.071	0.637	0.076	0.654	0.070	<.0001
	Elongación*	0.268	0.048	0.257	0.054	0.259	0.053	0.256	0.052	0.257	0.052	<.0001
	Regularidad*	0.952	0.045	0.964	0.054	0.967	0.053	0.968	0.053	0.965	0.050	<.0001
Pieza intermedia (PI)	Ancho (µm)	1.211	0.546	1.439	0.650	1.418	0.612	1.424	0.600	1.499	0.679	<.0001
	Área (µm ²)	2.865	0.724	3.175	0.969	3.249	0.917	3.297	0.950	3.394	1.074	<.0001
	Distancia de inserción (µm)	0.172	0.123	0.210	0.179	0.208	0.172	0.205	0.152	0.211	0.210	<.0001
	Angulo de inserción (°)	7.322	6.796	8.094	7.519	8.005	7.795	7.743	6.306	8.172	8.345	0.0160

Desc.: descongelado; *: Variables no dimensionales.

f. Funcionalidad de membrana espermática

Los resultados para la reacción total de la funcionalidad de la membrana espermática en semen descongelado, se muestra en el cuadro 24, donde se determinó que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$), entre los diferentes niveles de DMFA y glicerol.

Cuadro 24. Reacción total de la funcionalidad de membrana espermática en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD con uso de DMFA y GLI.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Descongelado		ns				
T1: 5% DMFA	9	38.572 a	11.161	28.934	25.333	52.941
T2: 7% DMFA	9	34.241 a	10.403	30.381	22.619	52.632
T3: 9% DMFA	9	35.402 a	9.751	27.544	19.718	46.919
T4: 7% GLI	9	34.584 a	11.051	31.953	20.755	49.189

Letras distintas muestran diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$).

Los resultados obtenidos son superiores a Terreros *et al.* (2015) y Ccalta (2017) quienes usaron dimetilsulfoxido y DMFA, respectivamente. Esta diferencia posiblemente sea por el tipo de dilutor y crioprotector empleado, osmolaridad de la solución hipoosmótica y los tiempos de incubación y a la calidad inicial del semen.

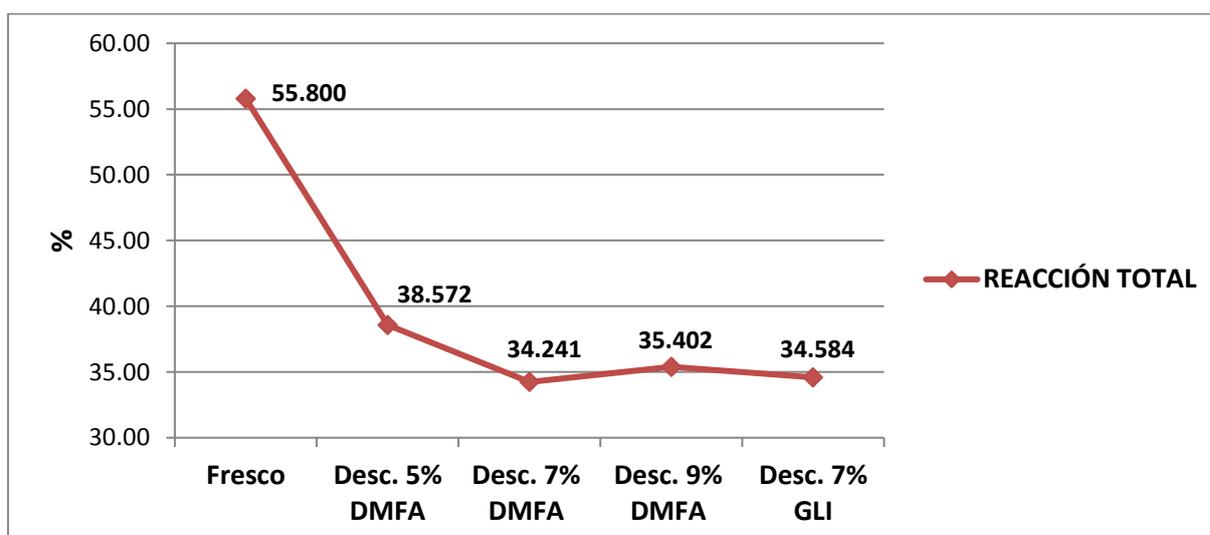


Gráfico 7. Variación de la funcionalidad de membrana espermática en semen fresco y descongelado de alpacas colectadas por DCD utilizando DMFA y GLI.

En el gráfico 7, se observa el comportamiento de la reacción de la funcionalidad de membrana espermática, donde hay una considerable pérdida de la membrana espermática después de la criopreservación, evidencia clara del daño celular producida por la congelación. Asimismo, se observa que el tratamiento con un nivel de 5% de DMFA protege mejor del daño a la membrana celular, comparando con los demás niveles de DMFA y GLI.

4.2.2. Evaluación microscópica de semen colectado por electroeyaculación

a. Vitalidad espermática

El análisis de resultados promedios de espermatozoides vivos en semen equilibrado y descongelado para los diferentes tratamientos de nivel de DMFA y glicerol, se determinó que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos, pero se observa que el uso de 7 y 9% de DMFA en el proceso de congelación de semen mejora la respuesta a la criopreservación (cuadro 25).

Cuadro 25. Vitalidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Equilibrado		ns				
T1: 5% DMFA	14	56.004 a	10.359	18.498	40.95	69.88
T2: 7% DMFA	15	56.895 a	10.473	18.408	37.76	82.14
T3: 9% DMFA	15	54.899 a	8.422	15.341	40.74	71.79
T4: 7% GLI	15	53.741 a	8.075	15.026	40.74	70.13
Descongelado		ns				
T1: 5% DMFA	15	45.299 a	9.474	20.913	32.76	62.34
T2: 7% DMFA	15	48.279 a	7.078	14.661	36.84	61.11
T3: 9% DMFA	14	48.628 a	10.783	22.174	26.92	70.42
T4: 7% GLI	15	46.525 a	9.364	20.127	30.49	61.64

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos para semen equilibrado son inferiores a lo obtenido por Zirena (2014) y Quispe (2018), y similares a Cayo (2013) y García *et al.* (2017) y superior a Ccalta (2017), mientras para semen descongelado nuestros resultados son superiores a lo reportado por Cayo (2013), Zirena (2014), Quispe (2015a) y Ccalta (2017), inferior a Cuba (2000) y Paucar (2011) y similar a Quispe (2018), muestras de semen obtenido por VA, EE y PC. Esta diferencia posiblemente se debe al tipo de semen obtenido, la calidad inicial de la muestra, el tipo de dilutor y crioprotector utilizado, los tipos de tinción supravital.

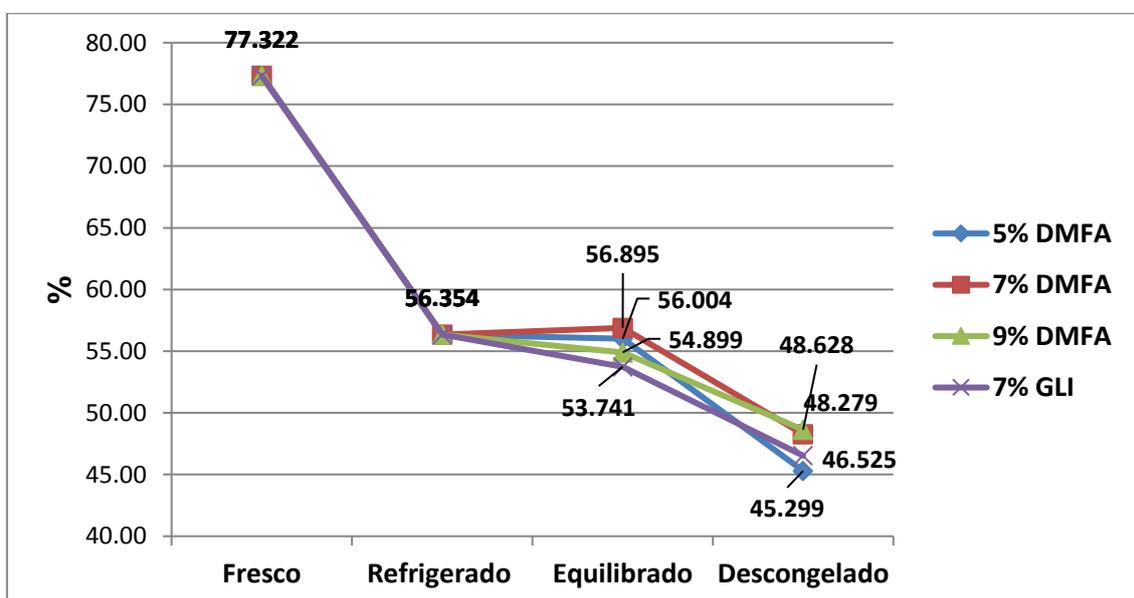


Gráfico 8. Variación de la vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE utilizando DMFA y GLI.

El gráfico 8, nos indica que existe mayor muerte celular en dos etapas del proceso de congelación, primero en la etapa de refrigeración y segundo en la etapa de congelación propiamente dicha, como consecuencia del descenso de la temperatura.

b. Motilidad espermática

Los resultados de motilidad espermática de semen equilibrado y descongelado de alpaca, se muestra en el cuadro 26.

Cuadro 26. Motilidad espermática en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Equilibrado		ns				
T1: 5% DMFA	15	38.619 a	15.200	39.359	17.512	70.141
T2: 7% DMFA	15	36.231 a	13.569	37.451	20.253	62.199
T3: 9% DMFA	15	37.401 a	16.991	45.430	12.994	68.972
T4: 7% GLI	15	24.811 b	12.768	51.460	5.603	52.071
Descongelado		**				
T1: 5% DMFA	15	7.226 b	4.311	59.662	1.382	15.033
T2: 7% DMFA	15	8.197 a	4.839	59.040	3.727	20.082
T3: 9% DMFA	15	8.853 a	5.860	66.194	2.315	24.436
T4: 7% GLI	15	5.451 c	4.741	86.973	0.441	17.509

Letras distintas muestran diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$).

El análisis de los resultados promedios de motilidad espermática en semen de alpaca obtenida por EE, en la etapa de equilibrado y descongelado con varios niveles de DMFA y GLI, indican que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos para semen equilibrado. Asimismo, se determinó que hay diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre tratamientos para semen descongelado, observando que 7 y 9 % de DMFA tienen mayor acción crioprotectora que 5% de DMFA y a la vez nos indica que el tratamiento de semen con DMFA antes de la criopreservación da mejores resultados que el uso de glicerol (cuadro 26).

Para semen equilibrado nuestro resultado es inferior a los reportes de Cayo (2013) y Franco (2015). Para semen descongelado nuestro resultado es inferior a Cayo (2013), Quispe (2015a) y Franco (2015), estos reportes son para muestras colectadas por EE, asimismo nuestros resultados en semen equilibrado y descongelado son superiores a Ccalta (2017), para muestras de semen obtenido por PC, estudios que fueron evaluados en un sistema CASA, asimismo Paucar (2011) reporta valores similares en semen equilibrado y descongelado, Zirena

(2014) en muestras obtenidas por VA, reporta valores superiores de motilidad en semen equilibrado y descongelado. Esta diferencia principalmente podría ser al método de obtención de semen, al tipo de dilutor y crioprotector utilizado, el protocolo de congelación y la motilidad inicial de las muestras, ya que muestras con una motilidad mayor al 60% en fresco tienen mejor respuesta a la congelación, también al efecto individual del macho y la estacionalidad reproductiva.

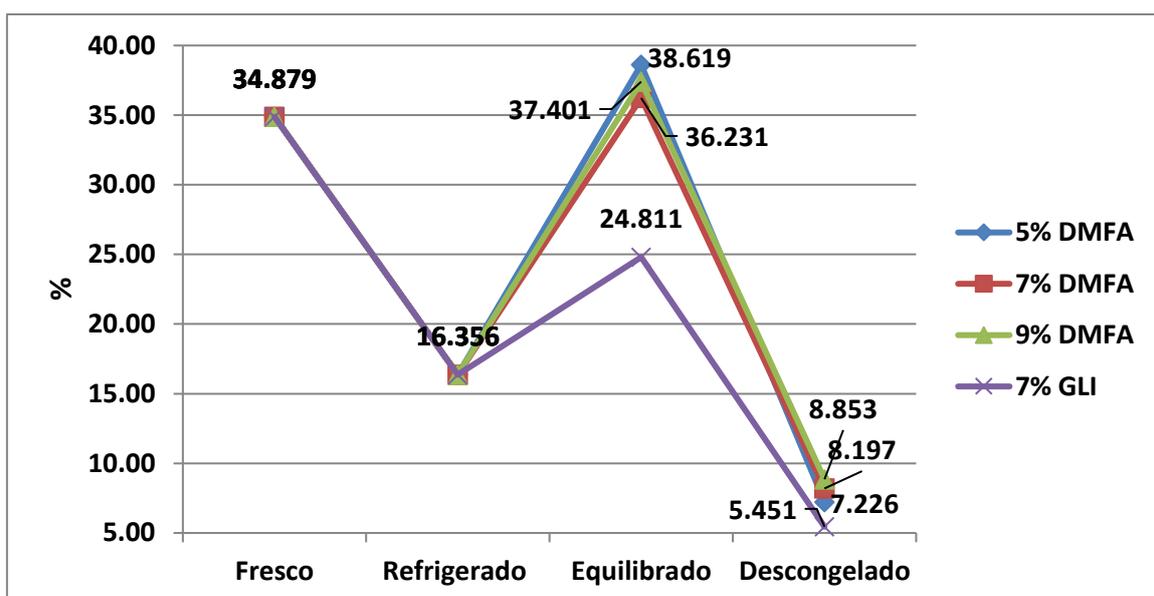


Gráfico 9. Variación de la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado, equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE utilizando DMFA y GLI.

En el gráfico 9, observamos que la motilidad desciende en muestra refrigerada, pero aumenta en el equilibrado, esto debido posiblemente a la adición de DMFA, ya que con el nivel de glicerol no es observado.

c. Motilidad de espermatozoides progresivos y no progresivos

Los resultados promedios de EMP y EMNP obtenidas de semen de alpacas macho, en los diferentes tratamientos, indican que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos para EMP en muestra equilibradas y descongeladas, mientras para EMNP, se determinó que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos para semen equilibrado, y diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre tratamientos para semen descongelado, observando que 7 y 9 % de DMFA

tienen mayor acción crioprotectora que 5% de DMFA y a la vez nos indica que el tratamiento de semen con DMFA antes de la criopreservación da mejores resultados que el uso de glicerol (cuadro 27).

Los resultados obtenidos en semen equilibrado, es inferior a los datos reportados por Cayo (2013) y Franco (2015) y superior a Flores *et al.* (2015) y para semen descongelado los resultados obtenidos son menores a Cayo (2013), Franco (2015) y Quispe (2015a) y similar a Flores *et al.* (2015). Esta diferencia posiblemente se debe al tipo de dilutor y crioprotector utilizado, al tipo de congelación, la motilidad inicial de las muestras.

Cuadro 27. Porcentaje de EMP y EMNP en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de de DMFA y GLI.

Momento de evaluación	N	EMP (%)		EMNP (%)	
		Media	± DS	Media	± DS
Equilibrado		ns		*	
T1: 5% DMFA	15	3.125 a	3.016	35.494 a	13.320
T2: 7% DMFA	15	2.714 a	2.275	33.516 a	12.167
T3: 9% DMFA	15	2.299 a	2.629	35.102 a	15.829
T4: 7% GLI	15	2.317 a	2.809	22.494 b	11.594
Descongelado		ns		**	
T1: 5% DMFA	15	0.335 ab	0.514	6.891 b	3.978
T2: 7% DMFA	15	0.272 ab	0.470	7.925 a	4.487
T3: 9% DMFA	15	0.387 a	0.336	8.466 a	5.727
T4: 7% GLI	15	0.092 b	0.163	5.359 c	4.708

Letras distintas muestran diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$).

d. Parámetros de velocidad

Los resultados medios obtenidos de los parámetros de velocidad (VCL, VSL, VAP, ALH y BCF) se muestran en el cuadro 28. Para semen equilibrado no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos para VCL, VSL y BCF. Mientras se determinó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para VAP y ALH.

Cuadro 28. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen equilibrado y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.

Parámetros de velocidad		VCL		VSL		VAP		ALH		BCF	
Momento de evaluación	N	Media (µm/s)	±DS	Media (µm/s)	±DS	Media (µm/s)	±DS	Media (µm)	±DS	Media (Hz)	±DS
Equilibrado		ns		ns		**		*		ns	
T1: 5% DMFA	15	53.94 a	16.3	11.98 ab	4.02	22.37 a	6.20	1.53 a	1.12	3.74 a	2.93
T2: 7% DMFA	15	53.15 ab	10.8	12.09 a	3.72	22.08 a	5.39	1.71 a	1.11	4.04 a	2.63
T3: 9% DMFA	15	53.94 a	11.3	11.52 ab	3.47	23.18 a	4.69	1.36 ab	0.94	3.11 a	2.40
T4: 7% GLI	15	46.74 b	13.7	10.36 b	3.53	18.95 b	5.56	1.04 b	0.89	2.77 a	2.37
Descongelado		**		*		**		ns		ns	
T1: 5% DMFA	15	38.86 a	17.5	8.20 a	4.19	16.40 a	7.40	0.26 ab	0.32	0.82 ab	1.46
T2: 7% DMFA	15	38.34 a	17.1	8.99 a	4.63	16.30 a	6.71	0.38 ab	0.73	0.96 ab	1.93
T3: 9% DMFA	15	38.64 a	20.3	9.68 a	5.53	17.77 a	8.52	0.48 a	0.43	1.09 a	1.10
T4: 7% GLI	15	19.44 b	13.1	4.72 b	3.39	8.39 b	5.78	0.09 b	0.17	0.28 b	0.58

Letras distintas muestran diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0.01$).

También, en semen descongelado se diferencias significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos para VCL, VSL y VAP, y no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$) entre tratamientos para ALH y BCF. Las muestras que contenían DMFA como crioprotector ofrecen mejor respuesta a la congelación en comparación al glicerol (cuadro 28).

En semen equilibrado los valores obtenidos de VCL, VSL y VAP son similares a Flores *et al.* (2015). Mientras, Franco (2015) reporta valores superiores de VCL, VSL y VAP y valores inferiores de ALH y BCF, en muestras de semen equilibrado.

Para semen descongelado Flores *et al.* (2015) reporta valores similares de VCL, VSL y VAP, mientras Franco (2015) y Quispe (2015a) reportan valores de parámetros de motilidad inferiores a los resultados obtenidos en muestras de semen con uso de DMFA en la congelación, mientras los valores obtenidos con 7% de glicerol es similar a los resultados de Franco (2015) y Quispe (2015a). Esta diferencia posiblemente se da por el tipo de crioprotector utilizado y podría indicar que la DMFA ofrece mejor protección espermática en la etapa de criopreservación.

e. Morfometría espermática

Los resultados de morfometría espermática de las variables de cabeza y pieza intermedia, para muestras evaluadas en fresco y descongelado se muestran en el cuadro 29. Al hacer la comparación de medias entre células espermáticas evaluadas en la etapa inicial (fresco) y descongelado se observó diferencias altamente significativas ($p < 0.01$), para todas las variables a excepción del ángulo de inserción de pieza intermedia, entre los diferentes tratamientos, indicando que hay variación en el tamaño de la cabeza en fresco y descongelado.

Cuadro 29. Morfometría espermática en semen fresco y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.

Parametros morfometricos	Fresco		Desc. 5% DMFA		Desc. 7% DMFA		Desc. 9% DMFA		Desc. 7% GLI		Test de Kruskal - Wallis	
	N = 2060		N = 1500		N = 1852		N = 1942		N = 2004			
	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS		
Cabeza	Largo (µm)	5.804	0.505	5.461	0.529	5.565	0.481	5.545	0.495	5.503	0.493	<.0001
	Ancho (µm)	3.161	0.313	3.052	0.314	3.109	0.297	3.088	0.302	3.095	0.309	<.0001
	Área (µm ²)	15.029	2.032	13.861	1.957	14.369	1.852	14.249	1.842	14.149	1.815	<.0001
	Perímetro (µm)	17.040	1.749	16.524	1.551	16.566	1.413	16.526	1.402	16.560	1.442	<.0001
	Acrosoma (%)	49.958	7.179	50.678	7.140	49.071	7.620	49.171	7.239	50.081	7.261	<.0001
	Elipticidad*	1.850	0.215	1.803	0.221	1.803	0.204	1.809	0.213	1.793	0.222	<.0001
	Rugosidad*	0.657	0.085	0.642	0.077	0.661	0.075	0.658	0.069	0.653	0.077	<.0001
	Elongación*	0.294	0.052	0.282	0.055	0.283	0.052	0.284	0.054	0.279	0.056	<.0001
Regularidad*	0.960	0.046	0.946	0.050	0.947	0.049	0.945	0.052	0.946	0.049	<.0001	
Pieza intermedia (PI)	Ancho (µm)	1.367	0.442	1.470	0.596	1.485	0.562	1.491	0.556	1.483	0.580	<.0001
	Área (µm ²)	3.706	0.941	3.125	0.973	3.442	1.056	3.374	0.953	3.342	1.001	<.0001
	Distancia de inserción (µm)	0.215	0.158	0.217	0.166	0.219	0.160	0.208	0.146	0.208	0.161	0.4019
	Angulo de inserción (°)	15.280	14.164	8.394	8.037	8.713	8.679	8.860	8.102	9.242	9.994	<.0001

Desc.: Descongelado*: Variables no dimensionales

Asimismo, en el cuadro 29 se observa que la media obtenida para largo, ancho, área y perímetro de cabeza de espermatozoides en fresco es mayor a los espermatozoides descongelados con 5, 7 y 9% de DMFA y 7% de glicerol.

El porcentaje de acrosoma se observa que es menor para 5% de DMFA y 7% de glicerol y es mayor en el tratamiento con 7 y 9% de nivel de DMFA. Esta diferencia entre espermatozoides fresco y descongelado se observó también en espermatozoides congelados de oso pardo (Álvarez *et al.*, 2008) usando 8% de glicerol en semen obtenido por EE, donde se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.01$) entre espermatozoides evaluados en fresco y descongelado. También, Ccalta (2017) en un estudio de morfometría en espermatozoide de alpaca obtenido por PC, indica que los espermatozoides evaluados en fresco tienen mayor área, ancho, altura y perímetro de cabeza en comparación a muestras evaluadas en semen descongelado, observando diferencia significativa ($p < 0.01$).

f. Funcionalidad de membrana espermática.

El análisis de variancia de los resultados promedios de reacción total de la funcionalidad de la membrana espermática, indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre tratamientos para muestras de semen descongelado. pero se observa que el uso de 7% de DMFA ofrece mejor respuesta al post-descongelado (cuadro 30).

Cuadro 30. Reacción total de la funcionalidad de membrana espermática en semen descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.

Momento de evaluación	N	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Descongelado		ns				
T1: 5% DMFA	9	27.268 a	8.807	32.299	15.126	39.744
T2: 7% DMFA	9	28.347 a	4.350	15.347	21.296	35.000
T3: 9% DMFA	9	23.448 a	6.912	29.478	15.455	34.426
T4: 7% GLI	9	25.373 a	5.926	23.357	15.730	31.579

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos en semen descongelado son superiores a los reportes de Zirena (2014) y Ccalta (2017) en muestras de semen obtenido por VA y PC, respectivamente. Quispe (2018) obtuvo valores superiores en muestras de semen colectado por VA y PC. Esta diferencia podría ser posiblemente al tipo de colección, al tratamiento de la viscosidad de semen y la osmolaridad de la solución ya que generalmente a menor solución hipoosmotica se obtiene mayor reacción de la membrana espermatica.

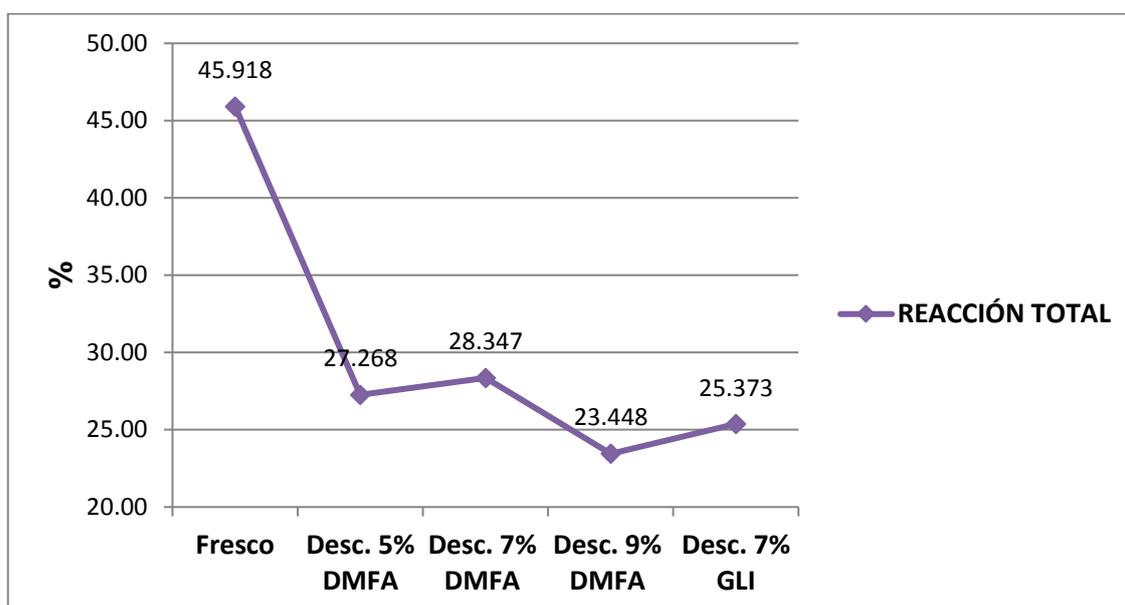


Gráfico 10. Variación de la reacción total de la funcionalidad de membrana espermática en semen fresco y descongelado de alpacas colectadas por EE con uso de DMFA y GLI.

En el grafico 10, se observa que la funcionalidad de la membrana espermática se ve dañada con el proceso de congelación, y los niveles de 5 y 7% de DMFA demuestran ser mejores a 9% de DMFA y 7% de glicerol.

El análisis de la interacción entre los dos métodos de colección, no se hizo porque las muestras de semen obtenidas son muy diferentes entre sí, el método de DCD tiene ausencia de plasma seminal y por ende no presenta viscosidad, y muy por el contrario por el método EE se obtienes muestras con alta presencia de

plasma seminal y una mayor viscosidad, por lo que el efecto de la dimetilformamida en la congelación de semen de alpaca tiene respuestas muy diferentes y no sería correcto comparar los métodos de colección; además nuestro objetivo fue determinar el efecto de la DMFA en la congelación con semen obtenido en los dos métodos de colección.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. Para el objetivo 1, no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) para vitalidad, motilidad y parámetros de velocidad espermática (VCL, VSL, VAP, ALH y BCF) en semen descongelado con 5, 7 y 9% de DMFA en semen obtenido por DCD y EE.
2. Las características microscópicas obtenidas para el objetivo 2, no existe diferencia significativa ($p>0.05$), para vitalidad, motilidad, funcionalidad de membrana y parámetros de velocidad de muestras congeladas con 5, 7 y 9% de DMFA y 7% de glicerol para muestras obtenidas por el método DCD. Para el método de EE se encontró que no hay diferencia significativa ($p>0.05$) para vitalidad y funcionalidad de membrana espermática, pero si se encontró diferencia significativa ($p<0.01$) para la motilidad y los parámetros de motilidad, obteniendo mejores resultados con 7 y 9 % de DMFA, siendo superior a 7% de glicerol. Asimismo, se encontró diferencia significativa ($p<0.01$) para las medidas de morfometría espermática entre espermatozoides frescos y descongelados obtenidos por DCD y EE.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

1. Realizar la criopreservación de semen de alpaca obtenido por aspiración vaginal y vagina artificial utilizando dimetilformamida como crioprotector.
2. Determinar nuevos niveles de dimetilformamida, reemplazando el dilutor base tris y utilizando nuevos dilutores en la criopreservación de semen de alpaca.
3. Realizar trabajos de inseminación artificial, utilizando semen congelado con uso de 7% de dimetilformamida.
4. Determinar un protocolo adecuado para la congelación del semen, el enfriamiento, equilibrado, adición de crioprotector, congelación y descongelación tomando en cuenta el uso de la dimetilformamida como crioprotector.

CAPITULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. P., Ratto, M. H., Collins, C. W., y Bergfelt, D. R. (2009). Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology* 71,166–175.
- Alarcón, V., García, W., y Bravo, P. W. (2012). Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev. Inv. Vet. Perú* 23(1), 58-64.
- Aller, J. F., Rebuffi, G. E., Cancino, A. K., y Alberio, R. H. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec.* 52, 15-23.
- Alvarenga, M. A., Moreira, R. M., y Cesarino, M. M. (2000). Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using packaging systems. *Equine Veterinary Journal* 32(6), 541-545.
- Alvarenga, M. A., Leão, K. M., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., Medeiros, A. S. L., y Gomes, G. M. (2005). Amides as an alternative cryoprotectors for freezing stallion semen: A review. *Anim. Reprod. Science* 89(1-4), 105-13.
- Alvarenga, M. A., y Papa, F. O. (2011). Principales avances en procesamiento y aplicación de semen congelado de equinos. *Spermova* 1(1), 7-10.
- Alvarez, M., Garcia-Macias, V., Martinez-Pastor, F., Martinez, F., Borragan, S., Mata, M., Garde, J., Anel, L., y De Paz, P. (2008). Effects of cryopreservation on head morphometry and its relation with chromatin status in brown bear (*Ursus arctos*) spermatozoa. *Theriogenology* 70, 1498 - 1506.
- Avila, R. (2009). *Efecto de la congelación y descongelación de semen equino, en dos diluyentes comerciales* (Tesis de pregrado). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
- Baca, L. (1998). *Evaluación del tiempo optimo del equilibrado con tres dilutores en el congelamiento de semen de alpacas* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Banda, R. J., Evangelista, V. S., Ruiz, G. L., Sandoval, M. R., Rodríguez, L. C., Valdivia, C. M., y Santiani, A. A. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev. Inv. Vet. Perú* 21(2), 145-153.
- Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J., y Ordoñez, C. (1997). Collection of Semen and Insemination Artificial of Alpacas. *Theriogenology* 47(3), 619-626.

- Bravo, P. W., Ccallo, M., y Garnica, J. (2000). The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Rumin. Res.* 38, 91–95.
- Bravo, P. W., Alarcón, V., Baca, L., Cuba, Y., Ordoñez, C., Salinas, J. y Tito, F. (2013). Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Animal Reprod. Science* 136, 157–163.
- Bustanza, V. (2001). *La Alpaca: Crianza, Manejo y Mejoramiento*. Puno, Perú: Editorial Universitaria. 1 ed., 343 p.
- Calderón, N. (2015). *Caracterización de patrones de movimiento de espermatozoides de alpaca (Vicugna pacos)* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Canorio, N. M. (2008). *Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (Lama pacos)* (Tesis de Maestría). UNMSM, Lima, Perú.
- Cárdenas, N. (2002). *Inseminación artificial con espermatozoides congelados colectados de los conductos deferentes en alpacas* (Tesis de pregrado). UNA, Puno, Perú.
- Cárdenas, H., Vivanco, W., y Bravo, F. (1987). Comparativo de dos métodos de colección de semen en alpacas. En: *Resumen de la X Reunión Científica Anual de Asociación Peruana de Producción Animal*, Puno, Perú. Pag. 86.
- Carretero, M. I., Santa Cruz, R., Neild, D., Arraztoa, C., Fumuso, F., y Giuliano, S. M. (2013). Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen en llama (*Lama glama*). *Spermova* 3(2), 174 - 176.
- Cayo, S. (2013). *Inseminación artificial de alpacas (Lama pacos) con semen fresco, refrigerado y congelado colectado por el método de electroeyaculación* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Ccalta, R. (2017). *Efecto de la adición del colesterol en la criopreservación de semen de alpaca (Vicugna pacos)* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Choez, A. K. (2010). *Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos*. UNMSM, Lima: Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos – SIRIVS.
- Choez, K., Evangelista, S., Ruiz, L., Sandoval, R., y Santiani, A. (2014). Efecto de la concentración de tres crioprotectores sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de espermatozoides criopreservados de epidídimo de alpaca. *Spermova* 4(1), 80 - 82

- Cuba, Y. (2000). *Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del semen de alpaca (Lama pacos) antes y después del proceso de congelado* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Diaz, H. (2014). *Evaluación de las características bioquímicas del plasma seminal de alpacas, fresco y post descongelamiento* (Tesis de pregrado). UNMSM, Lima, Perú.
- Director, A., Giuliano, S., Trasorras, V., Carretero, I., Pinto, M., y Miragaya, M. (2007). Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research* 14(2), 203-206.
- Fernández Baca, S., y Calderón, W. (1966). Methods of collection of semen in the alpaca. *Revista de la FMV, UNMSM* 13, 18 – 20.
- Flores, N. H., Cucho, H., Carretero, M. I., Ciprian, R., Quispe, H. A., Calderón, N., Miragaya, M. H., y Giuliano, S. M. (2015). Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la movilidad de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS®. *Spermova* 5(1), 47-50.
- Franco, E. (2015). *Criopreservación de semen de alpaca (Lama pacos) en pellets* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- García, W., Pezo, D., San Martín, F., Olazábal, J. P., y Franco, F. (2005). *Manual del Técnico Alpaquero*. Lima, Perú: ITDG. 1 ed., 105 p.
- Giuliano, S. M., y Santa Cruz, C. R. (2011). Métodos de recuperación de espermatozoides en camélidos. *Spermova* 1(1), 58-59.
- Giuliano, S. M. (2012). Extracción y Evaluación de Semen de Camélidos Sudamericano. *Spermova* 2(1), 6 - 9.
- Gonzales, H. (2008). Obtención y Criopreservación de Espermatozoides de Alpacas. *Scientia* 10(10), 223-234.
- Gonzales, M. L., Huanca, T., y Cárdenas, O. (2011). Evaluación de la fertilidad en alpacas inseminadas con semen refrigerado a diferentes tiempos post inducción de ovulación. *Spermova* 1(1), 64-65.
- Hafez, E. S. E., y Hafez, B. (eds.). (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. México D.F., México: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 7 ed., 519 p.
- Hammerstedt, R. H., y Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29(1), 26-38.

- Hanzen, C., Cucho, H., Ampuero, E., Ordoñez, C., y Sumar, J. (eds.). (2014). *Principios de la reproducción de los camélidos sudamericanos*. Cusco, Perú: Editorial Universitaria. 1 ed., 157 p.
- Huanca, T., Mamani, R. H., Naveros, M. L., Pacheco, J. I., y Condori, N. (2011). Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos*). *Spermova* 1(1), 98-100.
- Huanca, T., Mamani, R. H., Naveros, M. L., y Gonzales, M. (2012). Influencia de la colectas sucesivas y color del semen sobre algunas características de semen en alpacas. En: *Resumen del VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos*, Arica, Chile. Pag. 120.
- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T., y Adams, G. P. (2007). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15(1), 195-201.
- Jeyendran, R. S., Van Der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., y Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility* 70(1), 219-228.
- Juyena, N. (2011). *Protein Profiles and Biochemical Characteristics of semen: Influence on Frozen-Thawed Spermatozoal Quality in rams (Ovis aries) and alpaca (Vicugna pacos)* (Tesis doctoral). Universita Degli Studi di Padova, Padova, Italia.
- Kershaw-Young, C. M., y Maxwell, W. M. (2012a). Advancing artificial insemination in camelids, particularly the alpacas. RIRDC Publication 12/016.
- Kershaw-Young, C. M., y Maxwell, W. M. (2012b). Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species. *Reprod. Dom. Anim.* 47(4), 369-375.
- López, Y. (2014). *Comparación de tres métodos de tinción para determinar la morfometría del espermatozoide de alpaca usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS)* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Mellisho, E. (2010). *Manual de Laboratorio de Reproducción Animal, Practica IV: Evaluación de Calidad Seminal*. UNALM, Lima, Perú
- Mesa, A. M. (2010). *Efecto del colesterol y la dimetilformamida sobre la criosupervivencia de espermatozoides de caballos criollos colombianos*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.

- Meza, A. (2014.) *Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de alpaca (Lama pacos), colectado por desviación del conducto deferente* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Morton, K. M., y Maxwell, W. M. C. (2006). The continued development of artificial insemination technologies in alpacas. University of Sydney - NSW, Australia: ReproGen – RIRDC
- Naveros, M. L., y Contreras, M. (2014). Evaluación de dos dilutores comerciales en la congelación de semen con fines de inseminación artificial en alpacas (*Vicugna pacos*). En: *Memorias de la XXXVII Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal*, Abancay, Perú.
- Olaguivel, C., y Naveros, M. (2014). Efecto de la enzima colagenasa en la congelación de semen en alpacas (*Vicugna pacos*). *Spermova* 4(1), 64.
- Ordóñez, C., Ampuero, E., Cucho, H., y Chalco, G. (2012). Caracterización Morfométrica de los Espermatozoides de Alpaca Usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). *Spermova* 2(1), 67-68.
- Ordóñez, C., Ampuero, E., Cucho, H., y Franco, E. (2012). Avances en la determinación de la velocidad del espermatozoide de alpaca en semen diluido usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). *Spermova* 2(1), 63-64.
- Pacheco, J. I. (2008). Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *Revista Electrónica de Veterinaria* 9(5), 1-15.
- Pacheco, J., Mamani, R., Franco, F., Zea, O., Pezo, D., y Vélez, V. (2014). Efecto de la osmolaridad sobre la respuesta endosmótica en espermatozoides de epidídimo y eyaculados de alpaca (*Vicugna pacos*). *Spermova* 4(1), 36-38.
- Paricahua, E. (2001). *Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca* (Tesis de pregrado). UNA, Puno, Perú.
- Paucar, A. D. (2011). *Evaluación de cuatro dilutores comerciales en la congelación de semen de alpacas colectados con vagina artificial y post copula* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Pérez, M. G., Zevallos, J., y Pérez, U. H. (2014). Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. *Spermova* 4(2), 139-144.

- Pineda, S., y Pinilla, S. M. (2007). *Comparación de dos diluyentes (lactosa-glicerol-yema de huevo; INRA-Dformamida-yema de huevo) en la preservación de semen equino* (Tesis de pregrado). Universidad de La Salle, Colombia.
- PROISER (Projects i Serveis R+D S.L). (2010). Manual de uso del ISAS® - Integrated Sperm Analysis System. Projectes I Serveis R+D S.L., España.
- Quintano, J. (2001). *Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (Lama pacos) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores* (Tesis de pregrado). UNA. Puno, Perú.
- Quinteros-Moreno, A. A. (2003). *Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, conejo y cerdo* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Quispe, D. (2015). *Evaluación reproductiva del plantel de reproductores del banco de germoplasma de alpacas de color del CICAS - La Raya* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Quispe, H. A. (2015). *Funcionalidad de la membrana espermática en semen de alpaca (Vicugna pacos)* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Quispe, W. Y. (2018). *Comparación del efecto de dos curvas de congelación en semen de alpaca (Vicugna pacos) colectada por vagina artificial y post cópula* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Quintanilla, R. E. (2009). *Efecto del empajillado y método de congelado sobre la sobrevivencia de los espermatozoides del conducto deferente de alpacas* (Tesis de pregrado). UNA, Puno, Perú.
- Restrepo, G., Gómez, J., y Vásquez, N. (2011). Criopreservación de semen canino por congelación rápida con glicerol y Dimetilformamida. *Revista Lasallista de Investigación* 8(2), 9-17.
- Rios, C. A. (2013). *Categorización de alpacas macho reproductores huacaya blanco del CICAS - La Raya de acuerdo a las características fenotípicas, la calidad de fibra y semen* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Rodríguez, M. (2014). *Índice de fragmentación del ADN espermático y test de HOST en semen de llamas (Lama glama) utilizando el ISAS* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Salamon, M., y Maxwell, W. M. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62(1-3), 77-111.

- Sandoval, R. S. (2005). *Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes* (Tesis de pregrado). UNMSM, Lima, Perú.
- Santiani, A., Huanca, W., Sapaná, R., Huanca, T., Sepúlveda, N., y Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen thawed alpaca semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.* 7, 303-309.
- Sepúlveda, H. N. (2011). *Manual para el manejo de camélidos sudamericanos domésticos*. Santiago, Chile: Fundación para la Innovación Agraria.
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A., Fernández, M., y Nuñez, J. (2005). Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology*, 64, 1236–1243.
- Sorensen, A. M. (1991). *Reproducción animal, principios y prácticas*. México: Ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Sumar, J. (2002). Llamas y alpacas. En Hafez, E. S. E., y Hafez, B. (Eds.). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (pp. 224-242). México D.F., México: Ed. McGraw-Hill Interamericana, 7 ed.
- Sumar, J., y Leyva, V. (1981). Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). En *Resumen*, del IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos, Punta Arenas, Chile. p. 12.
- Vasquez, J., Florentini, E., y Valdivia, M. (2012). Hypoosmotic Swelling Test in alpaca (*Vicugna pacos*) epididymal spermatozoa. *Reprod. Dom. Anim.* 47(6), 83-87.
- Vaughan, J. L., Galloway, D., Hopkins, D. (2003). Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Australia, RIRDC, Project AAA-1A.
- Zimmermann, F. M. (2007). *Efecto de la dilución de crioprotector dimetilformamida en muestras de semen de equino descongeladas, utilizando dos diferentes diluyentes comerciales* (Tesis de Maestría). Universidad de Brasilia, Brasil.
- Zirena, N. (2014). *Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación* (Tesis de pregrado). UNMSM, Lima, Perú.

ANEXOS

ANEXO 1. Reactivos para la preparación de predilutor y dilutor base Tris

Preparación de **predilutor** utilizado para la recuperación de espermatozoides por desviación de conductos deferentes.

Fracción	Cantidad
Tris (gr.)	3.028
Ácido cítrico (gr.)	1.70
Fructuosa (gr.)	1.25
Agua bidestilada (ml)	100

Preparación de dilutor base Tris (dilutor A).

Para la preparación de 100 ml de dilutor A, se uso lo siguiente:

Fracción	Cantidad
Tris (gr)	3.028
Ácido cítrico (gr)	1.70
Fructuosa (gr)	1.25
Yema de huevo (ml)	25
Agua bidestilada (ml)	75
Total (ml)	100

Una vez preparado el dilutor fue filtrado con un filtro de nylon de 20 μ m, para disminuir la presencia de glóbulos grasos presente en la yema de huevo.

Preparación de dilutor base Tris (dilutor B)

Para la preparación de 10 ml de dilutor B se usó lo siguiente:

Fracción	Niveles de crioprotector			
	5% DMFA	7% DMFA	9% DMFA	7% GLI
Dilutor A (ml)	9.5	9.3	9.1	9.3
Dimetilformamida (ml)	0.5	0.7	0.9	-
Glicerol (ml)	-	-	-	0.7
Total (ml)	10	10	10	10

ANEXO 2. Resultados de evaluación macroscópica y microscópica de espermatozoides recuperados por desviación del conducto deferente

Porcentaje del color espermático de alpacas colectadas por DCD.

Color	N	%
Blanco lechoso	19	63.33
Blanco cremoso	11	36.67
Total	30	100.00

Volumen espermático de alpacas colectado por DCD.

N	Promedio (ml)	± DS	% CV	Mínimo (ml)	Máximo (ml)
30	0.026	0.006	22.787	0.015	0.035

Concentración, vitalidad, motilidad espermática, EMP y EMNP en semen fresco de alpacas obtenido por DCD, para el objetivo 01.

Variable microscópica	N	Promedio	± DS	% CV	Mínimo	Máximo
Concentración (10⁶ spz/ml)	13	233.825	111.872	47.844	98.370	413.818
Vitalidad (%)	13	71.794	6.603	9.198	62.13	82.87
Motilidad (%)	13	32.587	18.109	55.572	5.947	61.045
EMP (%)	13	2.734	1.692	61.908	0.188	5.732
EMNP (%)	13	29.853	16.785	56.225	5.758	58.114

10⁶ spz/ml = millones de espermatozoides/ml.

Vitalidad, motilidad espermática, EMP y EMNP en semen refrigerado de alpacas obtenido por DCD, para el objetivo 01.

Variable microscópica	N	Promedio	± DS	% CV	Mínimo	Máximo
Vitalidad (%)	13	57.455	6.477	11.273	46.75	68.18
Motilidad (%)	13	34.455	15.630	45.362	12.695	61.221
EMP (%)	13	1.235	1.225	99.243	0.000	4.290
EMNP (%)	13	33.221	14.769	44.459	11.914	56.931

Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen fresco y refrigerado de alpacas colectadas por DCD, para el objetivo 01.

Parámetros de velocidad		VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)
Momento de evaluación	N	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
Fresco	13	48.46±7.88	13.36±1.98	26.84±3.46	2.06±0.19	2.56±0.50
Refrigerado	13	72.21±15.43	17.44±4.71	35.27±6.71	2.11±1.62	3.11±1.94

Concentración, vitalidad, motilidad espermática, EMP, EMNP y funcionalidad de membrana en semen fresco de alpacas obtenido por DCD, para el objetivo 02.

Variable microscópica	N	Promedio	± DS	% CV	Mínimo	Máximo
Concentración (10⁶ spz/ml)	16	340.810	116.775	34.264	143.097	505.780
Vitalidad (%)	17	75.701	4.147	5.478	66.42	81.01
Motilidad (%)	16	42.223	14.432	34.181	15.020	70.429
EMP (%)	16	4.264	1.237	29.013	1.420	5.592
EMNP (%)	16	37.959	13.637	35.926	12.830	65.272
Funcionalidad de membrana	9	55.800	19.355	34.687	31.564	80.980

10⁶ spz/ml = millones de espermatozoides/ml.

Vitalidad, motilidad espermática, EMP y EMNP en semen refrigerado de alpacas obtenido por DCD, para el objetivo 02.

Variable microscópica	N	Promedio	± DS	% CV	Mínimo	Máximo
Vitalidad (%)	15	55.543	3.825	6.886	48.67	61.83
Motilidad (%)	17	32.447	15.609	48.107	12.487	64.818
EMP (%)	17	2.747	1.630	59.335	0.495	5.439
EMNP (%)	17	29.699	14.867	50.057	11.238	60.146

Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen fresco y refrigerado de alpacas colectadas por DCD, para el objetivo 02.

Parámetros de velocidad		VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	ALH (µm)	BCF (Hz)
Momento de evaluación	N	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
Fresco	16	50.37±7.33	14.47±1.91	27.94±3.48	2.21±0.29	3.00±0.80
Refrigerado	17	81.48±10.86	21.20±4.09	38.45±4.71	3.46±1.40	5.70±1.77

ANEXO 3. Resultados de evaluación macroscópica de espermatozoides recuperados por electroeyaculación.

Porcentaje de color observado en semen de alpaca obtenido por EE.

Color	N	%
Blanco lechoso	6	30.0
Blanco lechoso claro	9	45.0
Blanco cristalino	5	25.0
Total	20	100

Valores de volumen, filancia y pH de semen fresco de alpaca obtenido por EE.

Variables	N	Promedio	± DS	% CV	Mínimo	Máximo
Volumen (ml)	20	2.740	1.295	47.281	1.0	5.0
Filancia (mm)	20	4.90	6.34	129.395	0	20
pH	14	8.106	0.144	1.776	7.90	8.30

Concentración, vitalidad y motilidad espermática en semen fresco de alpacas obtenido por EE, para el objetivo 01

Variable microscópica	N	Promedio	± DS	% CV	Mínimo	Máximo
Concentración (10 ⁶ spz/ml)	5	42.336	15.254	36.031	25.153	61.174
Vitalidad (%)	5	72.365	9.312	12.868	61.62	78.00
Motilidad (%)	5	16.242	11.758	72.390	5.497	31.119
EMP (%)	5	1.328	2.023	152.342	0.000	4.895
EMNP (%)	5	14.914	10.269	68.856	4.863	26.224

10⁶ spz/ml = millones de espermatozoides/ml.

Vitalidad, motilidad espermática, EMP y EMNP en semen refrigerado de alpacas obtenido por EE, para el objetivo 01.

Variable microscópica	N	Promedio	± DS	% CV	Mínimo	Máximo
Vitalidad (%)	5	57.823	5.780	9.997	52.63	65.29
Motilidad (%)	5	15.819	8.896	56.236	7.143	25.455
EMP (%)	5	0.289	0.448	155.046	0.000	1.020
EMNP (%)	5	15.530	9.232	59.447	6.122	25.455

Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen fresco y refrigerado de alpacas colectadas por EE, para el objetivo 01.

Parámetros de velocidad		VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Momento de evaluación	N	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS
Fresco	5	34.00 \pm 10.62	8.19 \pm 2.39	15.62 \pm 2.73	0.80 \pm 0.66	1.60 \pm 1.33
Refrigerado	5	44.37 \pm 19.81	8.54 \pm 3.24	18.96 \pm 6.08	0.13 \pm 0.19	0.47 \pm 0.65

Concentración, vitalidad, motilidad espermática, EMP, EMNP y funcionalidad de membrana en semen fresco de alpacas obtenido por EE, para el objetivo 02.

Variable microscópica	N	Promedio	\pm DS	% CV	Mínimo	Máximo
Concentración (10⁶ spz/ml)	15	66.257	40.092	60.510	27.535	143.749
Vitalidad (%)	15	77.322 a	10.068	13.021	51.28	90.12
Motilidad (%)	15	34.879 a	23.759	68.120	4.386	82.407
EMP (%)	15	4.559 a	7.227	158.520	0.338	28.974
EMNP (%)	15	30.320 a	19.206	63.345	3.509	73.768
Funcionalidad de membrana	9	45.918 a	8.908	19.400	32.278	62.727

10⁶ spz/ml = millones de espermatozoides/ml.

Vitalidad, motilidad espermática, EMP y EMNP en semen refrigerado de alpacas obtenido por EE, para el objetivo 02.

Variable microscópica	N	Promedio	\pm DS	% CV	Mínimo	Máximo
Vitalidad (%)	15	56.354	7.874	13.972	42.86	67.82
Motilidad (%)	15	16.356	8.564	52.357	1.243	33.628
EMP (%)	15	2.359	2.637	111.818	0.000	8.555
EMNP (%)	15	13.998	6.501	46.440	1.243	25.074

Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen fresco y refrigerado de alpacas colectadas por EE, para el objetivo 02.

Parámetros de velocidad		VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Momento de evaluación	N	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS
Fresco	15	40.15 \pm 10.5	8.19 \pm 3.19	17.21 \pm 3.71	1.22 \pm 0.64	3.04 \pm 2.22
Refrigerado	15	36.27 \pm 12.1	10.56 \pm 3.60	17.37 \pm 4.99	1.09 \pm 0.79	3.96 \pm 2.85

ANEXO 4. Análisis de Variancia para el objetivo 1 de las características microscópicas en muestra equilibrado y descongelado de semen de alpacas colectadas por DCD.

ANVA de espermatozoides vivos en semen equilibrado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.03023092	0.01511546	3.73	0.1217
TRATAMIENTO	2	0.00419465	0.00209733	0.52	0.6308
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.01619340	0.00404835	0.36	0.8321
Error	30	0.33339245	0.01111308		
Corrected Total	38	0.38514144			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.134364	18.34185	0.105419	0.574744

ANVA de espermatozoides vivos en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00317072	0.00158536	0.55	0.6167
TRATAMIENTO	2	0.00969926	0.00484963	1.67	0.2966
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.01159968	0.00289992	0.31	0.8722
Error	29	0.27568365	0.00950633		
Corrected Total	37	0.30012505			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.081437	20.51958	0.097500	0.475158

ANVA de motilidad espermática en semen equilibrado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.66724771	0.33362386	199.06	<.0001
TRATAMIENTO	2	0.00142887	0.00071443	0.43	0.6795
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00670387	0.00167597	0.12	0.9735
Error	30	0.41174165	0.01372472		
Corrected Total	38	1.08720723			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MT Mean
0.621285	35.86866	0.117153	0.326615

ANVA de motilidad espermática en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.20383938	0.10191969	32.34	0.0034
TRATAMIENTO	2	0.00870839	0.00435419	1.38	0.3498
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.01260737	0.00315184	0.52	0.7217
Error	30	0.18187525	0.00606251		
Corrected Total	38	0.40886769			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MT Mean
0.555173	52.09508	0.077862	0.149462

ANVA de EMP en semen equilibrado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00008325	0.00004163	3.53	0.1309
TRATAMIENTO	2	0.00009137	0.00004569	3.87	0.1160
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00004719	0.00001180	0.69	0.6031
Error	30	0.00051125	0.00001704		
Corrected Total	38	0.00074344			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MP Mean
0.312315	89.94305	0.004128	0.004590

ANVA de EMP en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00002001	0.00001000	1.05	0.4287
TRATAMIENTO	2	0.00001172	0.00000586	0.62	0.5836
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00003794	0.00000949	0.65	0.6316
Error	30	0.00043805	0.00001460		
Corrected Total	38	0.00050892			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MP Mean
0.139261	137.9882	0.003821	0.002769

ANVA de EMNP en semen equilibrado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.64904641	0.32452321	192.04	0.0001
TRATAMIENTO	2	0.00141772	0.00070886	0.42	0.6833
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00675956	0.00168989	0.13	0.9713
Error	30	0.39799680	0.01326656		
Corrected Total	38	1.05542374			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MNP Mean
0.622903	35.82742	0.115181	0.321487

ANVA de EMNP en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.19964193	0.09982097	32.63	0.0033
TRATAMIENTO	2	0.00839037	0.00419519	1.37	0.3519
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.01223654	0.00305913	0.49	0.7418
Error	30	0.18665630	0.00622188		
Corrected Total	38	0.40874867			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MNP Mean
0.543347	53.78105	0.078879	0.146667

ANVA de VCL en semen equilibrado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	14.347891	7.173946	0.12	0.8923
TRATAMIENTO	2	1567.655926	783.827963	12.81	0.0182
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	244.751767	61.187942	0.81	0.5263
Error	30	2255.105695	75.170190		
Corrected Total	38	4039.663590			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VCL Mean
0.441759	14.87416	8.670074	58.28949

ANVA de VCL en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	1411.160423	705.580211	12.90	0.0180
TRATAMIENTO	2	796.789819	398.394909	7.28	0.0464
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	218.840924	54.710231	0.23	0.9208
Error	30	7213.804515	240.460150		
Corrected Total	38	9627.127974			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VCL Mean
0.250679	32.82196	15.50678	47.24513

ANVA de VSL en semen equilibrado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	62.23468308	31.11734154	24.82	0.0056
TRATAMIENTO	2	73.35408310	36.67704155	29.26	0.0041
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	5.01474692	1.25368673	0.19	0.9435
Error	30	201.5555700	6.7185190		
Corrected Total	38	341.6503897			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VSL Mean
0.410053	18.57116	2.592011	13.95718

ANVA de VSL en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	71.48701756	35.74350878	7.37	0.0455
TRATAMIENTO	2	82.31169595	41.15584798	8.49	0.0363
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	19.38954128	4.84738532	0.34	0.8501
Error	30	430.2045950	14.3401532		
Corrected Total	38	601.0972359			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VSL Mean
0.284301	34.04803	3.786839	11.12205

ANVA de VAP en semen equilibrado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	95.1412741	47.5706371	3.78	0.1197
TRATAMIENTO	2	234.2934717	117.1467358	9.31	0.0313
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	50.3221467	12.5805367	0.53	0.7179
Error	30	718.403010	23.946767		
Corrected Total	38	1087.745831			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VAP Mean
0.339549	14.83480	4.893543	32.98692

ANVA de VAP en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	436.3347859	218.1673929	10.45	0.0258
TRATAMIENTO	2	233.8080200	116.9040100	5.60	0.0693
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	83.5236841	20.8809210	0.27	0.8966
Error	30	2342.704530	78.090151		
Corrected Total	38	3084.259836			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VAP Mean
0.240432	34.05073	8.836863	25.95205

ANVA de ALH en semen equilibrado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	1.69623231	0.84811615	6.52	0.0552
TRATAMIENTO	2	0.19277881	0.09638940	0.74	0.5326
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.52068769	0.13017192	0.61	0.6618
Error	30	6.45088000	0.21502933		
Corrected Total	38	8.92675897			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALH Mean
0.277355	90.74154	0.463713	0.511026

ANVA de ALH en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.45404769	0.22702385	1.78	0.2798
TRATAMIENTO	2	0.25718595	0.12859298	1.01	0.4418
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.50987615	0.12746904	0.93	0.4591
Error	30	4.10623000	0.13687433		
Corrected Total	38	5.36670769			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALH Mean
0.234870	137.8094	0.369965	0.268462

ANVA de BCF en semen equilibrado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	5.89111756	2.94555878	14.88	0.0140
TRATAMIENTO	2	0.60346167	0.30173083	1.52	0.3221
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.79207513	0.19801878	0.20	0.9355
Error	30	29.46611500	0.98220383		
Corrected Total	38	36.81503590			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BCF Mean
0.199617	105.2885	0.991062	0.941282

ANVA de BCF en semen descongelado de alpacas colectadas por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	3.20779333	1.60389667	2.92	0.1655
TRATAMIENTO	2	1.05493167	0.52746583	0.96	0.4569
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	2.20036821	0.55009205	0.63	0.6428
Error	30	26.06970000	0.86899000		
Corrected Total	38	32.58580000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BCF Mean
0.199967	150.3542	0.932196	0.620000

ANEXO 5. Análisis de variancia para el objetivo 1 de las características microscópicas en muestra equilibrado y descongelado de semen de alpaca colectadas por EE.

ANVA de espermatozoides vivos en semen equilibrado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.17776890	0.08888445	243.42	<.0001
TRATAMIENTO	2	0.00468358	0.00234179	6.41	0.0565
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00146060	0.00036515	0.07	0.9902
Error	6	0.03367450	0.00561242		
Corrected Total	14	0.21901440			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.846245	13.44509	0.074916	0.557200

ANVA de espermatozoides vivos en semen descongelado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.03011458	0.01505729	10.98	0.0237
TRATAMIENTO	2	0.00246254	0.00123127	0.90	0.4763
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00548507	0.00137127	0.38	0.8167
Error	5	0.01816100	0.00363220		
Corrected Total	13	0.05787836			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.686221	12.69367	0.060268	0.474786

ANVA de motilidad espermática en semen equilibrado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.14820450	0.07410225	8.18	0.0386
TRATAMIENTO	2	0.01591275	0.00795638	0.88	0.4830
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.03625520	0.00906380	1.57	0.2960
Error	6	0.03467350	0.00577892		
Corrected Total	14	0.23528400			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MT Mean
0.852631	24.52232	0.076019	0.310000

ANVA de motilidad espermática en semen descongelado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00825431	0.00412716	1.96	0.2554
TRATAMIENTO	2	0.00116339	0.00058170	0.28	0.7722
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00843206	0.00210802	0.41	0.7962
Error	5	0.02574450	0.00514890		
Corrected Total	13	0.04446771			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MT Mean
0.421052	71.14601	0.071756	0.100857

ANVA de EMP en semen equilibrado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00016373	0.00008187	0.40	0.6943
TRATAMIENTO	2	0.00004300	0.00002150	0.11	0.9026
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00081827	0.00020457	2.09	0.1997
Error	6	0.00058600	0.00009767		
Corrected Total	14	0.00159373			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MP Mean
0.632310	71.26907	0.009883	0.013867

ANVA de EMP en semen descongelado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00020579	0.00010289	142.23	0.0002
TRATAMIENTO	2	0.00000579	0.00000289	4.00	0.1112
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00000289	0.00000072	0.19	0.9362
Error	5	0.00001950	0.00000390		
Corrected Total	13	0.00023693			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MP Mean
0.917697	50.26870	0.001975	0.003929

ANVA de EMNP en semen equilibrado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.13724023	0.06862012	9.14	0.0322
TRATAMIENTO	2	0.01520425	0.00760213	1.01	0.4408
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.03003607	0.00750902	1.39	0.3411
Error	6	0.03237050	0.00539508		
Corrected Total	14	0.21439973			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MNP Mean
0.849018	24.88747	0.073451	0.295133

ANVA de EMNP en semen descongelado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00643333	0.00321667	1.56	0.3153
TRATAMIENTO	2	0.00109022	0.00054511	0.26	0.7799
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.00823917	0.00205979	0.39	0.8060
Error	5	0.02612300	0.00522460		
Corrected Total	13	0.04260293			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MNP Mean
0.386826	74.46207	0.072281	0.097071

ANVA de VCL en semen equilibrado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	1879.606000	939.803000	14.20	0.0152
TRATAMIENTO	2	8.003333	4.001667	0.06	0.9422
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	264.684000	66.171000	1.74	0.2591
Error	6	228.190000	38.031667		
Corrected Total	14	2439.689333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VCL Mean
0.906468	10.60105	6.166982	58.17333

ANVA de VCL en semen descongelado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	2018.433981	1009.216991	4.30	0.1008
TRATAMIENTO	2	18.723214	9.361607	0.04	0.9613
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	938.627413	234.656853	1.29	0.3863
Error	5	911.150000	182.230000		
Corrected Total	13	3982.074286			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VCL Mean
0.771187	35.20671	13.49926	38.34286

ANVA de VSL en semen equilibrado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	94.04900000	47.02450000	45.41	0.0018
TRATAMIENTO	2	4.35583333	2.17791667	2.10	0.2376
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	4.14200000	1.03550000	0.08	0.9867
Error	6	80.8650000	13.4775000		
Corrected Total	14	185.8573333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VSL Mean
0.564908	30.20712	3.671171	12.15333

ANVA de VSL en semen descongelado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	130.7939815	65.3969907	4.51	0.0944
TRATAMIENTO	2	1.6339286	0.8169643	0.06	0.9460
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	58.0129365	14.5032341	1.52	0.3249
Error	5	47.7700000	9.5540000		
Corrected Total	13	244.4571429			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VSL Mean
0.804587	33.54524	3.090955	9.214286

ANVA de VAP en semen equilibrado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	335.1506667	167.5753333	21.06	0.0075
TRATAMIENTO	2	8.5633333	4.2816667	0.54	0.6209
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	31.8213333	7.9553333	0.60	0.6797
Error	6	80.2000000	13.3666667		
Corrected Total	14	462.7973333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VAP Mean
0.826706	14.08700	3.656045	25.95333

ANVA de VAP en semen descongelado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	342.8600000	171.4300000	3.28	0.1435
TRATAMIENTO	2	10.3307143	5.1653571	0.10	0.9080
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	209.0574286	52.2643571	1.35	0.3692
Error	5	194.0300000	38.8060000		
Corrected Total	13	740.8542857			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VAP Mean
0.738100	35.10960	6.229446	17.74286

ANVA de ALH en semen equilibrado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	4.77833333	2.38916667	4.82	0.0859
TRATAMIENTO	2	0.14250000	0.07125000	0.14	0.8703
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	1.98066667	0.49516667	0.68	0.6320
Error	6	4.38500000	0.73083333		
Corrected Total	14	11.43333333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALH Mean
0.616472	82.73109	0.854888	1.033333

ANVA de ALH en semen descongelado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.40898148	0.20449074	3.12	0.1527
TRATAMIENTO	2	0.09285714	0.04642857	0.71	0.5454
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.26226984	0.06556746	1.04	0.4698
Error	5	0.31500000	0.06300000		
Corrected Total	13	1.11214286			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALH Mean
0.716763	94.97222	0.250998	0.264286

ANVA de BCF en semen equilibrado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	3.78233333	1.89116667	0.86	0.4902
TRATAMIENTO	2	0.06750000	0.03375000	0.02	0.9849
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	8.83266667	2.20816667	0.83	0.5515
Error	6	15.94500000	2.65750000		
Corrected Total	14	29.64400000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BCF Mean
0.462117	86.71192	1.630184	1.880000

ANVA de BCF en semen descongelado de alpacas colectadas por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	4.62481481	2.31240741	16.16	0.0121
TRATAMIENTO	2	0.75080357	0.37540179	2.62	0.1871
BLOQUE*TRATAMIENTO	4	0.57241270	0.14310317	0.41	0.7936
Error	5	1.73000000	0.34600000		
Corrected Total	13	7.87428571			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BCF Mean
0.780298	79.18314	0.588218	0.742857

ANEXO 6. Análisis de variancia para el objetivo 2 de las características microscópicas en muestra equilibrado y descongelado de semen de alpaca colectado por DCD.

ANVA de espermatozoides vivos en semen equilibrado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.05732386	0.02866193	35.36	0.0005
TRATAMIENTO	3	0.00797306	0.00265769	3.28	0.1005
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00486345	0.00081057	0.11	0.9951
Error	56	0.41645587	0.00743671		
Corrected Total	67	0.48644428			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.143878	16.49204	0.086236	0.522897

ANVA de espermatozoides vivos en semen descongelado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00785861	0.00392930	1.13	0.3840
TRATAMIENTO	3	0.01578237	0.00526079	1.51	0.3050
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.02091208	0.00348535	0.46	0.8379
Error	54	0.41320348	0.00765192		
Corrected Total	65	0.45566436			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.093185	20.36460	0.087475	0.429545

ANVA de motilidad espermática en semen equilibrado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.89723240	0.44861620	297.23	<.0001
TRATAMIENTO	3	0.00602201	0.00200734	1.33	0.3495
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00905590	0.00150932	0.22	0.9691
Error	56	0.38588947	0.00689088		
Corrected Total	67	1.29801228			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MT Mean
0.702707	27.13702	0.083011	0.305897

ANVA de motilidad espermática en semen descongelado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.25036015	0.12518008	80.61	<.0001
TRATAMIENTO	3	0.00657770	0.00219257	1.41	0.3282
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00931731	0.00155288	0.31	0.9278
Error	54	0.26844500	0.00497120		
Corrected Total	65	0.53465145			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MT Mean
0.497907	54.27393	0.070507	0.129909

ANVA de EMP en semen equilibrado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00033172	0.00016586	8.34	0.0185
TRATAMIENTO	3	0.00018540	0.00006180	3.11	0.1102
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00011928	0.00001988	0.62	0.7137
Error	56	0.00179653	0.00003208		
Corrected Total	67	0.00243263			

R-Square Coeff Var Root MSE MP Mean
 0.261486 81.77332 0.005664 0.006926

ANVA de EMP en semen descongelado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00010041	0.00005020	7.60	0.0227
TRATAMIENTO	3	0.00006323	0.00002108	3.19	0.1053
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00003963	0.00000660	0.94	0.4741
Error	54	0.00037927	0.00000702		
Corrected Total	65	0.00058982			

R-Square Coeff Var Root MSE MP Mean
 0.356977 83.29139 0.002650 0.003182

ANVA de EMNP en semen equilibrado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.85423839	0.42711920	274.71	<.0001
TRATAMIENTO	3	0.00752151	0.00250717	1.61	0.2827
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00932891	0.00155482	0.23	0.9641
Error	56	0.37386647	0.00667619		
Corrected Total	67	1.24480806			

R-Square Coeff Var Root MSE MNP Mean
 0.699659 27.38364 0.081708 0.298382

ANVA de EMNP en semen descongelado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.23971332	0.11985666	79.98	<.0001
TRATAMIENTO	3	0.00705132	0.00235044	1.57	0.2920
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00899164	0.00149861	0.31	0.9304
Error	54	0.26326280	0.00487524		
Corrected Total	65	0.51874527			

R-Square Coeff Var Root MSE MNP Mean
 0.492501 55.13653 0.069823 0.126636

ANVA de VCL en semen equilibrado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	161.911193	80.955597	1.88	0.2321
TRATAMIENTO	3	5568.167465	1856.055822	43.13	0.0002
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	258.175690	43.029282	0.60	0.7274
Error	56	4002.164117	71.467216		
Corrected Total	67	9942.240394			

R-Square Coeff Var Root MSE VCL Mean
 0.597459 14.16757 8.453829 59.67029

ANVA de VCL en semen descongelado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	329.293867	164.646933	2.07	0.2074
TRATAMIENTO	3	1871.742739	623.914246	7.84	0.0169
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	477.646301	79.607717	0.87	0.5261
Error	54	4965.696850	91.957349		
Corrected Total	65	7730.806194			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VCL Mean
0.357674	17.30018	9.589439	55.42970

ANVA de VSL en semen equilibrado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	48.2944087	24.1472044	5.96	0.0376
TRATAMIENTO	3	355.2387610	118.4129203	29.22	0.0006
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	24.3165223	4.0527537	0.55	0.7642
Error	56	409.0595867	7.3046355		
Corrected Total	67	830.8023471			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VSL Mean
0.507633	18.12789	2.702709	14.90912

ANVA de VSL en semen descongelado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	25.31233443	12.65616722	6.12	0.0356
TRATAMIENTO	3	86.43026617	28.81008872	13.93	0.0041
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	12.41178283	2.06863047	0.24	0.9606
Error	54	462.1908833	8.5590904		
Corrected Total	65	589.1647455			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VSL Mean
0.215515	21.34053	2.925592	13.70909

ANVA de VAP en semen equilibrado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	226.9654256	113.4827128	28.28	0.0009
TRATAMIENTO	3	732.0075193	244.0025064	60.81	<.0001
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	24.0762636	4.0127106	0.44	0.8495
Error	56	511.627217	9.136200		
Corrected Total	67	1500.405851			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VAP Mean
0.659007	9.148879	3.022615	33.03809

ANVA de VAP en semen descongelado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	279.0607400	139.5303700	8.54	0.0176
TRATAMIENTO	3	116.2998422	38.7666141	2.37	0.1693
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	98.0494626	16.3415771	0.85	0.5382
Error	54	1039.509043	19.250167		
Corrected Total	65	1544.478903			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VAP Mean
0.326952	15.43199	4.387501	28.43121

ANVA de ALH en semen equilibrado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	3.28224740	1.64112370	5.22	0.0487
TRATAMIENTO	3	6.95316557	2.31772186	7.37	0.0195
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	1.88765162	0.31460860	0.63	0.7084
Error	56	28.12798333	0.50228542		
Corrected Total	67	40.09826324			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALH Mean
0.298524	71.89770	0.708721	0.985735

ANVA de ALH en semen descongelado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	3.83184170	1.91592085	18.03	0.0029
TRATAMIENTO	3	4.02521089	1.34173696	12.63	0.0053
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.63751327	0.10625221	0.38	0.8904
Error	54	15.21225000	0.28170833		
Corrected Total	65	23.88528636			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALH Mean
0.363112	93.04195	0.530762	0.570455

ANVA de BCF en semen equilibrado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	16.42878172	8.21439086	2.33	0.1779
TRATAMIENTO	3	12.04596974	4.01532325	1.14	0.4056
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	21.11746044	3.51957674	1.69	0.1397
Error	56	116.4068167	2.0786932		
Corrected Total	67	165.2601059			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BCF Mean
0.295615	77.98296	1.441767	1.848824

ANVA de BCF en semen descongelado de alpaca colectado por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	3.60643436	1.80321718	3.58	0.0948
TRATAMIENTO	3	18.53104895	6.17701632	12.26	0.0057
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	3.02216857	0.50369476	0.26	0.9550
Error	54	106.5520833	1.9731867		
Corrected Total	65	131.3605455			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BCF Mean
0.188858	114.2879	1.404702	1.229091

ANVA de la funcionalidad de membrana espermática en semen descongelado de alpaca colectada por DCD.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.08757089	0.04378544	11.51	0.0088
TRATAMIENTO	3	0.01261919	0.00420640	1.11	0.4173
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.02283156	0.00380526	0.30	0.9323
Error	24	0.30744467	0.01281019		
Corrected Total	35	0.43046631			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.285787	30.80950	0.113182	0.367361

ANEXO 7. Análisis de variancia para el objetivo 2 de las características microscópicas en muestra equilibrado y descongelado de semen de alpaca colectado por EE.

ANVA de espermatozoides vivos en semen equilibrado de alpacas colectada por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.16378563	0.08189281	4.58	0.0620
TRATAMIENTO	3	0.01764463	0.00588154	0.33	0.8052
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.10731395	0.01788566	1.74	0.1329
Error	47	0.48354315	0.01028815		
Corrected Total	58	0.75931441			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.363185	17.15023	0.101431	0.591424

ANVA de espermatozoides vivos en semen descongelado de alpacas colectada por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.17410023	0.08705012	10.38	0.0113
TRATAMIENTO	3	0.01074196	0.00358065	0.43	0.7410
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.05031353	0.00838559	0.98	0.4515
Error	47	0.40350360	0.00858518		
Corrected Total	58	0.63707485			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.366631	18.75440	0.092656	0.494051

ANVA de motilidad espermática en semen equilibrado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.07293430	0.03646715	3.36	0.1049
TRATAMIENTO	3	0.21623333	0.07207778	6.64	0.0246
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.06511157	0.01085193	0.38	0.8862
Error	48	1.35941320	0.02832111		
Corrected Total	59	1.71369240			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MT Mean
0.206734	47.32530	0.168289	0.355600

ANVA de motilidad espermática en semen descongelado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00559463	0.00279732	35.90	0.0005
TRATAMIENTO	3	0.00992325	0.00330775	42.45	0.0002
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00046750	0.00007792	0.03	0.9999
Error	48	0.13425960	0.00279708		
Corrected Total	59	0.15024498			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MT Mean
0.106395	70.97389	0.052887	0.074517

ANVA de EMP en semen equilibrado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00053923	0.00026962	1.93	0.2248
TRATAMIENTO	3	0.00068833	0.00022944	1.65	0.2759
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00083637	0.00013939	0.17	0.9837
Error	48	0.03939880	0.00082081		
Corrected Total	59	0.04146273			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MP Mean
0.049778	109.2113	0.028650	0.026233

ANVA de EMP en semen descongelado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00007023	0.00003512	4.90	0.0547
TRATAMIENTO	3	0.00007458	0.00002486	3.47	0.0909
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00004297	0.00000716	0.45	0.8441
Error	48	0.00077040	0.00001605		
Corrected Total	59	0.00095818			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MP Mean
0.195979	147.4691	0.004006	0.002717

ANVA de EMNP en semen equilibrado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.07017790	0.03508895	3.91	0.0818
TRATAMIENTO	3	0.19487160	0.06495720	7.24	0.0203
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.05381810	0.00896968	0.40	0.8723
Error	48	1.06376680	0.02216181		
Corrected Total	59	1.38263440			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MNP Mean
0.230623	45.60920	0.148868	0.326400

ANVA de EMNP en semen descongelado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00579623	0.00289812	43.97	0.0003
TRATAMIENTO	3	0.00853960	0.00284653	43.18	0.0002
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.00039550	0.00006592	0.03	0.9999
Error	48	0.12255240	0.00255318		
Corrected Total	59	0.13728373			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MNP Mean
0.107306	70.43999	0.050529	0.071733

ANVA de VCL en semen equilibrado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	1134.175530	567.087765	9.72	0.0131
TRATAMIENTO	3	548.340093	182.780031	3.13	0.1087
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	349.976417	58.329403	0.34	0.9134
Error	48	8286.49472	172.63531		
Corrected Total	59	10318.98676			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VCL Mean
0.196966	25.29567	13.13908	51.94200

ANVA de VCL en semen descongelado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	2725.384043	1362.692022	20.06	0.0022
TRATAMIENTO	3	4138.099640	1379.366547	20.31	0.0015
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	407.576810	67.929468	0.24	0.9600
Error	48	13447.92864	280.16518		
Corrected Total	59	20718.98913			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VCL Mean
0.350937	49.49670	16.73814	33.81667

ANVA de VSL en semen equilibrado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	2.75776000	1.37888000	0.44	0.6651
TRATAMIENTO	3	28.36500000	9.45500000	3.00	0.1172
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	18.93568000	3.15594667	0.20	0.9737
Error	48	740.0131200	15.4169400		
Corrected Total	59	790.0715600			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VSL Mean
0.063359	34.17863	3.926441	11.48800

ANVA de VSL en semen descongelado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	179.5305733	89.7652867	10.85	0.0102
TRATAMIENTO	3	218.0379533	72.6793178	8.78	0.0130
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	49.6592667	8.2765444	0.44	0.8494
Error	48	906.079880	18.876664		
Corrected Total	59	1353.307673			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VSL Mean
0.330470	55.01281	4.344728	7.897667

ANVA de VAP en semen equilibrado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	42.8830033	21.4415017	5.27	0.0477
TRATAMIENTO	3	155.0420000	51.6806667	12.71	0.0052
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	24.3999700	4.0666617	0.12	0.9934
Error	48	1618.829160	33.725608		
Corrected Total	59	1841.154133			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VAP Mean
0.120753	26.83217	5.807375	21.64333

ANVA de VAP en semen descongelado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	298.0864133	149.0432067	18.97	0.0025
TRATAMIENTO	3	819.9998200	273.3332733	34.79	0.0003
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	47.1404400	7.8567400	0.15	0.9885
Error	48	2535.962000	52.832542		
Corrected Total	59	3701.188673			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VAP Mean
0.314825	49.39809	7.268600	14.71433

ANVA de ALH en semen equilibrado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	2.15840333	1.07920167	4.51	0.0639
TRATAMIENTO	3	3.63137333	1.21045778	5.05	0.0442
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	1.43715667	0.23952611	0.21	0.9719
Error	48	54.67744000	1.13911333		
Corrected Total	59	61.90437333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALH Mean
0.116744	75.83793	1.067293	1.407333

ANVA de ALH en semen descongelado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	1.28584333	0.64292167	6.29	0.0337
TRATAMIENTO	3	1.21304667	0.40434889	3.95	0.0717
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.61374333	0.10229056	0.49	0.8120
Error	48	10.00316000	0.20839917		
Corrected Total	59	13.11579333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALH Mean
0.237319	152.0003	0.456508	0.300333

ANVA de BCF en semen equilibrado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	6.99634333	3.49817167	1.39	0.3188
TRATAMIENTO	3	15.07822667	5.02607556	2.00	0.2157
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	15.08500333	2.51416722	0.34	0.9116
Error	48	353.8667600	7.3722242		
Corrected Total	59	391.0263333			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BCF Mean
0.095031	79.54641	2.715184	3.413333

ANVA de BCF en semen descongelado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	11.42652333	5.71326167	9.27	0.0146
TRATAMIENTO	3	5.75149333	1.91716444	3.11	0.1101
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	3.69935667	0.61655944	0.33	0.9154
Error	48	88.5080000	1.8439167		
Corrected Total	59	109.3853733			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BCF Mean
0.190861	172.4694	1.357909	0.787333

ANVA de funcionalidad de membrana espermática en semen descongelado de alpaca colectado por EE.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	2	0.00383272	0.00191636	0.54	0.6074
TRATAMIENTO	3	0.01358822	0.00452941	1.28	0.3627
BLOQUE*TRATAMIENTO	6	0.02119861	0.00353310	0.65	0.6867
Error	24	0.12963467	0.00540144		
Corrected Total	35	0.16825422			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VR Mean
0.229531	27.75706	0.073495	0.264778