

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



**“ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO EN SEMEN DE LLAMAS
(*lama glama*) DURANTE EL PROCESO DE CRIOPRESERVACIÓN”**

Tesis presentada por el Bachiller en Ciencias Agrarias
FREDY EFRAIN HUAYLLANI CONZA, para optar al título
Profesional de INGENIERO ZOOTECNISTA.

ASESORES:

Dr. LUCIO ENRIQUE AMPUERO CASQUINO

MSc. HERNÁN CARLOS CUCHO DOLMOS

TESIS FINANCIADA POR EL PROGRAMA YACHAYNINCHIS WIÑARINANPAQ - UNSAAC

CUSCO-PERÚ

2022

DEDICATORIA

A Dios por su sabiduría, guiarme a lo largo de mi carrera, ser mi fortaleza en momentos difíciles y brindarme una vida llena de experiencias, aprendizajes y mucha felicidad.

A mis queridos padres Eliodoro Edmundo y Yuvana por la vida que me dieron, por su amor y su apoyo incondicional, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí, son los mejores padres.

A mi amado hermano Ronald Gustavo por apoyarme siempre, su comprensión, sus buenos consejos y motivarme a seguir adelante.

A mi familia Huayllani Quispe y Conza Huillca, por darme consejos y motivarme a conseguir todos mis sueños a base de dedicación y entrega en todo lo que realice.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, y un enorme 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 Dr. Lucio Enrique Ampuero Casquino por su asesoramiento y orientación en el proceso experimental y ejecución del presente trabajo de investigación.
- A la Mgt. Aydee Meza Chatata por brindarme su apoyo, sus consejos, enseñanzas durante la ejecución y culminación del presente trabajo de investigación.
- A Nery Tarifa por los momentos compartidos y apoyo incondicional.
- A todo el personal técnico y administrativo que labora en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) - La Raya; en especial al Sr. Nicolas Lima quien me brindo todo su apoyo.
- A mis compañeros y amigos Fredy Salas, Rosalio Kuaquira, Abelardo Maza por su apoyo y por todos los lindos momentos que compartimos durante la ejecución del presente trabajo de investigación.
- Deseo expresar mi agradecimiento a Uriel David Cutire, por su apoyo en la ejecución de este trabajo de investigación.
- A mis grades amigos Juan Samuel, Nerio Omar, Waldir Jimmy, Jhon Rossel y Frank quienes me acompañaron y alegraron mi vida universitaria.
- Y por último a todos mis amigos del código 2014 de la Escuela Profesional de Zootecnia, que fueron mis compañeros de clase, con quienes compartí gratos momentos en nuestra etapa estudiantil.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS.....	x
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
GLOSARIO	xii
RESUMEN	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN	3
1.1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	4
1.1.1. Objetivo general	4
1.1.2. Objetivos específicos	4
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	5
CAPÍTULO II.....	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA LLAMA.....	6
2.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE LLAMA	7
2.3. COLECCIÓN DE SEMEN	8
2.3.1. Electroeyaculación	8
2.4. EVALUACIÓN DE SEMEN	9
2.4.1. Características macroscópicas	9
2.4.2. Características microscópicas	11
2.5. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO (IFAE)	21
2.5.1. Causas de la fragmentación del ADN espermático	24
2.5.2. Métodos de evaluación del daño en el ADN espermático.....	25
2.6. TEST DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD).....	26
2.6.1. Fundamento del test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD)...	27

2.6.2. Patrones de clasificación de los espermatozoides con daño en el ADN	28
2.7. PROCEDIMIENTO DE CONGELACIÓN DE SEMEN DE LLAMA.....	29
2.7.1 Dilución	29
2.7.2 Enfriamiento - refrigerado.....	29
2.7.3 Adición de crioprotector y envasado	29
2.4.4 Equilibrado, congelación y almacenamiento	30
2.7.5 Descongelación	30
2.8. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN.....	31
2.8.1 Dilutores de semen.....	31
2.8.2 Crioprotectores de semen.....	32
CAPÍTULO III.....	35
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1. LUGAR DE ESTUDIO	35
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS.....	36
3.2.1. De los animales	36
3.2.2. Materiales y equipos para la colección de semen.....	36
3.2.3. Equipos y materiales de laboratorio.....	37
3.2.4. Equipo y material de escritorio.....	40
3.3. INSTALACIONES	40
3.4. METODOLOGÍA.....	41
3.4.1. Selección de animales	41
3.4.2. Colección de semen.....	41
3.5. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL SEMEN DE LLAMA	44
3.5.1. Volumen.....	44
3.5.2. Color	44
3.5.3. Filancia	44
3.5.4. pH	45
3.6. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN DE LLAMA	45
3.6.1. Motilidad y concentración espermática.....	45
3.6.2. Vitalidad espermática	46
3.6.3. Morfometría espermática	47
3.6.4. Integridad acrosomal.....	48
3.6.5. Funcionalidad de la membrana espermática.....	49

3.7. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO (IFAE)	50
3.7.1. Protocolo de fragmentación del ADN espermático.....	51
3.7.2. Control positivo para la técnica SDC	54
3.7.3. Patrones de evaluación de la fragmentación del ADN espermático en llamas 54	
3.7.4. De la comparación del porcentaje de índice de fragmentación de ADN espermático entre semen fresco, refrigerado y descongelado.	57
3.8. PROCESAMIENTO DE SEMEN	57
3.8.1. Degelificación	57
3.8.2. Dilución	58
3.8.3. Refrigerado	59
3.8.4. Adición del crioprotector	59
3.8.5. Equilibrado	59
3.8.6. Empajillado	60
3.8.7. Congelación y almacenado	60
3.8.8. Descongelado	61
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
CAPÍTULO IV	66
RESULTADOS Y DISCUSIONES	66
4.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL SEMEN	66
4.1.1. Características Macroscópicas	66
4.1.2. Características microscópicas	68
4.2. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO	79
4.2.1. Áreas de núcleo y halo del índice de fragmentación del ADN espermático (IFAE) 79	
4.2.2. Determinación del índice de fragmentación del ADN espermático en llamas. 81	
4.2.3. Comparación de índice de fragmentación de ADN espermático entre los tipos de semen de llama	83
4.3. CORRELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO, VITALIDAD, INTEGRIDAD ACROSOMAL Y FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA.	83
CAPITULO V	86
CONCLUSIONES	86
CAPÍTULO VI	87

RECOMENDACIONES	87
CAPÍTULO VII.....	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXOS.....	104

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Color espermático de llama colectado por electroeyaculación (EE).	9
Cuadro 2. Volumen y pH de semen de llama colectado por electroeyaculación (EE).....	10
Cuadro 3. Motilidad espermática del semen de llama colectado por EE.	12
Cuadro 4. Motilidad de espermatozoides móviles progresivos (EMP) y no progresivos (EMNP) de semen de llama y alpaca colectado por EE	13
Cuadro 5. Parámetros de velocidad de espermatozoides de semen de llama fresco colectado por electroeyaculación.	14
Cuadro 6. Parámetros de velocidad de espermatozoides de semen de llama refrigerado y descongelado, colectado por electroeyaculación.	14
Cuadro 7. Concentración espermática del semen fresco de llama colectada por electroeyaculación (EE).....	15
Cuadro 8. Vitalidad espermática del semen de llama colectada por electroeyaculación (EE)..	16
Cuadro 9. Parámetros de morfometría espermática de llamas según el ISAS	18
Cuadro 10. Parámetros de morfometría de la región de la cabeza y pieza intermedia del espermatozoide de llamas colectado por electroeyaculación.	18
Cuadro 11. Funcionalidad de la membrana espermática del semen de llama colectada por electroeyaculación (EE).....	19
Cuadro 12. Porcentaje de Integridad de la membrana acrosomal de semen de llama colectada por el método de EE, Post copula y Desviación de conducto deferente en alpaca.....	21
Cuadro 13. Parámetros de área de núcleo y halo en espermatozoides en semen de alpaca y llama fresco, refrigerado y descongelado colectadas por EE.....	23
Cuadro 14. Parámetros de índice fragmentación de ADN espermático en espermatozoides fragmentados y no fragmentados en alpacas colectadas por electroeyaculación.....	23
Cuadro 15. Porcentaje de IFAE en semen de llama colectada por EE.....	24
Cuadro 16. Porcentaje de espermatozoides con presencia de halo y sin halo expuestos a daños exógenos (T°, NaOH y rayos U.V).	25

Cuadro 17. <i>Patrones de dispersión de cromatina espermática (SCD) (grandes, medianos, pequeños y sin halos) observados en los espermatozoides de semen llama.</i>	28
Cuadro 18. Criterio de evaluación del porcentaje del índice fragmentación de ADN espermático de semen de llama.....	57
Cuadro 19. Porcentaje de color observado en semen de llama obtenido por EE, N=20	66
Cuadro 20. Volumen, filancia y pH de semen de llama colectado por el método de EE, n=20.	67
Cuadro 21. Motilidad espermática progresiva (EMP) y no progresiva (EMNP) en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas.	68
Cuadro 22. Motilidad espermática (EMP + EMNP) en semen fresco, refrigerado descongelado de llamas.....	69
Cuadro 23. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.	71
Cuadro 24. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.	71
Cuadro 25. Concentración espermática (unidad) en semen fresco de llamas colectadas por EE.	72
Cuadro 26. Vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.....	72
Cuadro 27. Morfometría espermática de las variables de cabeza en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.	74
Cuadro 28. Morfometría espermática de las variables de la pieza intermedia en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.....	75
Cuadro 29. Reacción total de la funcionalidad de membrana espermática en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por electroeyaculación.	77
Cuadro 30. Integridad Acrosomal de los espermatozoides de llama colectadas por electroeyaculación.	78
Cuadro 31. Parámetros generales de área de núcleo y halo en semen de llama fresco, refrigerado y descongelado colectadas por electroeyaculación (n = 500 espermatozoides por estado).	79

Cuadro 32. Parámetros de área de núcleo y halo en espermatozoides no fragmentados en semen de llama fresco, refrigerado y descongelado colectadas por EE (n=número de espermatozoides).	80
Cuadro 33. Parámetros de área de núcleo y halo en espermatozoides fragmentados en semen de llama fresco, refrigerado y descongelado colectadas por EE (n=número de espermatozoides).	80
Cuadro 34. Patrones de dispersión de cromatina espermática (SCD) (sin halos, pequeños, medianos y grandes) observados en los espermatozoides de semen llama.....	81
Cuadro 35. Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de llama.....	82
Cuadro 36. Índice de fragmentación de ADN espermático en llama.....	83
Cuadro 37. Correlación entre el porcentaje de espermatozoides fragmentados y porcentaje de vitalidad en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectado por EE.....	84
Cuadro 38. Correlación entre el porcentaje de espermatozoides fragmentados y porcentaje de integridad en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectado por EE.	84
Cuadro 39. Correlación entre el porcentaje de espermatozoides fragmentados y porcentaje de funcionalidad en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectado por EE.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma del protocolo de colección de semen mediante electroeyacuación en llamas	43
Figura 2. Flujograma de la fragmentación de ADN espermático en semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por EE.....	56
Figura 3. Flujograma resumen de la evaluación del semen de llama.	62

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1. Instalaciones del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS – La Raya	35
Foto 2. Equipos y materiales de colección de semen.....	36
Foto 3. Microscopio de contraste de fases, fluorescencia, platina térmica, videocámara y computadora ejecutando el programa ISAS v.1.2.	38
Foto 4. Kit Sperm-Halomax® (Halotech SL, Madrid, España)	40
Foto 5. Colección de semen por el método de electroeyacuación	42
Foto 6. Evaluación del color y volumen de semen colectado por EE, se consideraron tonalidades de blanco: lechoso (I), lechoso claro (II) y cristalino (III).....	44
Foto 7. Filancia de muestra de semen de llama colectada por EE.....	45
Foto 8. Frotis de tinción de eosina y nigrosina para la prueba de vitalidad	46
Foto 9. Kit de tinción Hemacolor® y espermatozoides capturados en el módulo de morfometría del ISAS.	47
Foto 10. Evaluación de la integridad acrosomal en semen de llamas, Espermatozoides con presencia del capuchón acrosomal (I) y Espermatozoides con ausencia del capuchón acrosomal (II).	49
Foto 11. Evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática en semen de llamas, espermatozoides con reacción fuerte (I), espermatozoides con reacción moderada (II) y espermatozoides sin reacción (III).....	50

Foto 12. Evaluación del índice de fragmentación del ADN espermático observado en el microscopio BA310 de Motic.	51
Foto 13. Inmersión de láminas de agarosa en solución de lisis (Halomax), agente reductor (Halomax) y etanol al 70° y 90°	53
Foto 14. Inmersión de láminas de agarosa en la tinción Diff Quik y Wright.	54
Foto 15. Patrones de fragmentación de ADN del espermatozoide de llamas sometidos a la técnica SCD. Espermatozoides con: (I) sin Halo, (II) Halo pequeño, (III) Halo mediano y (IV) Halo grande.	55
Foto 16. Empajillado de la muestra de semen de llamas	60
Foto 17. Congelación tipo horizontal de pajillas de semen en vapores de nitrógeno líquido y tanque de nitrógeno para almacenamiento.	61

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Reactivos para la preparación de dilutor base Tris.....	104
ANEXO 2. Análisis de variancia de las características microscópicas en muestra de semen fresco, refrigerado y descongelado de llama colectadas por EE.	105

GLOSARIO

ALH:	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide.
BCF:	Frecuencia de batida de la cabeza.
CASA:	Computer Assisted Sperm Analysis.
DBD-FISH:	DNA Breakage Detection - Fluorescence In Situ Hybridization.
DMSO:	Dimetil Sulfoxido.
EHG:	Espermatozoide con Halo Grande.
EHM:	Espermatozoide con Halo Mediano.
EHP:	Espermatozoide con Halo Pequeño.
ESH:	Espermatozoide sin Halo.
ESR:	Espermatozoides sin Reacción.
H-TALP-BSA	Albúmina bovina sérica
HMP:	High Melting Point.
HOS:	Hipoosmotic swelling test.
Hz:	Hertz.
IFAE:	Índice de Fragmentación del ADN Espermático.
ISNT:	In Situ Nick Translation.
LIN:	Índice de Linealidad.
LMP:	Low Melting Point.
ME:	Mercaptoetanol.
mOsm:	Miliosmol.
NaOH:	Hidróxido de sodio.
Sen:	Seno de un ángulo α .
SCD:	Dispersión de la Cromatina Espermática.
SCSA:	Sperm Chromatin Structure Assay.
SRT:	Índice de Rectitud.
TUNEL:	Terminal dUtp Nick - End Labelling.
VCL:	Velocidad Curvilínea.
VSL:	Velocidad Rectilínea.
VAP:	Velocidad Media.
WOB:	Índice de Oscilación.

RESUMEN

El estudio “Índice de fragmentación del ADN espermático en semen de llamas (*Lama glama*) durante el proceso de criopreservación” se realizó de diciembre 2019 a septiembre 2020, 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 el índice de fragmentación del ADN espermático de semen llamas (*Lama glama*) durante el proceso de criopreservación. Se realizaron 4 colectas por cada uno de las 5 llamas macho por el método de electroeyaculación. Las muestras obtenidas fueron degelificadas y en este momento se realizó la evaluación del semen en fresco, luego las muestras se diluyeron con dilutor base Tris y refrigeradas por 2.5 horas hasta alcanzar la temperatura de 5°C, momento en que se evaluó el semen refrigerado. La última evaluación seminal se realizó al descongelado después de 7 días de congelar la muestra. Para motilidad y vitalidad espermática, no se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el semen fresco y refrigerado, pero si ($p < 0.01$) con la etapa de descongelado; con respecto a la evaluación de la morfometría espermática, no se observó diferencias significativas ($p < 0.05$) para las variables ancho, área, elipticidad, rugosidad y elongación de la cabeza y ancho de la pieza intermedia. No se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) en el análisis de la funcionalidad de la membrana espermática e integridad acrosomal en muestras de semen fresco, refrigerado y descongelado. No se halló diferencias significativas ($p < 0.05$) en el análisis del índice de fragmentación de ADN espermático (IFAE) en semen de llama en fresco, refrigerado y descongelado. Tampoco se ha identificado correlación entre el porcentaje de espermatozoides fragmentados con el porcentaje de vitalidad, integridad acrosomal y funcionalidad de la membrana espermática ($p < 0.05$). Se concluye que el proceso de refrigeración y congelación utilizado en este trabajo de investigación no afectó el índice de fragmentación de ADN espermático (IFAE) de llama.

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, la crianza de los camélidos es una actividad de gran importancia e impactante en el desarrollo socio económico de la población altoandina, no solo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales donde habitan, sino por su utilización como una fuente alimenticia que brinda un alto valor proteico de origen animal y como un recurso para la producción de fibra de alta calidad (Huanca *et al.*, 2007); por lo que se viene investigando la utilización de biotecnologías reproductivas para la difusión de los genes de los mejores animales.

Se ha utilizado la refrigeración y criopreservación en semen 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 motilidad (Giuliano *et al.*, 2006). Características estándar del semen, como volumen del eyaculado, concentración, función e integridad de la membrana, motilidad y la morfología del espermatozoide se utilizan para evaluar la calidad seminal. Además, la integridad de la cromatina espermática ahora se considera un factor importante en la fertilidad del macho y en el desarrollo embrionario temprano (Zini *et al.*, 2001).

Sin embargo, los estudios sobre la integridad del ADN no son sencillos y, por lo tanto, la adición de estas pruebas a la evaluación rutinaria de los espermatozoides no está todavía muy extendida y cuando se asiste a técnicas de reproducción (ART) como la fertilización in vitro (FIV) o la inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI), la evaluación de la integridad de la cromatina es aún más importante y la presencia de defectos en el material genético, como anomalías en la condensación de cromatina, la integridad del ADN o la presencia de anomalías cromosómicas, como las aneuploidías, están estrechamente asociadas a la infertilidad (Aravindan *et al.*, 1997; Tsarev *et al.*, 2009).

En los camélidos sudamericanos, en este caso la llama, se desconoce si el proceso de criopreservación afecta al índice de fragmentación de ADN espermático (IFAE) lo cual es motivo

de la presente investigación. Esperando que con los resultados esta variable de evaluación se incorpore dentro de las pruebas de rutina al analizar el semen de llama.

CAPÍTULO I

PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN

DESCRIPCION DEL PROBLEMA

La demanda de subproductos de llama como la fibra y carne con bajo porcentaje de colesterol ha promovido la obtención de animales genéticamente superiores por lo que la implementación de biotecnologías reproductivas es indispensable para acelerar el progreso genético en esta especie. Por lo tanto, es necesario estudiar las características del semen y su manejo para poder implementar planes de reproducción asistida tales 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).

La fragmentación de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN) transportado por los espermatozoides y su relación con la fertilidad ha despertado un gran interés en su estudio en humanos y otras especies, debido a que es un nuevo parámetro que se considera un indicador importante de la calidad seminal y la fertilidad, por consiguiente representa ser parte de la evaluación del acervo genético del genoma parental (Huanca, 2015).

La fragmentación del ADN espermático tiene un interés evidente dado que la transferencia de la molécula del ADN integra e intacta del espermatozoide al ovulo, es esencial para conseguir la fertilización y desarrollo embrionario normal y al utilizar técnicas de reproducción asistida se eliminan las barreras de selección natural que ocurre de forma normal desde la eyaculación hasta que el espermatozoide más apto alcanza y fecunda el ovulo, por lo que se ha propuesto que el daño sobre la molécula de ADN del espermatozoide puede afectar la salud del embrión o la del feto, de ahí el interés en desarrollar técnicas analíticas encaminadas a medir la fragmentación del ADN espermático, e incluirlas en el estudio del factor masculino. (Ortega, 2012)

Para los cual se planteó las siguientes preguntas:

Pregunta general

¿Cuál es el índice de fragmentación del ADN espermático de semen llamas (*Lama glama*) durante el proceso de criopreservación de semen colectado por electroeyaculación?

Preguntas específicas

- ¿Cuáles son las características macroscópicas y microscópicas del semen fresco, refrigerado y criopreservado de la llama colectado por electroeyaculación?
- ¿Cuál es el índice de fragmentación del ADN espermático en semen fresco, refrigerado y criopreservado colectado por electroeyaculación?
- ¿Cuáles son las correlaciones que existen entre el índice de fragmentación de ADN espermático, vitalidad, integridad acrosomal y funcionalidad de la membrana espermática?

1.1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

1.1.1. Objetivo general

Determinar el índice de fragmentación del ADN espermático de semen de llamas (*Lama glama*) durante el proceso de criopreservación colectado por electroeyaculación.

1.1.2. Objetivos específicos

1. Determinar las características macroscópicas y microscópicas del semen fresco, refrigerado y criopreservado de llama colectado por electroeyaculación.
2. Determinar el índice de fragmentación del ADN espermático en semen fresco, refrigerado y criopreservado de llama colectado por electroeyaculación.
3. Determinar las correlaciones que existen entre el índice de fragmentación de ADN espermático, vitalidad, integridad acrosomal y funcionalidad de la membrana espermática

1.2. JUSTIFICACIÓN

La información sobre la reproducción de llamas (especialmente machos) varía ampliamente, tales como: métodos de colección, evaluación de las características macroscópicas, microscópicas (volumen, motilidad, concentración, morfología, vitalidad, fragmentación) y criopreservación del semen; esto se debe a la falta de un método confiable y reproducible para coleccionar semen y evaluar las propiedades microscópicas del semen de llama mediante métodos subjetivos (Huanca, 2015).

De modo que, es necesario utilizar equipos y sistemas informáticos modernos para el análisis de espermatozoides así como el ISAS® (Integrated Sperm Analysis System) para estandarizar las principales características de la llama, incluyendo nuevos parámetros seminales, como la integridad del ADN espermático (índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides); de manera que la fragmentación del ADN espermático es un parámetro nuevo y se considera un indicador importante de la calidad y fertilidad del semen, y el espermatozoides es la célula responsable de transportar el material genético del macho al óvulo y la calidad de la información genética contenida en la molécula de ADN que transfiere el espermatozoides es muy importante para el desarrollo normal del embrión (Rodríguez, 2013).

Al tener muy poca información con respecto al estudio de la fragmentación del ADN espermático de llama (*Lama glama*) durante el proceso de criopreservación", este trabajo de investigación nos brindara una mayor información con respecto a las características reproductivas de llama y de esta manera establecer parámetros aún más precisos de estas características seminales, principalmente del IFAE proveniente del semen fresco, refrigerado y criopreservado de llama y esto posiblemente nos ayude a explicar los bajos índices de fertilidad así como también diagnosticar una posible infertilidad en los machos.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA LLAMA

Los Camélidos Sudamericanos tienen características reproductivas anatómicas, conductuales y fisiológicas únicas que se diferencian de otros animales domésticos y las extrapolaciones de otros animales domésticos no son relevantes para los camélidos (Argañaraz *et al.*, 2015). Generalmente los CSA se clasifican como reproductores no estacionales, pero esta clasificación aún está en debate; además que la estacionalidad parece estar relacionada con las limitaciones ambientales y los sistemas de gestión y en las duras condiciones de los altos Andes, los camélidos suelen mostrar actividad sexual durante los meses cálidos, mientras que en hábitats más suaves, las llamas pueden ser sexualmente activas durante todo el año (Themes, 2017). No se ha determinado si este fenómeno está dirigido por el clima o por su estado nutricional.

Las llamas tienen un intervalo generacional largo; los machos alcanzan la pubertad entre aproximadamente uno y tres años de edad, mientras que las hembras pueden ser preñadas al año de edad, si son lo suficientemente maduras físicamente, por otro lado, la gestación es larga: 345 días en promedio, el apareamiento se realiza en posición reclinada y su duración varía entre cinco y 50 minutos, los machos durante la cópula depositan el semen directamente en el útero, produciendo una eyaculación de bajo volumen, baja concentración de espermatozoides y alta viscosidad (Kershaw-Young y Maxwell, 2012).

Debido a las características reproductivas únicas de los Camélidos sudamericanos, las tecnologías en la reproducción asistida (TRA) no están tan desarrolladas en las llamas como en otros animales domésticos, aunque la aplicación de algunas tecnologías en las llamas hembras se ha incrementado en los últimos años (Bravo, 1994). Los informes andrológicos obtenidos en

llamas son raros, una razón a la que podría deberse es a la dificultad de recolectar, manipular y evaluar muestras de semen (Morton *et al.*, 2008; Bravo, 1994).

2.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE LLAMA

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).

Evaluar las características del semen en CSA es problemático por varias razones: Las peculiaridades de la cópula y la eyaculación en estas especies, la alta viscosidad del semen y la dificultad de obtener eyaculados consecutivos de los mismos individuos, además el plasma seminal es muy viscoso y se distribuye por todo el eyaculado, en lugar de ser una fracción de gel distinta o un tapón de gel, esta viscosidad impide la evaluación del semen ya que atrapa a los espermatozoides, provocando que se muevan de forma oscilatoria, con una motilidad progresiva limitada (Garnica *et al.*, 1993). Además esta característica seminal dificulta el uso de tintes para evaluar algunas características microscópicas y la mezcla homogénea con diluyente, limitando el contacto con los agentes crioprotectores durante la criopreservación (Kershaw-Young y Maxwell, 2012).

Por otro lado existen otros y varios factores que afectan las características del semen, como la duración de la cópula, la variación individual de los machos (Tibary y Vaughan, 2006), la frecuencia y temporada de colección de semen (Ferré, 1996), la nutrición (Bravo, 1994) y el método de colección del semen (Morton *et al.*, 2008, Alarcón *et al.*, 2012).

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 óptima, 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 (Bravo *et al.*, 2013), sin embargo, este método de colección fue reintroducido y adaptado por Director *et al.*, (2007) para la colección de semen en llamas.

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).

2.4. EVALUACIÓN DE SEMEN

2.4.1. Características macroscópicas

a. Color

El color del eyaculado varía según la concentración de los espermatozoides, desde blanco lechoso al blanco cristalino (Cuadro 1) y el grado de contaminación por otros líquidos, el color también puede cambiar por la presencia de elementos anormales (Sumar y Leyva, 1981). El color blanco lechoso y sus tonalidades provienen de la secreción de glándulas anexas, mientras que las tonalidades indica la presencia de una alta concentración de espermatozoides en la eyaculación (Paricahua, 2001).

Cuadro 1. Color espermático de llama colectado por electroeyaculación (EE).

Color predominante	Autor
56.3 % de Cristalino brillante	Gallegos (2019)
80% de blanco cristalino	Ccoiso (2019)
73.4% de blanco lechoso	Rodriguez (2013)
100 % de blanco lechoso	Valle (2013)

Fuentes: Indicadas

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 esperma son el 15% restantes (Garnica *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 1997).

En llamas, 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, 2012).

Cuadro 2. Volumen y pH de semen de llama colectado por electroeyaculación (EE)

Volumen (ml)	pH	Autor
Prom ± DS	Prom ± DS	
3.63 ± 1.64	7.25 ± 0.48	Gallegos <i>et al.</i> , (2021)
3.8 ± 0.8	7.0 ± 0.1	Ccoiso <i>et al.</i> , (2020)
3.9 ± 2.7		Fumuso <i>et al.</i> , (2018)
1.6 ± 0.69	-	Rodriguez (2013)
0.25	7.41	Valle (2013)
2.8 ± 1.6	-	Carretero (2012)
3.19 ± 1.8	-	Casareto <i>et al.</i> , (2011)
3.6 ± 1.3	-	Carretero <i>et al.</i> , (2009)
1.3 ± 4.3	-	Giuliano <i>et al.</i> , (2008)

Fuentes: Indicadas

c. pH

En llama, los valores de pH proporcionados por diferentes autores son muy cercanos a los neutros y tienden a ser ligeramente alcalinos (Cuadro 2). El pH del semen contaminado con orina aumenta, especialmente después de la electroeyaculación, se puede usar un papel de prueba para determinar si la orina está contaminada (Sumar, 2002). El pH del semen de llama está entre 7.2 y 8.6 (Hanzen *et al.*, 2014).

d. Filancia

El semen de los camélidos tiene alta viscosidad y baja concentración de espermatozoides. Esta viscosidad presente en el semen es el mayor obstáculo para la criopreservación del semen y otras investigaciones sobre tecnología de reproducción asistida (Kershaw-Young y Maxwell, 2012b). Por otro lado, los filamentos se definen como capacidad de formación de hilo, por lo que sus propiedades reológicas son diferentes a la viscosidad (Giuliano,

2012). Debido a la alta viscosidad del plasma seminal, el movimiento de los espermatozoides es muy lento (Sumar y Leyva, 1981). En la colección de semen de llama por el método de electroeyaculación (Ccoiso, 2019) encontró 3.63 ± 0.93 cm de filancia, mientras que (Gallegos, 2019) reportó 3.7 ± 0.64 cm.

2.4.2. Características microscópicas

La evaluación microscópica es muy importante porque nos permite determinar la verdadera calidad del semen, la cual es necesaria para la implementación de planes de manejo reproductivo. Los métodos tradicionales para estimar la calidad de la eyaculación de diferentes especies se basan principalmente en la evaluación de la movilidad individual, la morfología del espermatozoide y el recuento total de espermatozoides (Giuliano, 2012).

a. Motilidad Espermática

La movilidad de los espermatozoides es un factor importante para apreciar la calidad de los espermatozoides y observar su nivel de energía (Sumar y Leyva, 1981). El porcentaje de espermatozoides móviles se considera un indicador de la viabilidad celular y un método indirecto para evaluar la actividad metabólica (Juyena, 2011).

En CSA, debido a la alta viscosidad del plasma seminal, es imposible observar un "movimiento de masa" (no hay remolinos), y el movimiento progresivo individual es muy lento en comparación con el espermatozoide del ovino y bovino (Sumar, 2002). Bustinza (2001) recomienda la criopreservación del semen de llama utilizando solo eyaculado con motilidad igual o superior al 60%.

Para semen de llamas obtenido por electroeyaculación, 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 ($p < 0.05$) 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 ($p < 0.05$) y para semen de alpaca colecta por el mismo método de colecta

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% y 34.10% de motilidad en semen descongelado.

Cuadro 3. Motilidad espermática del semen de llama colectado por EE.

Motilidad % Prom \pm DS	Estado de la muestra	Autor
47.2 \pm 12.6	Fresco	Fumuso <i>et al.</i> , (2021)
44.9 \pm 19.1	Fresco	Gallegos <i>et al.</i> , (2021)
63.36 \pm 15.53	Fresco	Ccoiso <i>et al.</i> , (2020)
32.3 \pm 20.4	Fresco	Giuliano <i>et al.</i> , (2019)
13.7 \pm 8.7	Fresco	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
13.9 \pm 13.5	Fresco	Rodriguez (2013)
43.1 \pm 16.4	Refrigerado	Fumuso <i>et al.</i> , (2021)
15.5 \pm 19.1	Refrigerado	Giuliano <i>et al.</i> , (2019)
23.2 \pm 21.2	Refrigerado	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
11.5 \pm 7.1	Descongelado	Fumuso <i>et al.</i> , (2021)
62.0 \pm 9.7	Descongelado	Fumuso <i>et al.</i> , (2020)
3.2 \pm 6.0	Descongelado	Carretero <i>et al.</i> , (2014)

Fuentes: Indicadas

Cuadro 4. Motilidad de espermatozoides móviles progresivos (EMP) y no progresivos (EMNP) de semen de llama y alpaca colectado por EE

EMP	EMNP	Especie	Estado de Muestra	Autor
6.0 ± 10.8	41.2 ± 10.3	Llama	Fresco	Fumuso <i>et al.</i> , (2021)
1.53 ± 0.83	43.15 ± 18.31	Llama	Fresco	Ccoiso <i>et al.</i> , (2020)
1.2 ± 2.0	12.7 ± 2.0	Llama	Fresco	Rodríguez (2013)
4.4 ± 10.43	-	Llama	Fresco	Giuliano <i>et al.</i> , (2010)
-	54.66	Llama	Fresco	Valle (2013)
1.2 ± 3.5	41.9 ± 17.1	Llama	Refrigerado	Fumuso <i>et al.</i> , (2021)
2.92 ± 2.57	31.83 ± 8.31	Alpaca	Refrigerado	Flores <i>et al.</i> , (2021)
0.94 ± 0.62	27.56 ± 12.44	Alpaca	Refrigerado	Ciprian (2019)
9.8 ± 7.4	1.7 ± 4.4	Llama	Descongelado	Fumuso <i>et al.</i> , (2021)
0.72 ± 0.76	9.69 ± 1.80	Alpaca	Descongelado	Flores <i>et al.</i> , (2021)
25.8 ± 14.8	36.2 ± 11.0	Llama	Descongelado	Fumuso <i>et al.</i> , (2020)
0.34 ± 0.21	11.15 ± 7.50	Alpaca	Descongelado	Ciprian (2019)

Fuentes: Indicadas

Cuadro 5. Parámetros de velocidad de espermatozoides de semen de llama fresco colectado por electroeyaculación.

VARIABLE	Autor	Rodríguez (2013)	Ccoiso <i>et al.</i> , (2020)
		Media ± DS	Media ± DS
VCL (um/s)		36.9 ± 8.8	80.18 ± 20.79
VSL (um/s)		8 ± 2.3	18.9 ± 5.72
VAP (mm/s)		18.5 ± 3.3	36 ± 8.03
LIN (%)		22.2 ± 5.5	23.97 ± 5.08
STR (%)		43 ± 8.2	52.24 ± 7.72
WOB (%)		51.6 ± 9.7	45.79 ± 6.09
ALH (mm)		1 ± 0.8	3.31 ± 1.13
BCF (Hz)		1.8 ± 1.8	5.61 ± 1.83

Fuentes: Indicadas; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio de desplazamiento; LIN: Porcentaje de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación.

Cuadro 6. Parámetros de velocidad de espermatozoides de semen de llama refrigerado y descongelado, colectado por electroeyaculación.

VARIABLE	Estado de muestra	Refrigerado	Descongelado
		Media ± DS	Media ± DS
VCL (um/s)		50.3 ± 11.0	36.7 ± 12.3
VSL (um/s)		12.6 ± 3.0	9.4 ± 3.9
VAP (mm/s)		25.8 ± 3.0	18.9 ± 5.2
LIN (%)		25.5 ± 4.8	26.0 ± 5.2
STR (%)		48.6 ± 8.6	49.7 ± 10.9
WOB (%)		53.1 ± 9.5	53.0 ± 6.9

Fuente: Flores *et al.*, (2021); VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio de desplazamiento; LIN: Porcentaje de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación.

b. Concentración espermática

Es muy importante determinar con precisión el número de espermatozoides para así calcular el número de hembras que pueden ser inseminadas, se expresa como el número de espermatozoides por mililitro. Esta es una característica muy variable que depende de la cantidad de testosterona secretada por los testículos; característica que aumenta con la edad y el tamaño del animal y también se ve afectado por factores importantes como la dieta, la edad, el estado de salud y el tamaño testicular (Hafez y Hafez, 2002).

La concentración de espermatozoides en la llama oscila entre 30.000 y 150 millones de espermatozoides / ml, y varía mucho entre los machos, colectas y método de colección de semen (Vaughan *et al.*, 2003).

Cuadro 7. Concentración espermática del semen fresco de llama colectada por electroeyaculación (EE).

CONCENTRACION (10⁶/ML)	Autor
97.14 ± 44.22	Gallegos <i>et al.</i> , (2021)
101.71 ± 39.52	Ccoiso <i>et al.</i> , (2020)
24.3 ± 23.2	Giuliano <i>et al.</i> , (2019)
39.14 ± 11.22	Laruta, <i>et al.</i> , (2016)
84.39 ± 71.93	Rodriguez., (2013)

Fuentes: Indicadas

c. Vitalidad Espermática

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 (Sorensen, 1991).

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). Maxi (2019) reporta una vitalidad de 79.71 ± 1.71 en semen refrigerado de alpaca y en descongelado 56.66 ± 3.17 colectado por el método de post cópula, por otro lado Ccalta (2017) reporta un 27.75 ± 4.57 de vitalidad en semen refrigerado y 12.48 ± 2.35 en descongelado, datos obtenidos a partir de colección de semen de alpaca con el método de post copula.

Cuadro 8. Vitalidad espermática del semen de llama colectada por electroeyaculación (EE).

Vitalidad (%)	Estado de semen	Autor
54.8 ± 13.9	Fresco	Fumuso <i>et al.</i> , (2021)
64.56 ± 13.54	Fresco	Gallegos <i>et al.</i> , (2021)
54.1 ± 17.0	Fresco	Giuliano <i>et al.</i> , (2019)
61.32 ± 12.85	Fresco	Ccoiso <i>et al.</i> , (2020)
66.5 ± 10.1	Fresco	Fumuso <i>et al.</i> , (2019)
86.67 ± 5.77	Fresco	Laruta, <i>et al.</i> , (2016)
52.7 ± 15.2	Refrigerado	Fumuso <i>et al.</i> , (2021)
55.5 ± 9.5	Refrigerado	Giuliano <i>et al.</i> , (2019)
37.9 ± 15.4	Refrigerado	Fumuso <i>et al.</i> , (2018)
14.9 ± 11.7	Descongelado	Fumuso <i>et al.</i> , (2021)
8.8 ± 5.6	Descongelado	Fumuso <i>et al.</i> , (2019)
32.4 ± 10.5	Descongelado	Aller <i>et al.</i> , (2003)

Fuentes: Indicadas

d. Morfología espermática

La morfología de los espermatozoides es una parte importante en la evaluación de los espermatozoides. En muchas especies, la disminución del porcentaje de espermatozoides normales está relacionada con la disminución de la fertilidad (Ordoñez *et al.*, 2012). Al evaluar la morfología de los espermatozoides, encontramos diferentes formas de espermatozoides. La forma normal se divide en cabeza normal y flagelos completamente desenrollados. La longitud media de la cabeza es de 5.47 μm , el ancho de la cabeza es de 3.4 μm , la longitud de la cola es de 40.94 μm y la longitud total es de 46.03 μm respectivamente (Gonzales, 2008).

Según (Jakso *et al.*, 1990), indican que la morfología y morfometría espermática es una parte esencial en la evaluación seminal de muchas especies, ya que una disminución en el porcentaje de espermatozoides normales está correlacionado con una disminución de la fertilidad del reproductor. Según Buendía *et al.*, (2002), en alpacas, la distribución de espermatozoides normales está entre $14.65 \mu\text{m}^2 \leq \text{área} \leq 17.38 \mu\text{m}^2$ con un promedio de $15.95 \mu\text{m}^2$, los espermatozoides grandes tienen un área $\geq 17.38 \mu\text{m}^2$.

Según opinión de Salisbury y Vandermark (1982), menciona que la morfología espermática aceptable donde la fertilidad no se ve afectada es hasta el 20 % - 25 % de anomalía o que un 70 % de los espermatozoides posean morfología normal.

Reportes de la morfología normal espermática en llamas usando la técnica de electroeyaculación: Director *et al.*, (2007) reporta $61,95 \pm 17,9 \%$; Giuliano *et al.*, (2008) reporta $61,4 \pm 19,9 \%$; Casaretto *et al.*, (2012) reporta $57,14 \pm 13,1 \%$; Carretero *et al.*, (2012) reporta $62,0 \pm 10,7 \%$. Todos estos estudios se realizaron a nivel del mar en Buenos Aires - Argentina.

La morfología de la cabeza del espermatozoide de la llama se clasificó en 5 formas, obteniendo así las siguientes medidas: 9,54 % piriforme, 15,78 % corto, 53,97 % normal, 7,01 % redondos y 13,70 % largo, en total se evaluaron en 5 590 espermatozoides de 26 llamas colectadas por el método de post cópula (Cusiyunca, 2017).

Cuadro 9. Parámetros de morfometría espermática de llamas según el ISAS

Cabeza	Forma de la cabeza	Pieza intermedia
Longitud (L) (μm)	Elipticidad	Achura de la P.I.
Ancho (W) (μm)	Rugosidad	Área de la P.I.
Área (A) (μm^2)	Elongación	Distancia de Inserción de la P.I.
Perímetro (P) (μm)	Regularidad	Angulo de Inserción de la P.I.
% de Acrosoma		

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

Cuadro 10. Parámetros de morfometría de la región de la cabeza y pieza intermedia del espermatozoide de llamas colectado por electroeyaculación.

	Autor	Gallegos <i>et al.</i>, (2021)		Casaretto <i>et al.</i>, (2012)		Rodriguez (2013)	
		Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS
CABEZA	Longitud (um)	5.21	0.41	6.60	3.83	5.2	0.5
	Ancho (um)	3.17	0.27	4.14	2.78	3.1	0.3
	Area (um ²)	13.70	1,67	20.09	2.75	13.6	1.9
	Perimetro (um)	16.17	1.51	18.54	0.47	16.6	2.0
	Acrosoma (%)	51.19	6.47	-	-	46.3	6.7
	Elipticidad (#)	1.65	0.16	1.28	3.70	1.6	0.2
	Rigocidad (#)	0.62	0.07	-	-	0.6	0.1
	Elongacion (#)	0.24	0.05	1.59	1.02	0.2	0.1
	Regularidad (#)	0.95	0.05	-	-	0.9	0.1
PIEZA INTERMEDIA	Anchura (um)	1.39	0.37	-	-	1.4	0.4
	Area de P.I. (um ²)	2.94	0.82	-	-	3.0	0.7
	Dist. Insercion (um)	0.23	0.17	-	-	0.2	0.2
	Ang. Insercion (°)	9.50	10.99	-	-	11.0	13.5

Fuente: Indicadas

e. Funcionalidad de la Membrana Espermática

Según Jeyendran *et al.*, (1984), indica que la evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática del espermatozoide es importante en la evaluación de la fertilidad del macho, esta integridad funcional es fundamental para el metabolismo espermático, para una adecuada capacitación y reacción acrosómica al momento de la fecundación con el ovulo, y por ende para la fertilidad del macho.

La prueba de endosmosis (Hypo-Osmotic 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 la del medio externo, para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar integra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (Jeyendran *et al.*, 1984). La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo, las células con la membrana funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma del flagelo (Quinteros, 2003).

Cuadro 11. Funcionalidad de la membrana espermática del semen de llama colectada por electroeyaculación (EE).

Media (%)	Estado de semen	Especie	Autor
54.31 ± 9.29	Fresco	Llama	Ccoiso <i>et al.</i> , (2020)
36.1 ± 13.1	Fresco	Llama	Giuliano <i>et al.</i> , (2019)
30.4 ± 12.8	Fresco	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
38.2 ± 7.2	Fresco	Llama	Rodríguez, (2013)
50.4 ± 18.9	Refrigerado	Llama	Giuliano <i>et al.</i> , (2019)
45.3	Refrigerado	Alpaca	García <i>et al.</i> , (2017)
51.6 ± 12.3	Refrigerado	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2016)
13.46	Descongelado	Alpaca	Ccalta <i>et al.</i> , (2017)
25.6 ± 6.7	Descongelado	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
22.82	Descongelado	Alpaca	Zirena (2014)

Fuente: Indicadas

f. Integridad Acrosomal

El acrosoma es un organelo membranoso de doble capa ubicada en la parte apical de la cabeza espermática (Figura 1), que contiene distintas enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina (Ugarelli *et al.*, 2017). La determinación de la integridad acrosomal es uno de los parámetros espermáticos de importancia, debido a su papel en la reacción acrosomal que es un proceso exocitótico, que consiste en la fusión del acrosoma con la membrana plasmática, resultando en la exposición y liberación del contenido acrosomal al medio extracelular (Ramalho-Santos *et al.*, 2002). Por esta razón es muy importante para la fertilización y el empleo de técnicas para su valoración en camélidos sería de utilidad para evaluar los efectos que puedan tener las diferentes biotecnologías (Giuliano *et al.*, 2012).

Larson y Miller (1999) demostraron que el estado acrosomal de los espermatozoides de varias especies de mamíferos puede ser teñido fácilmente de forma confiable y sin requerir microscopia de fluorescencia usando la tinción de Coomassie Blue (CB). Huo *et al.*, (2002) describieron que, mediante la tinción de CB se colorea el capuchón acrosomal en espermatozoides con el acrosoma intacto y no se tiñe la región acrosomal de aquellos espermatozoides que han perdido el acrosoma.

Carretero *et al.*, (2015) indican que la evaluación de la integridad acrosómica provee información adicional sobre las funciones espermáticas complementarias a la evaluación seminal de rutina, contribuyendo a un análisis más completo de los eyaculados con el objetivo de mejorar las técnicas de reproducción asistida utilizadas en la especie.

Cuadro 12. Porcentaje de Integridad de la membrana acrosomal de semen de llama colectada por el método de EE, Post copula y Desviación de conducto deferente en alpaca.

Media (%) ± DS	Estado de semen	Especie	Autor	Tinción
59.33 ± 7.16	Fresco	Llama	Gallegos <i>et al.</i> , (2021)	Coomasie blue
67.36 ± 11.01	Fresco	Llama	Ccoiso <i>et al.</i> , (2020)	Coomasie blue
79.7 ± 8.1	Fresco	Llama	Fumuso <i>et al.</i> , (2019)	FITC-PNA
81.51 ± 10.95	Fresco	Llama	Fumuso <i>et al.</i> , (2014)	FITC-PNA
48.3 ± 10.2	Fresco	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2014)	Coomasie blue
64.44 ± 13.6	Fresco	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2015)	Coomasie blue
78.5	Refrigerado	Llama	Giuliano <i>et al.</i> , (2012)	Coomasie blue
52.65 ± 8.42	Refrigerado	Alpaca	Ccalta, (2017)	Coomasie blue
33.62 ± 6.01	Refrigerado	Alpaca	Ccalta, (2017)	Coomasie blue
40.6 ± 16.0	Descongelado	Llama	Fumuso <i>et al.</i> , (2019)	FITC-PNA
15.3	Descongelado	Llama	Choez <i>et al.</i> , (2014)	Doble tincion
61.5	Descongelado	Llama	Giuliano <i>et al.</i> , (2012)	Coomasie blue

Fuente: Indicadas

2.5. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO (IFAE)

Evenson *et al.*, (1994), definen a la fragmentación del ADN espermático como la presencia de roturas en la cadena simple o doble del ADN del espermatozoide; las cuales se asocian estrechamente con la infertilidad y es por eso que los índices de fragmentación del ADN espermático (IFAE) está siendo reconocida como una causa importante en la fertilidad de animales domésticos.

Zini *et al.*, (2001), define que una de las principales funciones del espermatozoide es la transferencia del material genético íntegro e intacto hasta el óvulo, lo que es crucial para conseguir una fecundación con éxito y cuando la cromatina está dañada se producen embriones de mala calidad que dan lugar a bloqueos embrionarios, y por tanto, a futuros abortos.

Silva y Gadella, (2006), menciona que la calidad del ADN espermático es un factor trascendente para iniciar y llevar una gestación a término. En este sentido, en humanos se ha señalado que la lesión del ADN espermático puede dar lugar a un desarrollo anómalo embrionario, fallas en la implantación de embriones y abortos en fases tardías de la gestación.

Según Kodama *et al.*, (1997); Irvine *et al.*, (2000), la integridad del ADN del espermatozoide se ha reconocido en los últimos años como un parámetro importante indicador de la calidad seminal y la fecundidad, por lo que algunos estudios indican que el daño de ADN está asociado con anomalías en los parámetros seminales convencionales, teniendo en cuenta que la integridad del ADN y la cromatina espermático son esenciales para la correcta transmisión de la información genética a las siguientes generaciones.

Aravindan, *et al.*, (1997), indican que la presencia de defectos en el material genético del espermatozoide, tal como una condensación anormal de la cromatina, daño del ADN o presencia de cromosomas anormales están íntimamente asociados con la infertilidad del macho.

Gonsálvez *et al.*, (2008), concluyen que el proceso de la fragmentación del ADN en el esperma es un proceso dinámico y existen diferencias en la velocidad de fragmentación en las distintas especies de mamíferos y entre individuos de cada especie, también menciona que la fragmentación del ADN puede ser un factor importante en la disminución rápida de la calidad seminal a medida que transcurre el tiempo; dado que la molécula de ADN tiende a degradarse de forma rápida tras la descongelación. Por lo tanto si la fragmentación del ADN es alta, el éxito reproductivo del semental se reduce, dado que bajos niveles de IFAE (Índice de Fragmentación de ADN espermático) se asocian con mejores tasas de fecundación.

Cuadro 13. Parámetros de área de núcleo y halo en espermatozoides en semen de alpaca y llama fresco, refrigerado y descongelado colectadas por EE.

Área del núcleo (μm^2)	Área del halo (μm^2)	Estado de semen	Especie	Autor
21.85 \pm 5.22	72.16 \pm 21.37	Fresco	Alpaca	Huanca, (2015)
33.67 \pm 8.14	61.35 \pm 13.74	Fresco	Llama	Rodríguez, (2013)
30.10 \pm 2.31	58.88 \pm 15.77	Fresco	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2012)
72.97 \pm 14.84	40.09 \pm 8.79	Descongelado	Llama	Rodríguez, (2013)

Fuente: Indicadas

Cuadro 14. Parámetros de índice fragmentación de ADN espermático en espermatozoides fragmentados y no fragmentados en alpacas colectadas por electroeyaculación.

	Espermatozoides fragmentados	Espermatozoides no fragmentados
	Prom. \pm D.S	Prom. \pm D.S
Área de núcleo	21.846 \pm 5.229	9.710 \pm 2.613
Área halo	72.163 \pm 21.372	21.085 \pm 4.988

Fuente: Huanca, (2015)

Cuadro 15. Porcentaje de IFAE en semen de llama colectada por EE.

Media (%) ± DS	Estado de semen	Especie	Autor
26.4 ± 14.4	Fresco	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2020)
8.0 ± 4.7	Fresco	Llama	Fumuso <i>et al.</i> , (2019)
13.65 ± 18.98	Fresco	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2015)
19.2 ± 13.6	Fresco	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
5.27 ± 0.56	Fresco	Llama	Rodríguez, (2013)
8.0 ± 7.8	Fresco	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2012)
27.0 ± 16.0	Refrigerado	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
13.0 ± 8.5	Descongelado	Llama	Fumuso <i>et al.</i> , (2019)
93.8 ± 9.7	Descongelado	Llama	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
5.33 ± 0.51	Descongelado	Llama	Rodríguez, (2013)

Fuente: Indicadas

2.5.1. Causas de la fragmentación del ADN espermático

La fragmentación del ADN espermático ha sido el objeto de muchos estudios en los últimos años tanto en humanos (Agarwal y Allamaneni, 2004; Evenson *et al.*, 1999) como en otros mamíferos (Rybak *et al.*, 2012; Waterhouse *et al.*, 2006). Sin embargo, el mecanismo exacto por el que se origina la fragmentación del ADN en los espermatozoides no se conoce, aunque la apoptosis, el estrés oxidativo o la permanencia de las roturas de ADN producidas durante el proceso de protaminación en la espermiogénesis se han propuesto como causas directas. Se sabe también que otros factores como la exposición a contaminantes ambientales (Rubes *et al.*, 2005), el consumo de tabaco (Saleh *et al.*, 2002b), la temperatura elevada (Evenson *et al.*, 1999; Oliva *et al.*, 2001) o la edad avanzada (Schmid *et al.*, 2007), podrían provocar fragmentación de ADN en los espermatozoides.

Cortés *et al.*, (2007), sostiene que el origen del daño en el ADN del espermatozoide, es a causa de un efecto de naturaleza multifactorial en el que interviene una casuística no del todo delimitada, pero se puede identificar daños de tipo endógeno y exógeno.

Leduc *et al.*, (2008), (daños endógenos), indica hay un defecto en el empaquetado del ADN espermático, donde se relaciona la presencia de roturas en la cadena del ADN en células maduras con el intercambio del complejo de histonas por las protaminas que ocurre en el proceso de la espermiogénesis. Este intercambio, dirigido a conseguir una mayor compactación de la molécula de ADN, genera cierto nivel de estrés en la torsión de la molécula de ADN, dado que hay un super-enrollamiento heredado de la presencia de histonas y la generación de radicales libres de oxígeno (REDOX).

Carretero *et al.*, (2012), demuestra y reporta algunos factores de daño exógeno en el ADN del espermatozoide en llamas, como la exposición a elevadas temperaturas, contaminación del semen con hidróxido de sodio (0.3 mg de NaOH) y la exposición del semen a los rayos ultravioletas.

Cuadro 16. Porcentaje de espermatozoides con presencia de halo y sin halo expuestos a daños exógenos (T°, NaOH y rayos U.V).

Tratamientos de semen	Espermatozoides con Halo, ADN no fragmentado (%)	Espermatozoides sin Halo, ADN fragmentado (%)
Semen puro	91.5 ± 3.5	1.2 ± 0.6
Semen + 100 °C	44.3 ± 3.1	51.7 ± 4.3
Semen + NaOH	45.6 ± 2.5	51.2 ± 1.8
Semen + rayos U.V	44.4 ± 3.9	52.7 ± 3.7

Fuente: Carretero *et al.*, (2012).

2.5.2. Métodos de evaluación del daño en el ADN espermático

Cortés *et al.*, (2007), clasifican los métodos de evaluación de la fragmentación o daño del ADN espermático en dos grupos. La primera incluye métodos encaminados a marcar las roturas de simple y doble cadena, que se registran de forma natural o provocada en la molécula del ADN. Plantea incluir en este grupo los procesos enzimáticos para la incorporación in situ de nucleótidos

marcados, tales como la Terminal dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) o la In Situ Nick Translation (ISNT).

La segunda incluye métodos que miden la capacidad de la cromatina y en particular del ADN, de desnaturalizarse frente a determinados tratamientos. Se incluyen técnicas como el Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), el ADN Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization (DBD-FISH), el ensayo cometa y la prueba Sperm Chromatin Dispersion (SCD). Existen otras pruebas para el análisis del estado de la cromatina como el azul de toluidina y la naranja de acridina (condensación cromática).

2.6. TEST DE DISPERSIÓN DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD)

Fernández *et al.*, (2003), mencionan que el ADN del espermatozoide de los mamíferos se encuentra unas seis veces más compacto y organizado en bucles de menor tamaño que las células somáticas. Dichos bucles se compactan por la acción de las protaminas intercaladas, las cuales estabilizan rígidamente la estructura a través de la formación de puentes disulfuro entre ellas. Si se rompen los enlaces disulfuro y se usa una solución de lisis para extraer proteínas, los bucles de ADN se relajan constituyendo halos alrededor de la estructura nuclear central residual. Simplemente valorando el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina, mediante microscopia de campo claro o de fluorescencia, es posible reconocer la presencia de fragmentación de ADN en los espermatozoides y puede ser automatizada empleando programas informáticos asociados a sistemas tipo CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer). La principal ventaja de esta técnica es que la interpretación de los resultados no requiere la determinación de color, ni de intensidad de fluorescencia y no necesita de un equipo complejo, ni personal especializado y se puede usar en diferentes especies animales, pero en todos los casos los protocolos de desproteínización han de ser adaptados a cada especie, dado que las proteínas que intervienen en el empaquetamiento del ADN tienen diferente naturaleza Carretero *et al.*, (2009),

Fernández *et al.*, (2003), sustenta que es una técnica que produce una descondensación diferencial de la cromatina en aquellos espermatozoides que tienen su ADN fragmentado respecto de aquellos que no lo tienen y que está basado en la respuesta diferencial de la fragmentación, o no, del núcleo del espermatozoide a un tratamiento de desproteización destacando los fragmentos entre los puntos de rotura, la extracción de las proteínas nucleares de los espermatozoides con ADN fragmentado se realiza mediante el empleo de una solución específica de lisis para extraer proteínas, los bucles de ADN se relajan constituyendo halos alrededor de la estructura nuclear central residual.

2.6.1. Fundamento del test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD)

Fernández *et al.*, (2003), sostuvo que el test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) es un método para identificar y evaluar a los espermatozoides que presentan daño en su ADN, el cual permite identificar a aquellos que tienen su material genético (ADN) dañado y así diferenciarlos; y nos permite establecer el Índice de Fragmentación del ADN Espermático (IFAE), es la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado con respecto al total de espermatozoides analizados en la muestra.

El fundamento del test SCD se basa en dos fenómenos. PRIMERO: Las hebras de ADN que contienen roturas en su ADN son más fáciles de ser desnaturalizadas. De hecho, los extremos de las roturas, que pueden ser de cadena sencilla o doble, son los orígenes de la desnaturalización cuando éstos se enfrentan a un tratamiento de carácter ácido. SEGUNDO: Los bucles compactados de cromatina nuclear, compuestos de ADN y proteínas, se desempaquetan cuando se extraen proteínas nucleares con un tratamiento desproteizante. Este proceso de relajación de los bucles de cromatina da lugar halos periféricos de ADN que emanan del núcleo central del espermatozoide Fernández *et al.*, (2003).

2.6.2. Patrones de clasificación de los espermatozoides con daño en el ADN

Carretero *et al.*, (2012), evaluaron la fragmentación del ADN espermático de llama, aplicando este nuevo método de fragmentación de ADN en semen de llamas, que es el test SCD (Dispersión de la Cromatina Espermática). Determino cuatro patrones de dispersión de ADN fueron claramente observados.

- Núcleos con halos grandes de dispersión de ADN
- Núcleos con halos medio de dispersión de ADN
- Núcleos con halos muy pequeños de dispersión de ADN
- Núcleos sin halo de dispersión de ADN

Posado *et al.*, (2014), clasificaron los espermatozoides en dos categorías según la morfología obtenida en los halos de los espermatozoides. Patrón I espermatozoides con núcleos que mostraron pequeños halos de dispersión de la cromatina, que corresponden a los espermatozoides que contienen ADN no fragmentado, patrón II espermatozoides con núcleos expusieron grandes halos de difusión de la cromatina, correspondientes a núcleos fragmentados.

Cuadro 17. *Patrones de dispersión de cromatina espermática (SCD) (grandes, medianos, pequeños y sin halos) observados en los espermatozoides de semen llama.*

Halo Grande	Halo Mediano	Halo pequeño	Sin Halo	Estado de semen	Autor
2.4 ± 3.8	81.1 ± 7.3	14.9 ± 7.7	1.6 ± 1.2	Fresco	Carretero <i>et al.</i> , (2016)
80.8 ± 13.6		1.6 ± 1.2	17.6 ± 12.9	Fresco	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
54.64 ± 2.31	40.09 ± 2.13	3.36 ± 0.47	1.90 ± 0.32	Fresco	Rodríguez (2013)
60.2 ± 33.8	31.8 ± 26.9	6.8 ± 6.4	1.2 ± 1.6	Fresco	Carretero <i>et al.</i> , (2012)
2.2 ± 3.0	79.1 ± 6.6	17.7 ± 7.3	1.0 ± 1.0	Refrigerado	Carretero <i>et al.</i> , (2016)
61.3 ± 22.8		3.3 ± 2.8	35.4 ± 22.7	Refrigerado	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
6.2 ± 9.7		47.2 ± 28.2	46.6 ± 25.1	Descongelado	Carretero <i>et al.</i> , (2014)
53.87 ± 2.67	40.79 ± 2.84	3.44 ± 0.52	1.89 ± 0.28	Descongelado	Rodríguez (2013)

Fuentes: Indicadas

2.7. PROCEDIMIENTO DE CONGELACIÓN DE SEMEN DE LLAMA

La congelación de semen tiene varias etapas, que comprende desde la dilución hasta obtener el semen descongelado.

2.7.1 Dilución

Bustinza (2001) menciona que para hacer una adecuada dilución se utiliza la concentración, el volumen del semen, el porcentaje de espermatozoides vivos, muertos y los anormales.

La inseminación artificial con semen diluido se puede realizar con un rango de concentración que va de 8 a 16 millones de espermatozoides por ml (Cárdenas, 2002; Alarcón *et al.*, 2012; Ordoñez *et al.*, 2013).

2.7.2 Enfriamiento - refrigerado

El proceso de refrigeración también puede utilizarse como método de conservación a corto plazo para lo que necesita diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana en el descenso de temperatura, como la yema de huevo (Choez, 2010).

La refrigeración es la disminución gradual de la temperatura para lograr una baja movilidad, generalmente manteniendo en 4 a 5°C. El tiempo de refrigeración puede ser de una hora (Ordoñez *et al.*, 2013) o de 2 horas (Baca, 1998; Cuba, 2000; Morton *et al.*, 2007).

2.7.3 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. (Baca, 1998; Cuba, 2000)

Morton *et al.*, (2007) en un experimento con espermatozoides del epidídimo de alpaca, investigaron la congelación de semen en pellets y pajuelas, logrando la mejor recuperación de espermatozoides después de la congelación en pellets.

El semen diluido puede ser envasado en forma de pellets (Morton *et al.*, 2007; Ordoñez *et al.*, 2015) y en pajuelas de 0.25 ml (Cuba, 2000; Banda *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2015) y 0.5 ml (Cárdenas, 2002; Aller *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2007; Ordoñez *et al.*, 2013; Zirena, 2014) y sellado con alcohol polivinílico.

2.4.4 Equilibrado, congelación y almacenamiento

El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido (NL), sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas entre los -15 y -60°C que las células experimentan durante la congelación y la descongelación, ya que a -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130°C no existe agua en estado líquido (Choez, 2010).

El tiempo recomendado para el equilibrio es de 45 a 60 minutos y mantenido en refrigeración de $4 - 5^{\circ}\text{C}$ de temperatura (Baca, 1998; Cuba, 2000; Aller *et al.*, 2013; Ordoñez *et al.*, 2013; Ordoñez *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2015).

La congelación en forma horizontal se hace en un depósito de tecnopor, donde se vierte NL hasta una altura de 4 cm, las pajuelas 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 sumergidas en NL (Cárdenas, 2002), para posteriormente ser transferido a los tanques criogénicos y almacenado a -196°C .

2.7.5 Descongelación

Los procesos de la descongelación se realizaron a $35 - 37^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos a un minuto (Cuba, 2000; Aller *et al.*, 2003; Cárdenas, 2002; Morton *et al.*, 2007; Ordoñez *et al.*, 2013; Flores *et al.*, 2015), 38°C por 60 segundos (Zirena, 2014), 42°C por 45 segundos (Banda *et al.*,

2010). El éxito final de un procedimiento de congelación está condicionado por el proceso del descongelado, se debe guardar el ritmo de enfriamiento y calentamiento (Choez, 2010).

Cuba (2000) evaluando la motilidad y vitalidad de semen congelado a diferentes tiempos de descongelado: 24 horas, 7, 15 y 30 días; concluye que no hay diferencia entre los diferentes tiempos de almacenamiento.

2.8. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

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

Si bien la criopreservación garantiza la supervivencia de los espermatozoides, tiene efectos sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides y es un factor que debe ser considerado en protocolos de tecnologías de reproducción asistida, ya que la fertilidad del semen es el factor más importante para tener en cuenta al implementar nuevas técnicas o procedimientos en programas de IA (Aller *et al.*, 2003). La conservación de espermatozoides y de su capacidad fertilizante exige la reducción o interrupción reversible del metabolismo celular, esto se consigue mediante el uso de dilutores, ya que los procedimientos de refrigeración y congelación deprimen el metabolismo (Choez, 2010).

2.8.1 Dilutores de semen

Los componentes bioquímicos del plasma seminal de camélidos son similares a otras especies de ganado doméstico, por esta razón se sugiere que los diluyentes de semen utilizado

para la criopreservación de espermatozoides de carnero y toro serían adecuados para el almacenamiento de semen de camélidos. Sin embargo, a pesar de los intentos de dilución utilizando lactosa, sacarosa, citrato - fructosa y tampones, los dilutores disponibles comercialmente son fabricados para otras especies (Bravo *et al.*, 2000).

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

Un dilutor debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (albumina sérica de ternero), 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 (Ávila, 2009).

Para la conservación de semen de alpaca se han probado varios tipos de dilutores, siendo el más usado, el dilutor en base Tris + yema de huevo, encontrando motilidad en semen refrigerado de 34 – 60% (Banda *et al.*, 2010; Ordoñez *et al.*, 2013; Zirena, 2014; García *et al.*, 2017) y en semen descongelado de 10 – 35% motilidad (Cárdenas, 2002; Banda *et al.*, 2010; Ordoñez *et al.*, 2013; Zirena, 2014).

Morton *et al.*, (2007) en un estudio donde comparan tres tipos de dilutor en base a citrato, lactosa y tris, muestran que la mejor supervivencia espermática post-descongelación se obtuvo para el semen diluido en el medio lactosa (18.2%). Banda *et al.*, (2010) evaluando dilutores tris, tes y leche descremada, indica que el grupo leche descremada (17.0%) fue mejor que el grupo tris (14.0%). Santiani *et al.*, (2005) evaluaron tipos de dilutores encontrando mejores resultados en el dilutor leche descremada.

2.8.2 Crioprotectores de semen

Los crioprotectores se clasifican en dos grupos: alcoholes (etilenglicol, propilenglicol, glicerol) y amidas (dimetilformamida, dimetilacetamida), un crioprotector ideal debe tener un bajo

peso molecular, tener buena solubilidad en el agua y tener mínima toxicidad a los espermatozoides (Zimmermann, 2007). 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).

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 *et al.*, 2008).

Santiani *et al.*, (2005) en un estudio para evaluar dos crioprotectores en el congelamiento de semen de alpaca obtenido por Vagina Artificial, licuados por acción mecánica, concluyeron que el crioprotector etilenglicol brindó los mejores resultados. Aller *et al.*, (2003) en un estudio en semen de llama, obtuvieron 20.4% de motilidad usando un dilutor con 6% de glicerol y 8% de DMSO. Cárdenas (2002) obtuvo altos valores de motilidad post-descongelado (35.10%), utilizando un dilutor base Tris + 30% de yema de huevo y 5% de glicerol.

Choez *et al.*, (2014) Utilizando un dilutor leche descremada - yema de huevo y fructosa para la recuperación y dilución de los espermatozoides epididimarios de alpaca, los cuales fueron congelados con 8 concentraciones (0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 y 1.75 M) de tres tipos de crioprotectores y encontraron que los porcentajes más altos de motilidad, viabilidad e integridad acrosomal se encontraron en los grupos congelados con glicerol, etilenglicol y DMSO utilizando la concentración de 1 M.

Carretero *et al.*, (2013) indican que el semen congelado con dilutor a base de lactosa, yema de huevo y 7% de dimetilformamida presento un porcentaje mayor de movilidad espermática que el obtenido al congelar con el diluyente con 7% de glicerol. Crichton *et al.*, (2015) reporta resultados satisfactorios usando metilformamida en la congelación de semen de dromedarios.

Morton *et al.*, (2007) en un estudio donde comparan tres tipos de dilutor en base a citrato, lactosa y tris y usando 5, 9 y 3% de glicerol como crioprotector, respectivamente, determinaron los mejores resultados para la congelación de espermatozoides epididimarios de alpaca, en el diluyente en base a lactosa (18.2%). Otros autores usando glicerol como crioprotector encontraron una motilidad post-descongelado de semen de alpaca de ~18% (Ordoñez *et al.*, 2013; Zirena, 2014).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en los meses de diciembre 2019 a diciembre 2020, 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 Maranganí, 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

Se utilizaron 5 llamas machos seleccionados de la raza Q'ara y Chak'u, de 4 a 6 años de edad, reproductivamente aptos y con buena condición corporal, antes de iniciar con las colectas se les realizó un examen clínico de sus órganos genitales externos: testículos, pene y prepucio; también mencionar que los animales tuvieron las mismas condiciones de manejo y alimentación.

3.2.2. Materiales y equipos para la colección de semen

a. Equipos

- Balanza mecánica tipo reloj de 100 kg de capacidad
- Electroeyaculador (Electrojac 5 manual/automático 19/32V)
- Ecógrafo Agroscan L-10, transductor de 5.0 MHz



Foto 2. Equipos y materiales de colección de semen

b. Materiales

- Anestésicos (ketamina y xilacina)
- Jeringas descartables de 10 ml
- Agujas hipodérmicas de 181/2
- Papel toalla
- Libreta de campo
- Registro de colección
- Lapiceros
- Tubos falcón de 50 ml y 15 ml
- Colchón
- Gel para ecografía
- Vaselina
- Tubos viales 2 ml
- Soga

3.2.3. Equipos y materiales de laboratorio

a. Equipos

- Microscopio de contraste de fases UB200i con cámara, platina caliente y fluorescencia
- Microscopio Motic
- Computadora con software ISAS v 1.2
- Software SAS v 8 (Sistema de Análisis Estadístico)
- Laptop personal HP
- Impresora a inyección de tinta
- Cámara digital 14.5 Megapíxel



Foto 3. Microscopio de contraste de fases, fluorescencia, platina térmica, videocámara y computadora ejecutando el programa ISAS v.1.2.

b. Materiales

- Portaobjetos y cubreobjetos
- Portaobjetos pretratados (Kit Sperm-Halomax®)
- Placas de Petri
- Micropipetas de 0.5-10 μ l y 10-100 μ l
- Tips de 0.5-10 μ l, 10-100 μ l y 100-1000 μ l
- Balanza analítica de precisión
- Aceite de inmersión
- Etanol de 70° y de 100°
- Agua bidestilada (ABD)
- Refrigeradora
- Cronometro digital tipo reloj
- Papel bond A4
- Algodón
- Guantes quirúrgico, barbijos y gorras
- Marcador indeleble
- Gradillas
- Agua potable
- Flotador
- Pequeña bandeja

- Baño maría
- Baño seco
- Platina caliente
- Olla de aluminio de 1 l
- Cocina eléctrica
- Vaselina sin aromatizante
- Hojas de afeitar
- Jabón carbólico
- Jeringas tuberculina de 1 ml

c. Reactivos e insumos

- Kit Sperm-Halomax® (Halotech SL, Madrid, España)
- Solución de lisis (Kit Sperm-Halomax)
- Agente reductor (Kit Sperm-Halomax)
- Eppendorf con agarosa (Kit Sperm-Halomax)
- Coloración – tinción Wright
- Coloración – tinción Hemacolor
- Coloración – tinción Diff-Quik
- Host más Formaldehido
- Solución hipoosmótica: citrato de sodio y fructuosa (HOST test)
- Dilutor Base tris
- Fructuosa
- Citrato de sodio
- Alcohol polivinílico

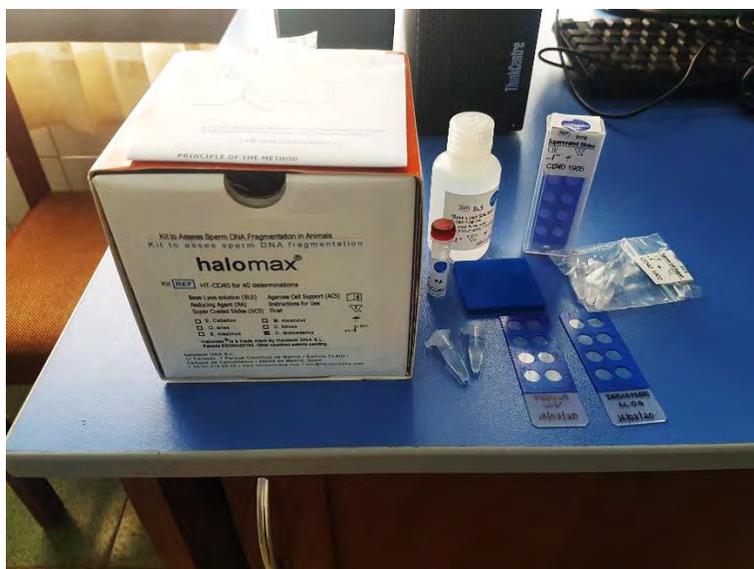


Foto 4. Kit Sperm-Halomax® (Halotech SL, Madrid, España)

3.2.4. Equipo y material de escritorio

- Lapiceros.
- Cuaderno.
- Calculadora.
- Cronometro.
- Plumones indelebles.
- Cinta masking.
- Laptop con paquete estadístico (SAS v 9.4).
- Capara fotográfica.

3.3. INSTALACIONES

Para este trabajo de investigación se utilizaron los ambientes del Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas del CICAS La Raya y un corral encercado con malla para el manejo de los machos, durante la colección de semen.

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Selección de animales

Los animales fueron seleccionados del plantel de reproductores del CICAS-La Raya, con edades comprendidas entre los 4-6 años, peso de 135.94 ± 8.65 kg, medida del testículo izquierdo de 6.13 ± 0.94 cm de largo y 2.53 ± 0.18 cm de ancho y 5.51 ± 0.50 cm de largo y 2.73 ± 0.12 cm de ancho para el testículo derecho; se consideró también que los animales estén sanos, sin problemas reproductivos, que han demostrado ser fértiles y además que muestren respuesta al método de colección de semen, estos animales fueron codificados y suplementados con vitaminas.

3.4.2. Colección de semen

a. Colección de semen por el método de electroeyaculación

Este método de colección se realizó en un espacio protegido de la luz solar, se siguió con la metodología y técnica descrita por Director *et al.*, (2007).

- Se registró el peso de cada macho, de esta manera determinar la dosis de anestésico a utilizarse.
- Se midió la distancia ano-próstata, para dicha medición se usó un transductor ecográfico y una regla milimetrada.
- Posterior a la medición de distancia de ano-próstata, los animales 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 la vía intravenosa, con el fin de mantener sedado al animal por un lapso de 15 min.
- Una vez sedado, el animal fue colocado sobre un colchón en posición decúbito lateral y se procedió al lavado del prepucio con agua destilada temperada a 37°C , donde también se hizo la limpieza de las heces presentes en el recto del animal.

- Para realizar la estimulación eléctrica, se lubricó la sonda con gel de ecografía y se introdujo cuidadosamente en el recto del animal a la profundidad determinada anteriormente con el ecógrafo, colocando los electrodos en la mitad caudal de la próstata. El voltaje fue gradualmente aumentando de 1 V hasta los 14 V, alternando periodos de estimulación propiamente dicha de 3 segundos, con un intervalo de reposo de 1 segundo, la erección se logró entre 5 a 7 V y la eyaculación entre 10 a 14 V.
- Las muestras obtenidas se almacenaron en baño maría seco a 37°C, hasta el momento de su evaluación y posterior dilución.

La frecuencia de colección por este método fue de una colecta por semana para cada macho, hasta completar con las eyaculaciones requeridas para la investigación. Se descartaron los eyaculados con un menor volumen, baja concentración de espermatozoides, alto contenido de plasma y presencia de orina.



Foto 5. Colección de semen por el método de electroeyaculación

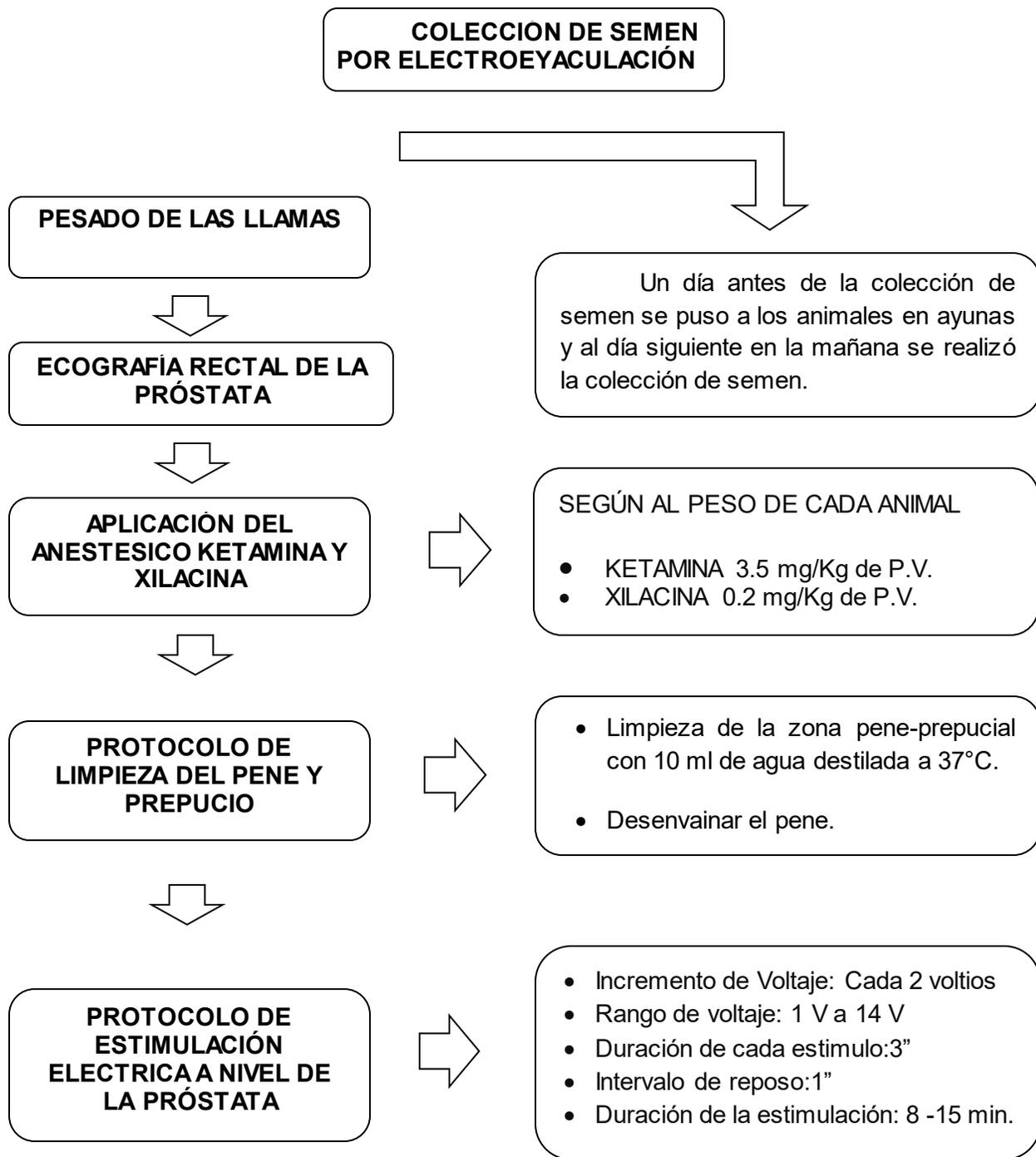


Figura 1. Flujograma del protocolo de colección de semen mediante electroeyaculación en llamas

3.5. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA DEL SEMEN DE LLAMA

La evaluación de las características macroscópicas del semen de llama obtenido por el método de electroeyaculación, se realizó inmediatamente después de la colección.

3.5.1. Volumen

Para el método de electroeyaculación se registró comparando con la escala graduada del tubo colector el cual esta expresada en mililitros (ml), dichas lecturas se determinaron por observación directa.

3.5.2. Color

Se confirmó al observar directamente la muestra, para el método de colecta por electroeyaculación (foto 6).

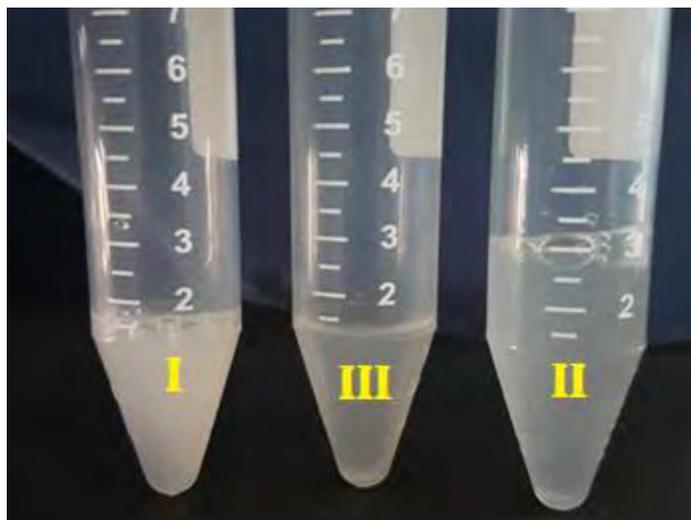


Foto 6. Evaluación del color y volumen de semen colectado por EE, se consideraron tonalidades de blanco: lechoso (I), lechoso claro (II) y cristalino (III).

3.5.3. Filancia

Para medir la filancia del semen, se aspiró 10 μ l de semen con una micropipeta, de los cuales 5 μ l se depositaron sobre una placa Petri, se levantó la micropipeta para observar la

formación del hilo y se midió la distancia donde el hilo se rompe esto con ayuda de una regla milimétrica.

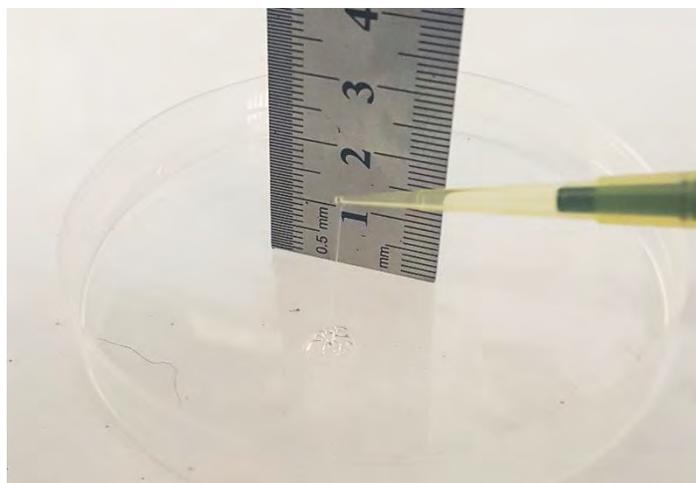


Foto 7. Filancia de muestra de semen de llama colectada por EE.

3.5.4. pH

Para medir el pH de los eyaculados colectados se utilizó tiras reactivas de pH, las cuales son tiras de papel impregnadas con una sustancias química que en función de la acidez o la basicidad de la muestra cambien de color, sus indicadores responden a la escala oficial de pH que va de 1 a 14, donde 1 es una sustancia muy acida y 14 muy alcalina.

3.6. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN DE LLAMA

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), posteriormente fue cubierta con una laminilla cubreobjetos a la misma temperatura y observado con un objetivo de 10X del 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. Posteriormente los fotogramas se corrigieron ya que el programa reconoce otras partículas como espermatozoides lo que nos llevaría a errores (PROISER, 2010).

El módulo de motilidad del ISAS evalúa parámetros de motilidad espermática como espermatozoides: estáticos, móviles no progresivos y móviles progresivos y otros parámetros de motilidad: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH), frecuencia de batida de la cabeza (BCF).

3.6.2. Vitalidad espermática

La vitalidad espermática se determinó con la tinción de eosina – nigrosina. Para esto, sobre un portaobjetos previamente rotulado y calentado a 37 °C, se colocó 10 µl de semen con 10 µl de la tinción, luego se homogenizó y después de 30 s se realizó el frotis (foto 8), dejando secar a temperatura ambiente. Las muestras fueron observadas en el microscopio BA310 Motic en un objetivo de 40X, y se usó el software Motic Imagen Plus 2.0 ML para contar un mínimo de 200 espermatozoides, considerando espermatozoides vivos aquellos donde el colorante no penetró en la cabeza y fue expresado en porcentaje de espermatozoides vivos, según lo descrito por Tribulo, (2009).



Foto 8. Frotis con tinción de eosina y nigrosina para la prueba de vitalidad

3.6.3. Morfometría espermática

Para esta evaluación se hizo la utilización del kit de coloración Hemacolor® (foto 09), procedimiento descrito según el kit de coloración.

- Se realizó un frotis empleando 5 μ l de muestra, una vez secada fueron teñidas con la técnica de coloración de Hemacolor, la cual consiste en:
 - Realizar 5 inmersiones de la muestra por 1 s en la solución 1 (solución de fijación, contiene metanol).
 - Realizar 3 inmersiones por 1 s en la solución 2 (reactivo de coloración rojo, contiene eosina 1.37g/l + PO43-).
 - Realizar 6 inmersiones por 1 s en la solución 3 (reactivo de coloración azul, contiene azure 1.7 g/l + PO43-).
 - Se dejó secar la muestra 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 09), se capturaron un mínimo 200 cabezas de espermatozoides por muestra.

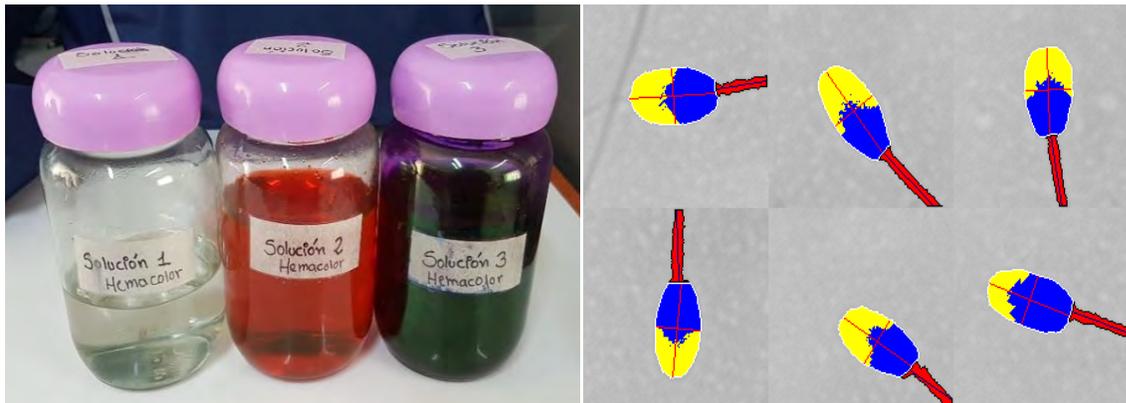


Foto 9. Kit de tinción Hemacolor® y espermatozoides capturados en el módulo de morfometría del ISAS.

3.6.4. Integridad acrosomal

La evaluación de esta característica microscópica se realizó con la tinción de Coomasie blue según descrito por Fumuso *et al.*, (2014), el cual sigue el siguiente procedimiento:

- La solución de Comasie blue fue preparada por 25 ml de metanol, 5 ml de ácido acético al 50 %, 0.11 gr de Comasie blue G250 y 20 ml de agua destilada y la solución formaldehído al 4% fue preparada por 10ml de formaldehído al 40% (formol) y 90 ml de PBS.
- Se procedió a realizar un frotis colocando 5 μ l de muestra de semen sobre una placa portaobjetos, una vez secada al medio ambiente fue sumergida en la solución Formaldehído al 4% durante 15 min.
- Concluido el tiempo de fijación se realizó el lavado con 2 a 3 inmersiones por 1 s en PBS y se pasó a secar por 2 min a temperatura ambiente.
- Luego se sumergió la placa en la solución Coomasie blue por 5 min y terminamos el proceso con el lavado en agua bidestilada (2 a 3 sumergidas) y dejamos secar al medioambiente.

Para la evaluación de la integridad del acrosoma se observó en el microscopio BA310 Motic en un objetivo de 40X, donde se usó el software Motic Imagen Plus 2.0 ML para contabilizar un mínimo de 200 espermatozoides por muestra, así determinando el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto, dicha evaluación se basó en 2 patrones, según Fumuso *et al.*, (2014).

- Espermatozoides con presencia del capuchón acrosomal (acrosoma teñido de azul)
- Espermatozoides con ausencia del capuchón acrosomal (zona acrosomal sin teñir)

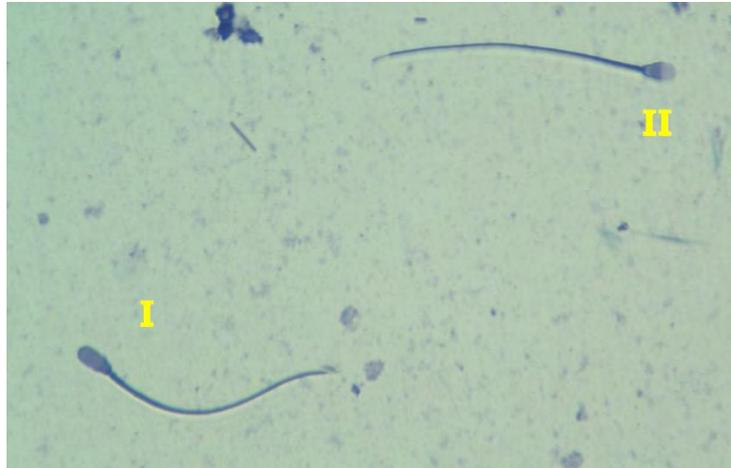


Foto 10. Evaluación de la integridad acrosomal en semen de llamas, Espermatozoides con presencia del capuchón acrosomal (I) y Espermatozoides con ausencia del capuchón acrosomal (II).

3.6.5. 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 (Jeyendran et al., 1984)

La solución hipoosmótica fue preparada por 0.0245 gr de citrato de sodio, 0.045 gr de fructosa y 10 ml de agua bidestilada, con una osmolaridad calculada de 50 mOsm/l. La solución formolada fue preparada de 1 ml de la propia solución hipoosmótica más 3 μ l de formaldehído al 40% según Vasquez et al., (2012).

- En un tubo eppendorf se colocó 100 μ l de solución hipoosmótica previamente temperado, luego con el uso de una micropipeta y tips se incubó 25 μ l de muestra de semen en el medio hipoosmótico por un 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 se puso 5 μ l de la muestra incubada sobre un portaobjetos, cubierto por un cubreobjetos fue evaluado en el microscopio BA310 Motic a un objetivo de 40X, se

hizo uso del software Motic Imagen Plus 2.0 ML para así contabilizar un mínimo de 200 espermatozoides por muestra.

Finalmente el conteo y clasificación de los espermatozoides fueron analizados en función a tres patrones de reacción, según Vásquez *et al.*, (2012).

- Espermatozoides con reacción fuerte (cola enrollada).
- Espermatozoides con reacción moderada (cola semienrollada).
- Espermatozoides sin reacción (cola recta).

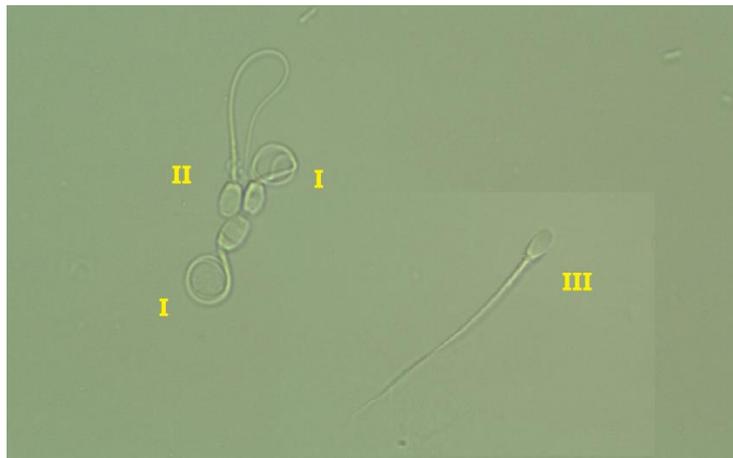


Foto 11. Evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática en semen de llamas, espermatozoides con reacción fuerte (I), espermatozoides con reacción moderada (II) y espermatozoides sin reacción (III).

3.7. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO (IFAE)

La evaluación del índice de fragmentación del ADN espermático colectado por electroeyaculación se realizó según el método de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD Test) observado en el microscopio BA310 de Motic en el objetivo 100X con base de aceite de inmersión, se tomó fotos en el microscopio para así dibujar el área del núcleo y área del halo para tal hecho se hizo uso del software Motic Imagen Plus 2.0 ML, de esa manera identificar los espermatozoides fragmentados y no fragmentados. Para lo cual se utilizó el protocolo establecido por HALOMAX- HALOTECH DNA®. El protocolo incluye la inmersión del semen en las láminas

de agarosa, refrigerado de las láminas de agarosa y retirado de las laminillas de las láminas de agarosa, tratamiento con la solución de lisis (Halomax[®]) y por último el protocolo de tinción con Diff Quik más el colorante Wright y su posterior lectura de las láminas en el microscopio BA310 Motic (Halosperm (Halotech SL, Madrid, España)).

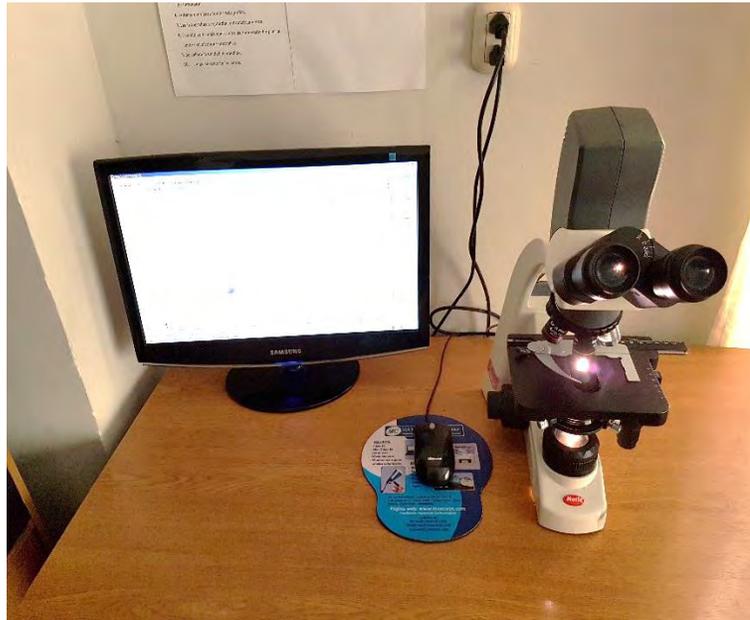


Foto 12. Evaluación del índice de fragmentación del ADN espermático observado en el microscopio BA310 de Motic.

3.7.1. Protocolo de fragmentación del ADN espermático

Según especificación del producto, se siguió el siguiente procedimiento:

Dentro del kit de fragmentación Halomax[®] se tomó un tubo eppendorf que contenía agarosa (500 μ l) de bajo punto de fusión, se puso en un flotador y se calentó en agua a 86°C durante 5 minutos hasta que la agarosa este completamente líquida.

Posteriormente se transfirió el tubo eppendorf de agarosa al baño seco a 37°C y se dejó por 5 minutos hasta que la temperatura de este se haya equilibrado.

Mientras tanto en otro tubo de eppendorf rotulado se colocó 25 µl de muestra fresca y diluida en caso de muestra refrigerada o descongelada, todas las muestras a una temperatura de 37°C, luego se le agregó 50 µl de agarosa y se pasó a mezclarla suavemente.

De la muestra de semen mezclada con la agarosa, con ayuda de una micropipeta de 10 µl y tips se colocó 2 µl en cada pocillo de la lámina portaobjetos del kit de fragmentación Halomax[®], posteriormente las láminas se cubrieron con cubreobjetos sin generar burbujas de aire.

Las láminas portaobjetos se deben mantenerse en posición horizontal a lo largo de todo proceso.

Para gelificar la agarosa y los espermatozoides queden inmersas en la agarosa, la lámina portaobjeto se llevó a refrigerarse dentro de la refrigeradora a 4°C por 5 minutos en posición horizontal

Concluido el tiempo de refrigeración se pasó a retirar los cubreobjetos de la lámina portaobjetos cuidadosamente, para facilitar este proceso se tuvo que calentar el portaobjeto ligeramente friccionado sobre nuestra piel.

La lámina portaobjetos fue incubada en 10 ml de solución de lisis (Halomax) mas 35 µl de agente reductor (Halomax) durante 5 minutos en una bandeja de incubación descartable, se realizó con mucho cuidado ya que la solución de lisis es muy toxica y tiene la función de retirar la membrana plasmática del espermatozoide y de esta manera dejar salir los bucles de ADN.

Después de la incubación se prosiguió con el lavado en agua destilada durante 5 minutos, para sacar el excedente de la solución de lisis.

Para la deshidratación se colocó etanol de 70 ° en una placa de Petri, donde se sumergió la lámina portaobjetos por dos minutos y posteriormente en etanol de 90° durante 2 minutos para fijar los espermatozoide en la agarosa, luego se dejó secar al aire libre sin polvos fuera del alcance de los rayos solares y a temperatura ambiente para su posterior tinción.

Para la tinción del portaobjetos se emplearon las tinciones Diff Quik y Wright. En la tinción Diff Quik I (EOSINA) se incubo por 6 minutos, luego por otros 6 minutos en Diff Quik II (azul de

metileno), posteriormente en la tinción Wrigth por 15 minutos y finalmente su lavado con agua destilada para quitar el exceso de Colorante Wrigth, se dejó secar a temperatura ambiente y su posterior lectura y evaluación en el microscopio BA310 de Motic, se tomó imágenes usando el software Motic Imagen Plus 2.0 ML , en el cual aleatoriamente se graficó, clasificó y contabilizó los espermatozoides fragmentados y no fragmentados, logrando identificar 500 espermatozoides por estado; de esta manera calcular el porcentaje de fragmentación y conocer el área del núcleo y halo en cada estado seminal.



Foto 13. Inmersión de láminas de agarosa en solución de lisis (Halomax), agente reductor (Halomax) y etanol al 70° y 90°



Foto 14. Inmersión de láminas de agarosa en la tinción Diff Quik y Wright.

3.7.2. Control positivo para la técnica SDC

El control positivo que se hizo para el presente trabajo de investigación fue de dos formas: Exposición de la muestra de semen a rayos UV durante 25 minutos y por 30 min en agua caliente a 85°C, estos tratamientos fueron efectivos para producir fragmentación del ADN espermático (presencia de halo en todos los espermatozoides). Se obtuvo el 80,98% de espermatozoides fragmentados o dañados (Nancy, 2015).

3.7.3. Patrones de evaluación de la fragmentación del ADN espermático en llamas

Se siguió los patrones de fragmentación del ADN espermático establecidos por Halomax[®], espermatozoides sin halo corresponden a espermatozoides no fragmentados o con ADN espermático intacto y espermatozoides con halo de dispersión de cromatina pertenecen a espermatozoides con ADN fragmentado.

Posado *et al.*, 2014 clasificaron los espermatozoides en dos categorías en función a la morfología obtenida en el halo espermático. Espermatozoides no fragmentados: Aquellos

espermatozoides sin halo y solo visible un núcleo de bordes lisos, y aquellos con bucles de ADN adheridos al core que muestran pequeños halos, es decir, con ligeras irregularidades y pequeñas trazas de halo alrededor del core. Espermatozoides fragmentados: Formación de halo mediano o grande alrededor de la cabeza del espermatozoide, producto de la difusión periférica de fragmentos de cromatina; cuando el tamaño de halo del ADN supera en más de la mitad del radio del core, se clasifica como halo grande, si hay un halo más pequeño al radio del core pero que excede las trazas se considera un halo mediano.

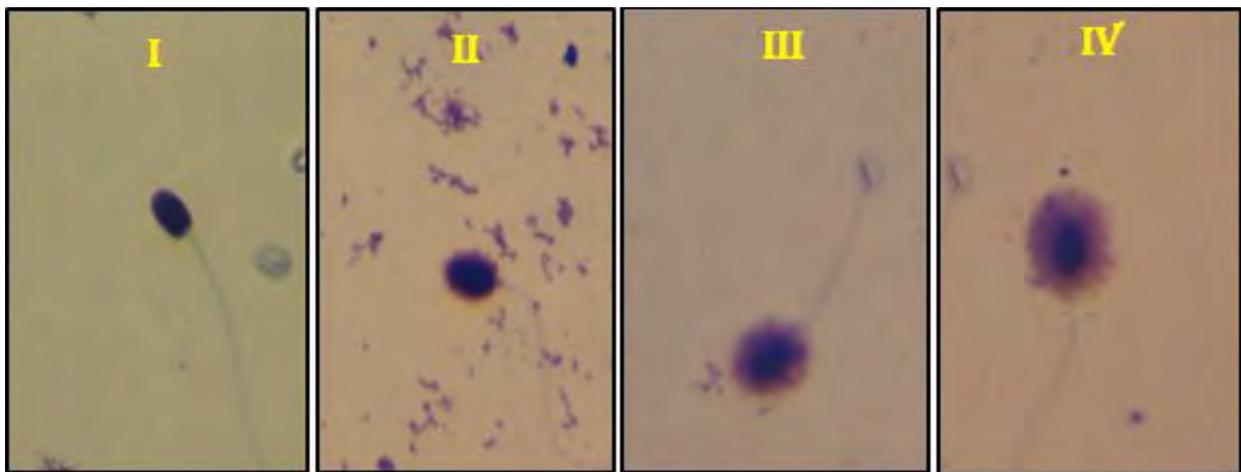


Foto 15. Patrones de fragmentación de ADN del espermatozoide de llamas sometidos a la técnica SCD. Espermatozoides con: (I) sin Halo, (II) Halo pequeño, (III) Halo mediano y (IV) Halo grande.

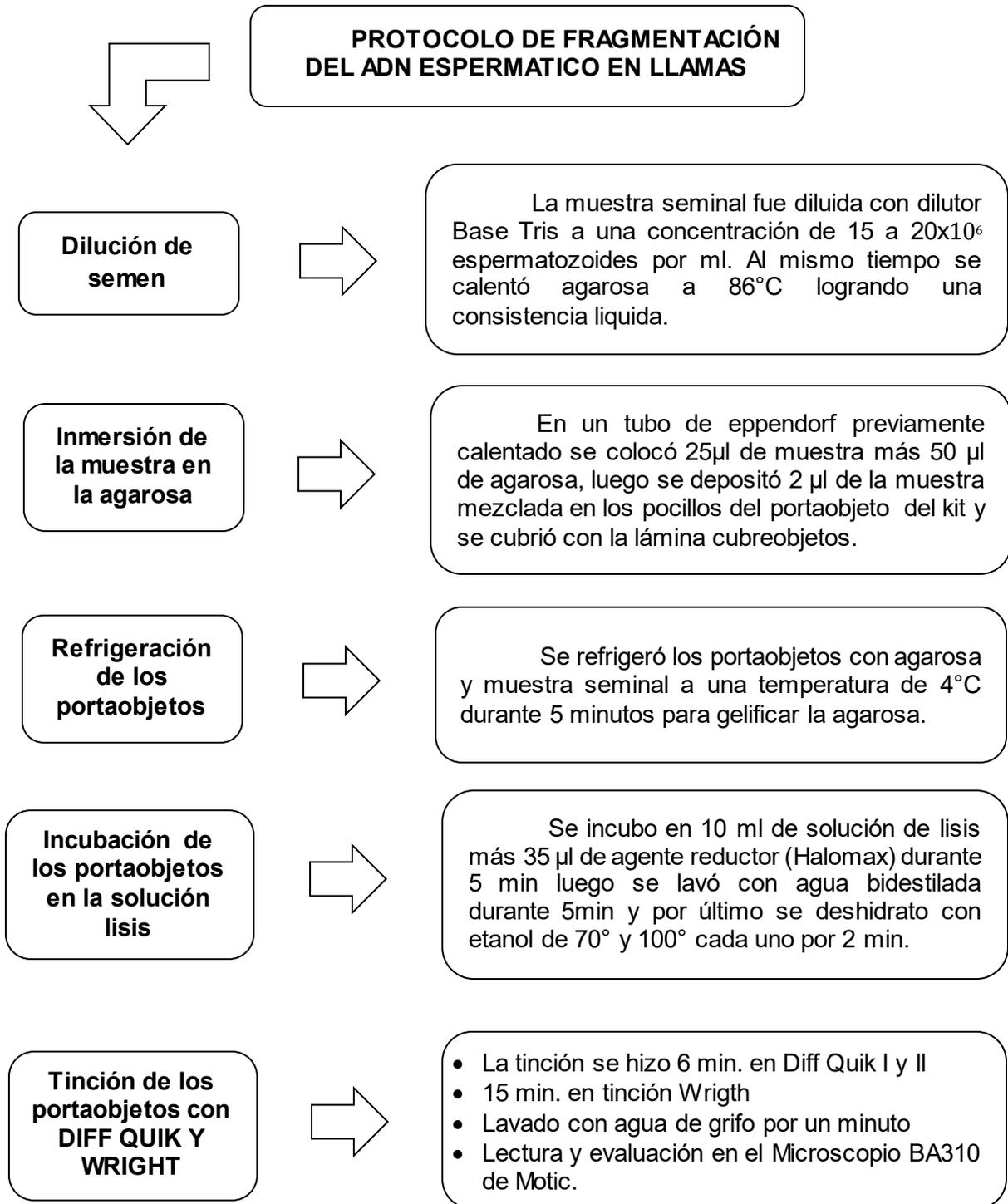


Figura 2. Flujograma de la fragmentación de ADN espermático en semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por EE.

3.7.4. De la comparación del porcentaje de índice de fragmentación de ADN espermático entre semen fresco, refrigerado y descongelado.

La comparación del porcentaje de índice de fragmentación ADN espermático entre semen fresco, refrigerado y descongelado fue de acuerdo al siguiente cuadro 18.

Cuadro 18. Criterio de evaluación del porcentaje del índice fragmentación de ADN espermático de semen de llama.

Fragmentación de ADN	Criterio de evaluación
< 15%	Bueno
15-30%	Medio
> 30%	Critico

Fuente: Halosperm (Halotech SL, Madrid, España)

3.8. PROCESAMIENTO DE SEMEN

Una vez obtenida la muestra de eyaculado y colocada en el baño maría seco, se procedió a añadirle una enzima llamada papaína para reducir su viscosidad (característica del semen de llama) esto para obtener una mayor motilidad en los espermatozoides, transcurrido los 20 min se le agrego 1 µl de inhibidor de papaína por cada 1 ml de muestra de semen para parar la acción de la papaína, luego de este procedimiento se procedió a evaluar todas las características mencionadas a continuación.

3.8.1. Degelificación

Por la alta viscosidad observada en el semen de llama, que evita su manejo en las diferentes pruebas de reproducción y crioconservación se procedió a degelificar las muestras, similar a lo descrito por (Kershaw-Young *et al.*, 2012).

Preparación de la papaína:

- Prepara en matraz esterilizado 25 ml de Talp.
- Luego agregar 1ml de solución madre de papaína.
- Se mezcló las sustancias con ligeros movimientos, concluida la mezcla para un mejor uso, se deberá vaciar la mezcla (papaína) a un tubo falcón de 50 ml.

Uso de la papaína:

- Después de la colecta se realizó los exámenes correspondientes en fresco incubado siempre a 37°C.
- Luego se agregó la papaína (1/2:1) (papaína: muestra espermática), luego se procede al incubarlo durante 20 minutos.
- Concluido el incubado se agrega el inhibidor de papaína 1µl por 1 ml de muestra, incubar durante 5 minutos.
- Seguidamente se centrifugó a 3000 rpm x 5 minutos.
- Luego se extrae el sobre nadante, para agregar el dilutor.

3.8.2. Dilución

Después de la evaluación de semen fresco, las muestras con una buena concentración y motilidad espermática fueron diluidos con dilutor base Tris (ver Anexo 1), donde a cada muestra se añadió el volumen apropiado hasta alcanzar una concentración adecuado para su evaluación.

El cálculo de la dilución fue determinado por la siguiente fórmula:

$$V_f = \frac{V_i * C_i}{15 * 10^6}; V_t = V_f - V_i$$

Dónde:

V_f : Volumen final de la muestra (en ml).

V_i : Volumen inicial de la muestra (en ml).

C_i : Concentración inicial de la muestra (en 10^6 espermatozoides/ml).

V_t : Volumen total de dilutor a agregar (en ml) a la muestra.

El dilutor base Tris fue agregado en 2 partes (50% de dilutor "A" y 50 % de dilutor "B"). El dilutor A fue previamente calentado en baño maría a 37 °C, para evitar el choque térmico de los espermatozoides y fue vertido lentamente por las paredes del tubo colector y luego homogenizado.

3.8.3. 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.

3.8.4. Adición del crioprotector

En este proceso el semen refrigerado colocado en un tubo colector rotulado y mantenido en refrigeración a 4 °C, se adicionó el dilutor "B" (ver anexo 1) a 4 °C con un nivel de 5% de glicerol, 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.

3.8.5. 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 que los espermatozoides entren en equilibrio con el crioprotector con el fin de evitar la cristalización en el congelado.

3.8.6. 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.

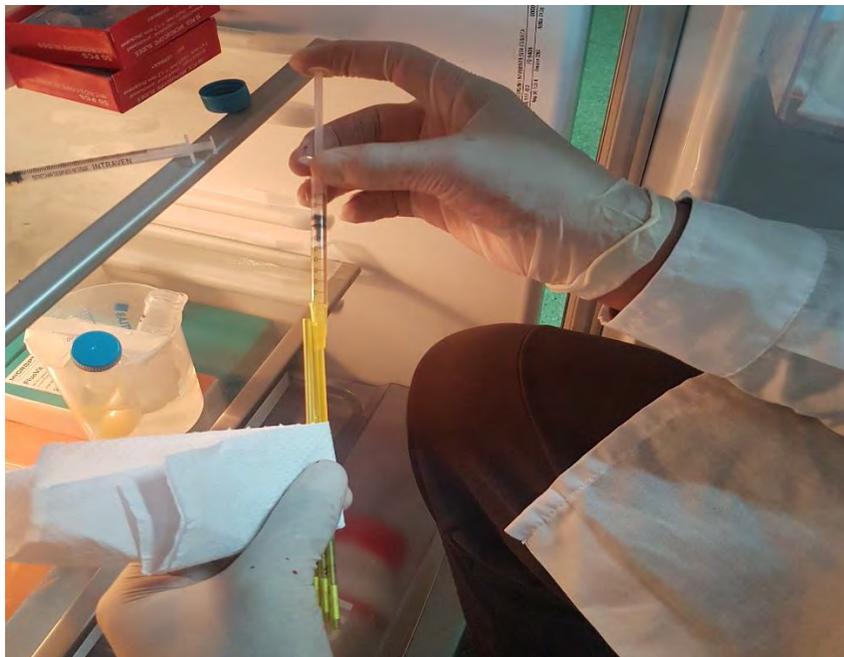


Foto 16. Empajillado de la muestra de semen de llamas

3.8.7. 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 el valor 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 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

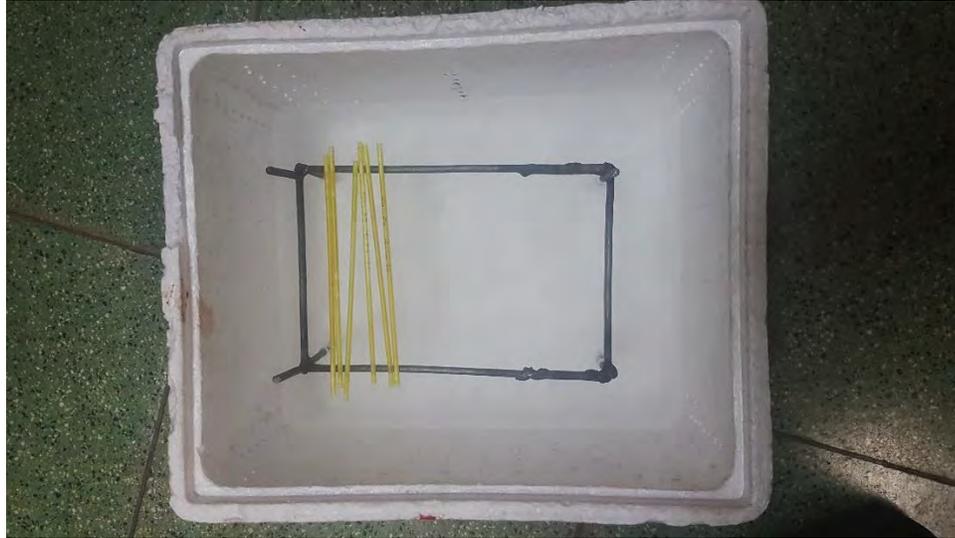


Foto 17. Congelación tipo horizontal de pajillas de semen en vapores de nitrógeno líquido y tanque de nitrógeno para almacenamiento.

3.8.8. Descongelado

La descongelación se hizo después una semana 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 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 30 segundos, para luego secarlos y hacer la respectiva evaluación microscópica.

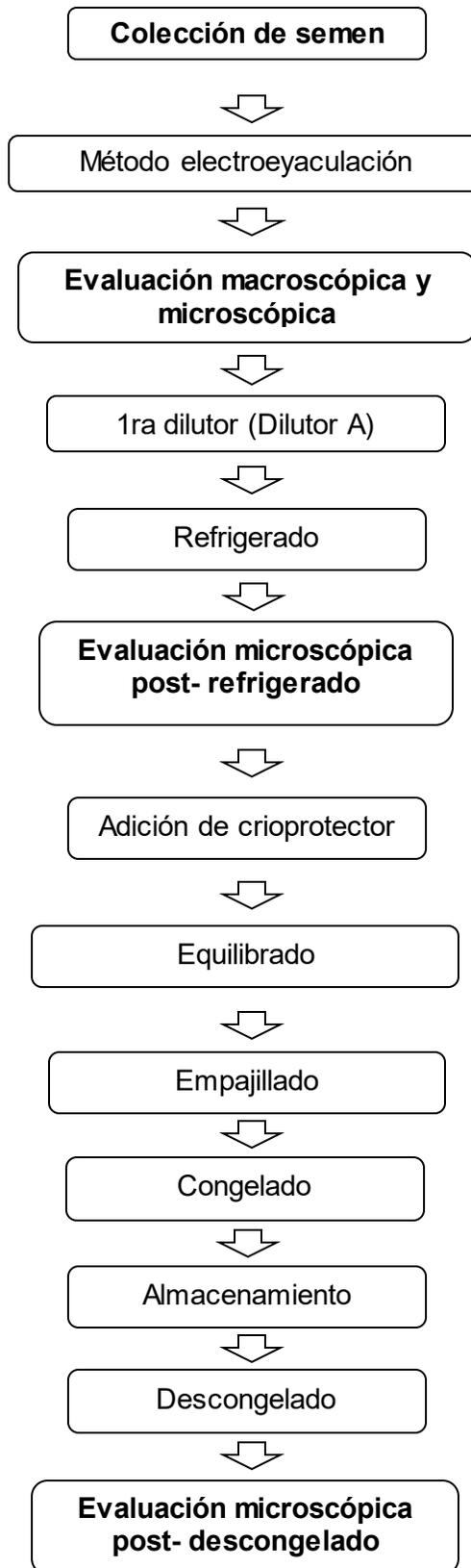


Figura 3. Flujograma resumen de la evaluación del semen de llama.

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de las características seminales tanto macroscópicas (volumen, color y pH) y microscópicas (concentración, motilidad, vitalidad, integridad acrosomal, morfometría, funcionalidad de la membrana plasmática e Índice de Fragmentación del ADN Espermático), fueron sometidos a las pruebas de homogeneidad de varianzas (test de Levene) y normalidad (test de Kolmogorov – Smirnov, y test de Shapiro Wilks), en este último caso según el número de datos. Se utilizó el paquete estadístico SAS v 8.0.

3.8.1. Para las características macroscópicas del semen

Para el volumen seminal, pH y filancia se aplicó estadística descriptiva con el procedimiento Univariate del SAS v 8.0, se determinó la media, desviación estándar, coeficiente de variabilidad y rango de variación (mínimo y máximo del eyaculado).

Con respecto al color seminal también se utilizó la estadística descriptiva, donde se determinó el porcentaje de colores, La evaluación de estas características macroscópicas del semen de llama se dio en un total de 20 eyaculados ($n = 5$, $r = 4$)

3.8.2. Para las características microscópicas del semen

Para evaluar las variables microscópicas de semen fresco, refrigerado y descongelado (motilidad, parámetros cinéticos de velocidad, vitalidad, integridad del acrosoma y funcionalidad de membrana) se aplicó la estadística paramétrica, al poseer homogeneidad de varianzas y distribución normal. Se utilizó el análisis de varianza con un diseño aleatorizado en bloques. La comparación de promedios se realizó con la prueba de Tukey y el modelo aditivo lineal empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_{ijk} + e_{ijk}$$

Dónde:

i = Estado de semen (3)

j = Animales (5)

k = Colectas (4)

Y_{ijk} = Es la observación de la *k*-ésima colecta de semen dentro del *j*-ésimo macho en el *i*-ésimo estado del semen

μ = Media poblacional

T_i = Es el efecto del *i*-ésimo estado de semen (tratamiento).

B_{ij} = Es el efecto de la *k*-ésima animal (bloques)

ε_{ijk} = Error experimental.

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

3.8.2.1. Índice de fragmentación del ADN espermático (IFAE)

Para la evaluación de datos de índice de fragmentación de ADN espermático, área del Halo y núcleo en semen fresco, refrigerado y descongelado se utilizó el análisis de varianza con un diseño aleatorizado en bloques y para la comparación de medias entre tipos de muestra seminal se utilizó la prueba de Tukey. El modelo aditivo lineal empleado para este parámetro microscópico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_{ijk} + S_{ij} + e_{ijkl}$$

Dónde:

i = Tratamientos (3)

j = Animales (5)

k = Colectas (4)

Y_{ijk} = Es la observación de la *k*-ésima colecta de semen dentro del *j*-ésimo macho en el *i*-ésimo estado del semen

μ = Media poblacional

T_i = Es el efecto del *i*-ésimo estado de semen (tratamiento)

B_{ijk} = Es el efecto del *j*-ésimo animal (bloques)

S_{ij} = Es el efecto de la *k*-ésima colecta

e_{ijk} = Error experimental.

Para determinar la relación entre los índice de fragmentación de ADN espermático (IFAE) entre los tipos de muestra seminal, porcentaje de vitalidad, integridad acrosomal y funcionalidad de la membrana espermático, se empleó la correlación de Pearson (Proc Corr), para estos cálculos estadísticos se utilizó el SAS.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL SEMEN

4.1.1. Características Macroscópicas

4.1.1.1. Color

El color del semen de llama colectada por electroeyaculación se muestra en cuadro 19, señalado por datos porcentuales.

Cuadro 19. Porcentaje de color observado en semen de llama obtenido por EE, N=20

Color	N	%
Blanco lechoso	7	35.0
Blanco lechoso claro	8	40.0
Blanco cristalino	5	25.0
Total	20	100

Para el color de semen de llama, el resultado obtenido en cuanto al color predominante fue diferente a lo reportado por Gallegos (2019) con 56.3 % de cristalino brillante, Ccoiso (2019) 80% de blanco cristalino, Rodriguez (2013) 73.4% de blanco lechoso y Valle (2013) 100 % de blanco lechoso. Estas diferencias se deberían probablemente al criterio de evaluación de cada autor o al el efecto animal.

4.1.1.2. Volumen seminal

El volumen obtenido de semen de llama colectado por el método de electroeyaculación se muestra en el cuadro 20.

Cuadro 20. Volumen, filancia y pH de semen de llama colectado por el método de EE, n=20

Variable	Media ± DS		CV	Mínimo	Máximo
Volumen (ml)	2.44	0.84	34.35	1.00	4.00
Filancia (cm)	2.54	0.61	24.20	1.44	3.64
pH	7.38	0.22	3.01	7.00	7.50

Los resultados obtenidos son inferiores a lo reportado por Gallegos (2019) con 3.8 ± 0.8 ml, Ccoiso (2019) 3.63 ± 1.64 ml, Carretero (2012) 2.8 ± 1.6 ml, pero superior a lo reportado por Rodriguez (2013) 1.6 ± 0.69 ml y Valle (2013) 0.25 ml, Las diferencias estarían sometidos al efecto animal, condiciones del medio ambiente y la frecuencia de colecta.

4.1.1.3. Filancia

El cuadro 20 también muestra el promedio de filancia de semen de llama colectado por el método de electroeyaculación. Para esta característica el valor obtenido a partir de la evaluación de 20 muestras es inferior al reporte de Ccoiso (2019) con 3.63 ± 0.93 cm de filancia y Gallegos (2019) 3.7 ± 0.64 cm, las diferencias podrían deberse al efecto animal.

4.1.1.4. Ph

El promedio PH de llamas colectadas por el método de electroeyaculación se muestra en el cuadro 20, La media del PH de semen de llamas es inferior a lo reportado por Gallegos (2019) y Ccoiso (2019) con valores de 7.0 ± 0.1 y 7.25 ± 0.48 respectivamente, pero superior a lo reportado por Valle (2013) con un valor de 7.41. Probablemente las diferencias numéricas se deban al instrumento de medida que cada autor aplicó.

4.1.2. Características microscópicas

4.1.2.1. Motilidad espermática

a. Motilidad de espermatozoides progresivos y no progresivos

El análisis de los resultados promedios de espermatozoides móviles progresivos (EMP) y no progresivos (EMNP) para semen fresco, refrigerado y descongelado, indica que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes estados de semen de llama, las muestras refrigeradas tienen mejor respuesta que los demás tratamientos, resultado que posiblemente se deba a la degelificación de la muestra refrigerada.

Cuadro 21. Motilidad espermática progresiva (EMP) y no progresiva (EMNP) en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas.

Etapa	EMP (%)		EMNP (%)	
	Media (%)	± DS	Media (%)	± DS
Fresco	2.29 a	1.94	33.56 a	17.65
Refrigerado	3.33 ab	3.42	37.83 a	23.28
Descongelado	1.15 b	0.71	17.61 b	12.48

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

Los valores de EMP y EMNP obtenidos en semen fresco, son inferiores a lo reportado por Fumuso et al., (2021) en ambos valores, Guiliano *et al.*, (2010) en EMP, Ccoiso et al., (2020) y Valle (2013) en EMNP, probablemente la diferencia con los dos primeros y el cuarto autor sea a la frecuencia de colecta, dilutor empleado, lugar de investigación y al efecto animal con cuatro autores; por otra parte, Rodríguez (2013) reportó valores inferiores de EMP y EMNP, la diferencia con el autor mencionado podría ser al afecto animal y a la condición medioambiental.

Flores *et al.*, (2021) y Ciprian *et al.*, (2019) quienes trabajaron en alpacas mostraron valores inferiores de EMP y ENMP en semen refrigerado y descongelado, las diferencias se deberían a la especie animal, dilutor y crioprotector empleado; de igual manera Fumuso et al., (2021) encontró un valor inferior de EMP pero superior de EMNP en semen refrigerado; y semen descongelado reporto un valor superior para EMP e inferior para EMNP; por otro lado, Fumuso

et al., (2020) halló valores superiores para EMP y EMNP en semen descongelado. Las diferencias podrían deberse al dilutor y crioprotector usado, protocolo de criopreservación y a factores medioambientales.

b. Motilidad total

Para los valores medios de motilidad espermática en las etapas de fresco, refrigerado y descongelado en semen de llama, no se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el semen fresco y refrigerado, pero si con la etapa de descongelado. La etapa de refrigerado tiene una mejor respuesta a las otras dos etapas, posiblemente a que el proceso de refrigeración produce cambios en las membranas de los espermatozoides y estos cambios predisponen a las células a reaccionar espontáneamente, fenómeno que se ha denominado "capacitación espermática" (Neild *et al.*, 2003).

Cuadro 22. Motilidad espermática (EMP + EMNP) en semen fresco, refrigerado descongelado de llamas

Etapas	Media (%) ± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Fresco	35.85 a 17.97	50.13	6.92	69.78
Refrigerado	41.16 a 24.32	59.10	6.64	80.99
Descongelado	18.76 b 12.33	65.73	6.50	52.00

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

Para las muestras de espermatozoides frescos, Fumuso *et al.*, (2021), Gallegos *et al.*, (2021) y Ccoiso *et al.*, (2020) encontraron una motilidad superior a nuestro estudio, la diferencia posiblemente esté en la época de colecta, condiciones medioambientales con el primer autor y el efecto animal con todos los autores; mientras, Giuliano *et al.*, (2019), Carretero *et al.*, (2014) y Rodriguez (2013) obtuvieron resultados inferiores, la metodología de evaluación y el uso de degelificante serían las posibles diferencias con el primer y segundo autor y al efecto animal en

todos los autores. En semen refrigerado, Fumuso *et al.*, (2021) mostró valor superior; mientras, Giuliano *et al.*, (2019) y Carretero *et al.*, (2014) mostraron valores inferiores a nuestro estudio. Diferencias que posiblemente sean al dilutor empleado y protocolos de refrigeración. Fumuso *et al.*, (2021) y Carretero *et al.*, (2014) en semen descongelado reportaron datos inferiores, mientras, Fumuso *et al.*, (2020) reportó un dato superior al nuestro. Probablemente estas diferencias en semen descongelado se deban al dilutor, crioprotector empleado y protocolo de congelación.

c. Parámetros de velocidad

Los resultados medios obtenidos de los parámetros de velocidad (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF) se muestran en los cuadros 23 y 24. Existe diferencia significativa ($p < 0.05$) en el análisis estadístico entre semen fresco, refrigerado y descongelado para los parámetros de velocidad VCL, LIN, WOB, ALH y BCF; mientras no se halló diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos para VSL, VAP Y STR entre los tres tipos de muestra seminal.

En semen fresco los valores obtenidos son mayores a los reportes de Rodríguez (2013) en las variables VCL, VSL, VAP, STR, ALH y BCL pero inferiores en LIN, WOB. Mientras, Ccoiso *et al.*, (2020), en todas las variables mostro valores superiores a los nuestros.

Para semen refrigerado, con respecto a nuestros datos, Flores *et al.*, (2021) quien trabajo con alpacas reporta valores mayores de VCL, VSL, VAP, STR Y WOB y menor de LIN. Mientras, en semen descongelado utilizando DMFA al 4% como crioprotector, reportó valores menores de VCL; VSL y WOB pero mayores de VAP, LIN y STR. Por lo que esta diferencia sea posiblemente al tipo de enzima degelificante, dilutor, crioprotector empleado y a la especie animal.

Cuadro 23. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Parámetros de velocidad	VCL		VSL		VAP		LIN	
	Media (µm/s)	± DS	Media (µm/s)	± DS	Media (µm/s)	± DS	Media (%)	± DS
Fresco	62.70 a	17.49	12.37 a	3.1067	27.33 a	5.8432	20.86 b	6.6749
Refrigerado	44.43 b	11.79	12.06 a	3.9075	25.68 a	6.3635	27.42 a	6.4146
Descongelado	42.74 b	11.269	10.63 a	2.8102	23.67 a	5.3628	25.08 a	3.3479

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio de desplazamiento; LIN: Porcentaje de linealidad.

Cuadro 24. Parámetros de velocidad de espermatozoides en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Parámetros de velocidad	STR		WOB		ALH		BCF	
	Media (%)	± DS	Media (%)	± DS	Media (µm)	± DS	Media (Hz)	± DS
Fresco	45.57 a	9.0438	44.85 b	7.2785	1.70 a	0.9669	3.44 a	2.4451
Refrigerado	47.14 a	9.7189	58.28 a	6.8048	1.34 a	0.8848	2.35 a	1.8414
Descongelado	44.78 a	4.9288	56.38 a	8.3408	0.71 b	0.6549	0.91 b	0.8925

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza; BCL: Frecuencia de batido.

4.1.2.2. Concentración espermática

La media de las concentraciones de semen fresco de llamas colectadas por el método de electroeyaculación se muestra en el cuadro 25.

Cuadro 25. Concentración espermática (unidad) en semen fresco de llamas colectadas por EE.

Variable microscópica	Media (10 ⁶ spz/ml)	± DS	% CV	Mínimo	Máximo
Fresco	65.26	24.32	37.27	33.1	146.5

La media de la concentración espermática de semen fresco por el método de electroeyaculación es superior al reporte de Giuliano *et al.*, (2019) quien utilizó colagenasa como enzima degelificadora y Laruta, *et al.*, (2016) jugo de piña, por tanto la diferencia podría deberse al uso de enzima degelificadora condición medioambiental en ambos autores y metodología de evaluación con el primer autor; mientras, Gallegos *et al.*, (2021), Ccoiso *et al.*, (2020) y Rodríguez., (2013) reportaron valores superiores al nuestro. La diferencia en los reportes se debería al factor animal y al tiempo de colecta con el último autor.

4.1.2.3. Vitalidad Espermática

En el análisis de medias de los resultados de espermatozoides vivos en semen fresco, refrigerado y descongelado, se determinó que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el semen fresco y refrigerado pero sí con el descongelado, los datos correspondientes a esta característica se muestran en el cuadro 26.

Cuadro 26. Vitalidad espermática en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Estado	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Fresco	66.50 a	12.00	18.05	41.41	81.94
Refrigerado	56.91 a	13.19	23.18	31.43	78.10
Descongelado	36.89 b	14.94	40.49	14.55	64.62

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

Los resultados obtenidos son superiores a lo reportado por Fumuso *et al.*, (2021) quien uso Isotiocianato de fluoresceína — *Arachis aglutinina hipogaea* combinado con yoduro de propidio para su evaluación, Giuliano *et al.*, (2019) tinción de fluorocromos diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (PI) ambos en semen fresco, refrigerado y descongelado. La diferencia de valores con ambos autores podría deberse a la tinción empleado en la evaluación, edad de los animales y condiciones medioambientales. Gallegos *et al.*, (2021), y Ccoiso *et al.*, (2020) también reportaron valores inferiores usando eosina y nigrosina en semen fresco. El factor animal podría ser la diferencia de valores con los dos autores. Por otro lado, Fumuso *et al.* (2019) usando isotiocianato de fluoresceína- *Arachis hypogaea*/yoduro de propidio (FITC - PNA/PI) halló un valor igual al nuestro en semen fresco pero inferior en semen descongelado al igual que Fumuso *et al.*, (2018), la diferencia posiblemente se deba a la tinción empleada por el autor; Laruta, *et al.*, (2016) también en semen descongelado reportó un valor superior usando eosina y nigrosina en La Paz-Bolivia, la diferencia estaría en las condiciones medioambientales y factor animal. En semen descongelado, nuestro valor fue mayor al reporte de Aller *et al.*, (2003) quien usó Sulfato de estreptomina y dimetilsulfóxido en el dilutor. Por lo que la diferencia posiblemente se deban al tipo de dilutor empleado y lugar de investigación.

4.1.2.4. Morfometría espermática

Los resultados de morfometría espermática de las variables de cabeza y pieza intermedia, para muestras evaluadas en semen fresco, refrigerado y descongelado se muestran en los cuadros 27 y 28. Al hacer la comparación de medias entre células espermáticas evaluadas en la etapa fresco, refrigerado y descongelado no se observó diferencias significativas ($p < 0.05$) para las variables ancho, área, elipticidad, rugosidad y elongación de la cabeza y ancho de la pieza intermedia, indicando que existe una ligera variación en el tamaño de la cabeza en todo el proceso de criopreservación.

Cuadro 27. Morfometría espermática de las variables de cabeza en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

		CABEZA								
		Longitud	Ancho	Área	Perímetro	Acros.	Elipt. *	Rugos. *	Elong. *	Regul. *
		(um)	(um)	(um²)	(um)	(%)	(#)	(#)	(#)	(#)
Fresco	Prom.	5.82 a	3.24 a	15.54 a	16.68 a	45.21 b	1.81 a	14.46 a	0.28 a	0.96 a
	± DS	0.27	0.14	1.12	0.74	3.50	0.09	28.09	0.02	0.01
Refrig.	Prom.	5.66 b	3.20 a	15.20 a	16.22 ab	51.64 a	1.78 a	19.67 a	0.28 a	0.94 b
	± DS	0.22	0.13	0.82	0.68	3.42	0.10	20.42	0.02	0.01
Desc.	Prom.	5.64 b	3.21 a	15.24 a	15.99 b	50.65 a	1.77 a	16.74 a	0.27 a	0.93 b
	± DS	0.21	0.15	0.79	0.51	3.86	0.10	20.43	0.03	0.02

Desc.: Descongelado Acros: Acrosoma Elipt: Elipticidad Rugos: Rugosidad Elong: Elongación Regul: Regularidad *: Variables no dimensionales

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

Cuadro 28. Morfometría espermática de las variables de la pieza intermedia en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

PIEZA INTERMEDIA					
		Ancho (um)	Area de P.I. (um²)	Dist. Inserción (um)	Ang. Inserción (°)
Fresco	Media	1.23 a	3.76 a	0.23 a	9.65 a
	± DS	0.11	0.40	0.06	4.61
Refrig.	Media	1.23 a	3.15 b	0.21 ab	7.43 b
	± DS	0.10	0.42	0.03	1.16
Desc.	Media	1.21 a	3.21 b	0.20 b	7.39 b
	± DS	0.09	0.54	0.02	1.30

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

También, el cuadro 27 muestra que el valor promedio de la longitud, ancho, área y la circunferencia de la cabeza de los espermatozoides del semen fresco son mayores que el valor promedio de los espermatozoides refrigerados y descongelados.

Los parámetros de morfometría espermática de la cabeza y pieza intermedia determinadas en este estudio son superiores al reporte de Gallegos (2019) y Rodríguez (2013) pero inferiores en los parámetros de acrosoma de la cabeza y ancho de la pieza intermedia, ambos autores utilizaron el Equipo Integrated Sperm Analysis System (ISAS) v 1.1 y microscopio de contraste de fases UB200i, por lo que la diferencia estaría en el efecto animal; por otro lado, nuestros valores son inferiores al reporte brindado por Casaretto *et al.*, (2012) quien uso una cámara Leica DC180 para capturar las imágenes de las cabezas de los espermatozoides, la diferencia podría deberse a la metodología de evaluación y condición medioambiental.

4.1.2.5. Funcionalidad de la membrana espermática

Al analizar la media de la funcionalidad de la membrana espermática en semen fresco, refrigerado y descongelado, se determinó que existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los tres estados de semen, por otro lado se observa que hay mayor porcentaje de reacción total de la funcionalidad de membrana espermática en semen fresco y refrigerado comparado con el descongelado (Cuadro 29), esto debido a la disminución considerable de la funcionalidad de la membrana espermática durante el proceso de criopreservación, principalmente al efecto de la temperatura y la presión osmótica que ocasionan cambios en la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el líquido intracelular (Carretero *et al.*, 2014).

Cuadro 29. Reacción total de la funcionalidad de membrana espermática en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por electroeyaculación.

Estado	Media (%)	± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Fresco	53.93 a	27.27	50.57	15.53	88.27
Refrigerado	52.84 ab	23.10	43.72	19.91	91.98
Descongelado	40.99 b	13.23	32.28	16.26	65.40

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

Los resultados obtenidos en semen fresco son superiores a Ccoiso *et al.*, (2020) y Rodriguez (2013) valores obtenidos en el CICAS – La Raya, la diferencia con los dos autores estaría en el afecto animal; también es superior al de Giuliano *et al.*, (2019) y Carretero *et al.*, (2014) ambos trabajos realizados en Buenos Aires – Argentina, por lo que la diferencia posiblemente se deba a las condiciones medioambientales. Con respecto al semen refrigerado, nuestro valor es superior al de García *et al.*, (2017) quien uso una solución hipoosmótica con 100 mOsm, el cual sería la diferencia de valores; también superior al de Giuliano *et al.*, (2019) y Carretero *et al.*, (2016) con 50 mOSm y uso de Colagenasa como degelificante en ambos autores, la posible diferencia con los dos últimos autores estaría en el empleo de colágenasa, condiciones medioambientales y época de colecta. En semen descongelado, Carretero *et al.*, (2014) y Zirena (2014) usando Glicerol como crioprotector en llamas y Ccalta *et al.*, (2017) Dimetilformamida en alpacas mostraron valores inferiores al nuestro. La diferencia con los dos primeros autores en semen descongelado posiblemente se deba al protocolo de congelación y condiciones medioambientales; con la última, al uso del crioprotector y especie animal.

4.1.2.6. *Integridad acrosomal*

No se ha encontrado diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las muestras de semen fresco, refrigerado y descongelado (cuadro 30).

Cuadro 30. Integridad Acrosomal de los espermatozoides de llama colectadas por electroeyaculación.

Estado	Media (%) ± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Fresco	89.32 a 6.89	7.72	69.47	97.70
Refrigerado	84.60 a 5.58	6.59	72.49	93.99
Descongelado	83.10 a 17.34	20.86	62.19	142.74

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

Los datos obtenidos sobre Integridad acrosomal de los espermatozoides de llama con respecto al semen fresco son superiores a los reportes de Gallegos *et al.*, (2021), Ccoiso *et al.*, (2020), Carretero *et al.*, (2014) y Carretero *et al.*, (2015) quienes usaron la tinción Coomassie blue para la evaluación de la Integridad acrosomal, la diferencia con los dos primeros autores estaría en el efecto animal y a condiciones medioambientales con los dos últimos. Por otro lado, también en semen fresco Fumuso *et al.*, (2019) y Fumuso *et al.*, (2014) usando la tinción FITC-PNA hallaron valores inferiores al nuestro, por lo que la diferencia posiblemente se deba al tipo de tinción y condiciones medioambientales. En semen refrigerado empleando dimetilformamida, tanto como Giuliano *et al.*, (2012) quien uso colagenasa en llama y Calta, (2017) colesterol en alpaca reportaron valores inferiores al nuestro, la posible diferencia con ambos autores estaría en la utilización del dilutor y dimetilformamida. Fumuso *et al.*, (2019) y Giuliano *et al.*, (2012) quienes emplearon Colagenasa y dimetilformamida y Choez *et al.*, (2014) leche descremada y Glicerol en la congelación de semen de llama, reportaron valores inferiores en semen descongelado. Esta diferencia posiblemente se debe al tipo de dilutor y crioprotector.

4.2. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO

4.2.1. Áreas de núcleo y halo del índice de fragmentación del ADN espermático (IFAE)

La media del área de núcleo y halo del IFAE en llamas colectadas por electroeyaculación, se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 31. Parámetros generales de área de núcleo y halo en semen de llama fresco, refrigerado y descongelado colectadas por electroeyaculación (n = 500 espermatozoides por estado).

Estado	Área del núcleo (μm^2)	Área del halo (μm^2)
Fresco	29.37 \pm 3.84 b	50.92 \pm 7.65 b
Refrigerado	29.71 \pm 3.91 ab	51.13 \pm 6.34 b
Descongelado	30.16 \pm 3.84 a	52.80 \pm 9.96 a

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

En semen fresco Rodríguez (2013) y Carretero *et al.*, (2012) reportaron valores superiores de núcleo y halo en relación a nuestro estudio, que se debería en ambos casos a la metodología de evaluación del IFAE y a instrumentos de medición; mientras Huanca, (2015) en semen fresco de alpaca reporto un valor inferior, por lo que la especie animal sería la principal diferencia; no se encontraron reportes sobre las áreas del núcleo y halo en la refrigeración del semen. Al descongelado Rodríguez (2013), mostró valores inferiores para ambas áreas, que se debería a lo indicado líneas arriba.

La media de los parámetros del índice de fragmentación de ADN espermático según el test de SCD en llamas colectadas por electroeyaculación en espermatozoides no fragmentados o normales se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 32. Parámetros de área de núcleo y halo en espermatozoides no fragmentados en semen de llama fresco, refrigerado y descongelado colectadas por EE (n=número de espermatozoides).

Estado	n	Área del núcleo (μm^2)	Área del halo (μm^2)
Fresco	478	29.42 \pm 3.87 b	47.66 \pm 5.14 a
Refrigerado	469	29.76 \pm 3.94 ab	48.26 \pm 5.06 a
Descongelado	467	30.24 \pm 3.84 a	46.57 \pm 4.71 b

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

Con respecto al semen fresco, Huanca, (2015) en alpaca reporta un valor inferior de Área de núcleo y halo; por lo que esta diferencia sea posiblemente al método de evaluación, especie animal y factores propios del animal. En semen refrigerado y descongelado no se encontró información con respecto al área de núcleo y halo en espermatozoides no fragmentados

La media de los parámetros del índice de fragmentación de ADN espermático según el test de SCD en llamas colectadas por electroeyaculación en espermatozoides fragmentados o anormales se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 33. Parámetros de área de núcleo y halo en espermatozoides fragmentados en semen de llama fresco, refrigerado y descongelado colectadas por EE (n=número de espermatozoides).

Estado	n	Área del núcleo (μm^2)	Área del halo (μm^2)
Fresco	22	28.31 \pm 3.01 b	60.26 \pm 5.71 b
Refrigerado	31	28.95 \pm 3.33 a	56.11 \pm 5.19 c
Descongelado	33	28.74 \pm 3.72 a	64.14 \pm 6.92 a

En espermatozoides fragmentados en semen fresco con relación al área de núcleo y halo, Huanca, (2015) en alpaca reporta un valor inferior a nuestro estudio, por lo que la diferencia sea posiblemente al método de evaluación y especie animal. En semen refrigerado y descongelado no se encontró información con respecto al área de núcleo y halo en espermatozoides fragmentados

4.2.2. Determinación del índice de fragmentación del ADN espermático en llamas.

La media de los patrones del Test de SCD determinados en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por electroeyaculación se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 34. Patrones de dispersión de cromatina espermática (SCD) (sin halos, pequeños, medianos y grandes) observados en los espermatozoides de semen llama.

Estado de semen	Sin Halo (%)	Halo pequeño (%)	Halo Mediano (%)	Halo Grande (%)
Fresco	83.41 ± 1.11	12.22 ± 1.54	3.74 ± 0.53	0.63 ± 0.43
Refrigerado	83.07 ± 1.45	10.73 ± 1.37	6.02 ± 0.30	0.18 ± 0.22
Descongelado	81.40 ± 1.09	12.04 ± 1.71	2.03 ± 0.17	4.53 ± 0.17

Estos porcentajes fueron evaluados en un total de 20 eyaculados y 1500 espermatozoides (n = 5, r = 4). Los resultados de la media del índice de fragmentación del ADN espermático (IFAE) en semen de llamas determinadas en este estudio (sin halo + halo pequeño) se muestran en el siguiente cuadro. Se determinó que no existen diferencias significativas (p<0.05) entre los tipos de semen de llamas.

En semen Fresco, Carretero *et al.*, (2016), Carretero *et al.*, (2014), y Carretero *et al.*, (2012) quienes usaron colagenasa en un medio de albúmina bovina sérica (H-TALP-BSA) y Rodríguez (2013) reportaron valores inferiores al nuestro en espermatozoides sin halo y halo mediano; sin embargo, estos mismos autores hallaron valores superiores en espermatozoides con halo pequeño y grande. Estas diferencias podrían ser al degelificante y la tinción azul de toluidina (TB) empleado por los tres primeros autores y efecto animal con respecto a Rodríguez (2013). En semen refrigerado, Carretero *et al.*, (2016) mostro valores superiores en espermatozoides con halo pequeño, mediano y grande, pero inferior en espermatozoide sin halo y Carretero *et al.*, (2014) obtuvo datos inferiores en espermatozoides sin halo, halo pequeño y mediano pero superior en halo grande. La diferencia con ambos autores podría ser a la lactosa que usaron en el dilutor. Carretero *et al.*, (2014) en semen descongelado reporta valores

inferiores de espermatozoides sin halo y halo pequeño, pero superiores de halo mediano y grande; mientras, Rodríguez (2013) también en semen descongelado halló valores inferiores de halo pequeño y mediano y superiores de halo grande y sin halo. Las diferencias con los dos autores se indican en líneas anteriores.

Cuadro 35. Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de llama

Estado	Media (%) ± DS	% CV	Mínimo (%)	Máximo (%)
Fresco	4.37 a 5.33	122.01	0.00	16.29
Refrigerado	6.21 a 6.65	107.11	0.00	19.38
Descongelado	6.57 a 6.55	99.85	0.00	21.36

Los resultados obtenidos en semen fresco de llama, Carretero *et al.*, (2020), Carretero *et al.*, (2015), Carretero *et al.*, (2014), Carretero *et al.*, (2012) y Fumuso *et al.*, (2019) mostraron valores superiores a nuestro estudio, las posibles diferencias con los autores mencionados podría ser al uso de la tinción azul de toluidina (TB) que emplearon para evaluar el IFAE y condiciones medioambientales, así mismo, Rodríguez, (2013) en semen fresco y descongelado halló un valor superior, principalmente la diferencia se daba al efecto animal. Así mismo, en semen refrigerado y descongelado se reportó valores superiores por Carretero *et al.*, (2014) quien uso Glicerol como crioprotector y Fumuso *et al.*, (2019) Dimetilformamida, además que ambos autores usaron colagenasa en un medio de H-TALP-BS, lactosa en el dilutor y tinción azul de toluidina (TB) para evaluar el IFAE, los cuales serían las posibles causas en la diferencia de valores.

4.2.3. Comparación de índice de fragmentación de ADN espermático entre los tipos de semen de llama

Cuadro 36. Índice de fragmentación de ADN espermático en llamas.

Estado	Espermatozoides fragmentados	Espermatozoides no fragmentados	Criterio de Evaluación
Fresco	4.37 ± 5.33 a	95.63 ± 5.33 a	Bueno
Refrigerado	6.21 ± 6.65 a	93.80 ± 6.65 a	Bueno
Descongelado	6.57 ± 6.55 a	93.44 ± 6.55 a	Bueno

Al comparar la media del índice de fragmentación de ADN espermático entre el semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas estas no mostraron diferencias estadística ($p < 0.05$). Mostrando el semen refrigerado y descongelado con mayor porcentaje de índice de fragmentación de ADN espermático en relación a al semen fresco. Se concluye que el plasma seminal cumple un rol muy importante en la congelación de os espermatozoides, debido a que es un elemento que conserva el estado de la cromatina y la integridad de ADN espermático (Giuliano, 2008). Por otro lado el protocolo de criopreservacion estaría bien empleada, ya que al congelar el semen no generaría aumento de los índices de fragmentación de ADN del espermatozoide.

4.3. CORRELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN DE ADN ESPERMÁTICO, VITALIDAD, INTEGRIDAD ACROSOMAL Y FUNCIONALIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA

En los siguientes cuadros se muestra la correlación que se muestra entre el índice de fragmentación de ADN espermático y vitalidad (cuadro 37), integridad acrosomal (cuadro 38) y funcionalidad de la membrana espermática (cuadro 39).

Cuadro 37. Correlación entre el porcentaje de espermatozoides fragmentados y porcentaje de vitalidad en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectado por EE.

Estado	R	P
Fresco	-0.34529	0.1359
Refrigerado	0.18084	0.4455
Descongelado	-0.28805	0.2181

Se observa una baja correlación negativa entre el porcentaje IFAE y vitalidad en semen fresco y descongelado; el cual indica, mientras el porcentaje de espermatozoides fragmentados se incrementa, el porcentaje de vitalidad disminuye.

Cuadro 38. Correlación entre el porcentaje de espermatozoides fragmentados y porcentaje de integridad en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectado por EE.

Estado	R	P
Fresco	0.04108	0.8635
Refrigerado	0.51833	0.0192
Descongelado	-0.02628	0.9124

No se tiene una correlación entre el porcentaje de espermatozoides fragmentados e integridad acrosomal en semen fresco y descongelado; mientras, en semen refrigerado se tiene una mediana correlación positiva ($r \geq 0.50$), eso significa, mientras el porcentaje de espermatozoides fragmentados va incrementando, moderadamente también el porcentaje de integridad acrosomal.

Cuadro 39. Correlación entre el porcentaje de espermatozoides fragmentados y porcentaje de funcionalidad en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectado por EE.

Estado	R	P
Fresco	0.10427	0.6618
Refrigerado	0.35433	0.1253
Descongelado	-0.26158	0.2653

Se ha observado una correlación positiva baja entre el porcentaje IFAE y funcionalidad de la membrana espermática en semen refrigerado; el cual nos indica, si el porcentaje de espermatozoides fragmentados va incrementándose, mesuradamente también el porcentaje de funcionalidad de la membrana espermática. Lo contrario sucede en la baja correlación negativa en semen descongelado.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. No se hallaron diferencias significativas ($p>0.05$) para vitalidad entre el semen fresco y refrigerado; tampoco para la funcionalidad de la membrana espermática e integridad acrosomal en los tres tipos de semen; todas las variables evaluadas decrecen en el proceso de criopreservación. Se encontró diferencias significativas ($p<0.05$) en los parámetros cinéticos de VCL, LIN, WOB, ALH y BCF, en los tres tipos de semen evaluados. Se halló diferencias significativas ($p<0.05$) en las variables morfométricas de longitud, perímetro, regularidad de la cabeza, porcentaje de acrosoma; área, distancia y ángulo de Inserción de pieza intermedia, las que disminuyen en el proceso de criopreservación.
2. No se encontró diferencias significativas ($p>0.05$) para el índice de fragmentación del ADN espermático (IFAE) en el proceso de criopreservación de semen de llama.
3. Se halló una correlación mediana positiva (0.51833) entre la integridad acrosomal y el IFAE en el semen refrigerado ($p<0.05$); las demás correlaciones son bajas y no significativas ($p>0.05$).

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

- 1.** Determinar el índice de fragmentación del ADN espermático de semen de llamas durante el proceso de criopreservación colectado por otros métodos de colecta como vagina artificial, post copula o desviación del conducto deferente.
- 2.** Determinar el índice de fragmentación de ADN espermático por otros métodos de colecta en un mismo animal para eliminar el efecto animal.
- 3.** Evaluar y determinar el IFAE en llamas con fertilidad comprobada y en llamas con fertilidad cuestionable, para así determinar el IFAE aceptable o tolerable en llamas.
- 4.** Se recomienda utilizar el método electroeyaculación para la colección de semen en llamas porque el semen es limpio, completo y menor porcentaje de daño de la cromatina espermática.
- 5.** Determinar las correlaciones o asociaciones entre las características seminales microscópicas y el índice de fragmentación del ADN espermático de llama en otros métodos de colecta de semen de llamas.
- 6.** Contrastar los Índices de Fragmentación del ADN Espermático reportados en este estudio con trabajos futuros, realizando inseminaciones tanto con semen fresco, refrigerado y descongelado y así determinar la tasa de preñez en función al IFAE.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, A., & Allamaneni, S. S. (2004). The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. A review. *Minerva ginecologica*, 56(3), 235–245.
- Alarcón B, Virgilio, García V, Wilber, & Bravo, P. W. (2012). Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(1), 58-64. Recuperado en 15 de noviembre de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000100007&lng=es&tlng=es.
- Aller, JF, Rebuffi, G., Cancino, AK & Alberio, R. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (Lama Glama). *Archivos De Zootecnia*, 52 , 15-23.
- Aravindan, G. R., Bjordahl, J., Jost, L. K., & Evenson, D. P. (1997). Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. *Experimental cell research*, 236(1), 231–237. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3719>
- Argañaraz, M. E., Apichela, S. A., Zampini, R., Vencato, J., & Stelletta, C. (2015). Biochemical and protein profile of alpaca (*Vicugna pacos*) uterine horn fluid during early pregnancy. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 50(1), 121–128. <https://doi.org/10.1111/rda.12460>
- 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 óptimo del equilibrado con tres dilutores en el congelamiento de semen de alpaca (*Lama pacos*). Tesis FAZ-UNSAAC. Cusco-Perú.

- Banda R, Jorge, Evangelista V, Shirley, Ruiz G, Luis, Sandoval M, Rocío, Rodríguez LI, Claudia, Valdivia C, Martha, & Santiani A, Alexei. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 21(2), 145-153. Recuperado en 15 de noviembre de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172010000200001&lng=es&tlng=es.
- Bravo, P. W., & Johnson, L. W. (1994). Reproductive Physiology of the Male Camelid. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(2), 259–264. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30560-0](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30560-0)
- Bravo, P. W., Alarcon, V., Baca, L., Cuba, Y., Ordoñez, C., Salinas, J., & Tito, F. (2013). Semen preservation and artificial insemination in domesticated south american camelids. *Animal Reproduction Science*, 136(3), 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.005>
- Bravo, P. W., Ccallo, M., & Garnica, J. (2000). The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small ruminant research : the journal of the International Goat Association*, 38(1), 91–95. [https://doi.org/10.1016/s0921-4488\(00\)00142-5](https://doi.org/10.1016/s0921-4488(00)00142-5)
- Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J., & Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47(3), 619–626. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00020-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00020-4)
- Buendía, P., Soler, C., Paolicchi, F., Gago, G., Urquieta, B., Pérez-Sánchez, F., & Bustos-Obregón, E. (2002). Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm-class analyzer computer-assisted system. *Theriogenology*, 57(4), 1207–1218. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00724-5](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00724-5)

- Bustinza, V. (2001). *La Alpaca: Crianza, Manejo y Mejoramiento*. Puno, Perú: Editorial Universitaria. 1 ed., 343 p.
- Cárdenas, N. (2002). Inseminación artificial con espermatozoides congelados colectados de los conductos deferentes en alpacas (Tesis de pregrado). UNA, Puno, Perú.
- Carretero, M. I., Chaves, M. G., Arraztoa, C. C., Fumuso, F. G., Gambarotta, M. C., & Neild, D. M. (2020). Air-Drying Llama Sperm Affects DNA Integrity. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597952>
- Carretero, M. I., Fumuso, F. G., Neild, D. M., Giuliano, S. M., Cetica, P., & Miragaya, M. H. (2015). Evaluation of the acrosomal status in Lama glama sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Animal reproduction science*, 160, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.014>
- Carretero, M. I., Giuliano, S. M., Arraztoa, C. C., Santa Cruz, R. C., Fumuso, F. G., & Neild, D. M. (2016). Comparison of two cooling protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. *Andrologia*, 49(6), e12691. <https://doi.org/10.1111/and.12691>
- Carretero, M. I., Neild, D. M., Ferrante, A., Caldevilla, M., Arraztoa, C. C., Fumuso, F. G., & Giuliano, S. M. (2014). Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of Lama glamaspermatozoa. *Andrologia*, 47(6), 685–693. <https://doi.org/10.1111/and.12319>
- Carretero, M., Lombardo, D., Arraztoa, C., Giuliano, S., Gambarotta, M., & Neild, D. (2012). Evaluation of DNA fragmentation in llama (Lama glama) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Animal Reproduction Science*, 131(1–2), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.02.008>
- Carretero, M., Santa Cruz, C., Neild, D., Arraztoa, C., Fumuso, F., & Giuliano, S. (2013). Use of dimethylformamide semen cryopreservation of llama (lama glama). *Spermova*, 3(2), 174–176. <http://spermova.pe/site/files/revista2013-vol3%20No.2/174-176ok.pdf>

- Carretero, Ml y Giuliano, SM y Casaretto, CI y Gambarotta, MC & Neild, DM (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *InVet*, 11 (1), 55-63. [Fecha de Consulta 16 de Noviembre de 2021]. ISSN: 1514-6634. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179116774006>
- Casaretto, C., Lombardo, D. M., Giuliano, S., Gambarotta, M., Carretero, M. I., & Miragaya, M. H. (2012). Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head. *Andrologia*, 44 Suppl 1, 424–430. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01200.x>
- Ccalta, R. (2017). *Efecto de la adición del colesterol en la criopreservación de semen de alpaca (Vicugna pacos)* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Ccoiso, R. (2019). *Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas (Lama glama)* (Tesis 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., & 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
- Cortés Gutiérrez, E., López Fernández, C., Fernández, J., y Gosálvez, J. (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. Departamento de Genética. Centro de Investigación Biomédica del Noreste. *Actas urológicas españolas*; 31(2):120-131
- Crichton, E. G., Pukazhenthil, B. S., Billah, M., & Skidmore, J. A. (2015). Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) spermatozoa. *Theriogenology*, 83(2), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.09.005>

- 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.
- Cucho, Hernán, Ccoiso, Rufina, Gallegos, Mitzi, Ccalta, Ruth, Meza, Aydee, Ampuero, Enrique, Ordóñez, César, & Soler, Carles. (2020). Efecto de la papaína en la cinética de los espermatozoides dellama (*Lama glama*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(4), e19036. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19036>
- Cusiyunca, P. (2017). Características morfométricas y morfológicas de la cabeza del espermatozoide de la llama (*Lama glama*) usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS)(Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Director, A., Giuliano, S., Trasorras, V., Carretero, I., Pinto, M., & Miragaya, M. (2007). Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research* 14(2), 203-206.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Marshall, D., Zinaman, M. J., Clegg, E., Purvis, K., de Angelis, P., & Claussen, O. P. (1999). Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human reproduction (Oxford, England)*, 14(4), 1039–1049. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.4.1039>
- Evenson, D. P., Thompson, L., & Jost, L. (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*, 41(3), 637–651. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90174-h](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90174-h)
- Fernández Baca, S., & Calderón, W. (1966). *Methods of collection of semen in the alpaca*. *Revista de la FMV, UNMSM* 13, 18 – 20.
- Fernández, J. L., Muriel, L., Rivero, M. T., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *Journal of andrology*, 24(1), 59–66.

- Ferré, L., & Werkmeister, A. (1996). *Desarrollo de una vagina artificial termoeléctrica para la colecta de semen*. *Rev Agr Prod Anim* 16: 363-365.
- Flores Huarco, N. H., Giuliano, S. M., Fumuso, F. G., Miragaya, M. H., Cucho Dolmos, H. C., & Carretero, M. I. (2021). Use of dimethylformamide to cryopreserve alpaca semen previously incubated with collagenase. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 10.1111/rda.14003. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/rda.14003>
- Flores, N. (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. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.10>
- Flores, N., Giuliano, S., Quispe, A., Ordóñez, C., Carretero, M., Miragaya, M., & Cucho, H. (2014). *Test de endósmosis en espermatozoides de alpaca*. Cuartas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal – INITRA. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Argentina.
- Fumuso, F. G., Bertuzzi, M. L., Velásquez González, N., Miragaya, M. H., & Carretero, M. I. (2021). Cryopreservation of llama semen using a combination of permeable cryoprotectants. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 56(7), 958–964. <https://doi.org/10.1111/rda.13937>
- Fumuso, F. G., Giuliano, S. M., Chaves, G., Neild, D. M., Miragaya, M. H., Bertuzzi, M. L., & Carretero, M. I. (2020). Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. *Andrologia*, 52(6). <https://doi.org/10.1111/and.13597>
- Fumuso, F. G., Giuliano, S. M., Chaves, M. G., Neild, D. M., Miragaya, M. H., & Carretero, M. I. (2019). Evaluation of the cryoprotective effect of seminal plasma on llama (*Lama glama*) spermatozoa. *Andrologia*, 51(6), e13270. <https://doi.org/10.1111/and.13270>

- Fumuso, F., Giuliano, S., Chaves, M., Neild, D., Miragaya, M., Gambarotta, M., & Carretero, M. (2018). Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 192, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.019>
- Fumuso, F., Carretero, M., Neid, D., Gonzales, L., Miragaya, M. & Giuliano, S. (2014). Utilización del Sistema Integrado de Análisis de Semen (ISAS) ® para evaluar movilidad en espermatozoides de llama. Cátedra de Teriogenología, Cátedra de Física Biológica, 3Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. 4CONICET, Argentina. .
- Gallegos, M. (2019). *Determinación de las características macroscópicas, microscópicas y subpoblaciones espermáticas del semen de llama (Lama glama) colectado por electroeyaculación y vagina artificial* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Gallegos, M., Cucho H., Ccoiso., R., Meza, A., Ampuero, E., Ordóñez, C., & Valverde, A. (2021). Morfometría y subpoblaciones de espermatozoides de llama (Lama glama) usando el sistema ISAS® CASA-Morph. *Rev Inv Vet Perú* 2021; 32(1): e19506. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v32i1.19506>
- García V, Wilber, Alarcón B, Virgilio, & Bravo M, P. Walter. (2017). Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(2), 337-344. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13080>
- Garnica, J., Achata, R., & Bravo, P. (1993). *Physical and biochemical characteristic of alpaca semen*. *Animal Reproduction Science* 32: 85-90. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90059-Z](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90059-Z).
- Giuliano S., M., Spirito S., E., Miragaya M., H., Capdevielle E., F., Aquero, A., Boquet, M., & Ferrari, M. (2006). *Electroejaculation and seminal parameters in vicuna (Vicugna vicugna)*. *Rev Inv Vet Perú* 2006

- Giuliano, S. (2012). *Extracción y Evaluación de Semen de Camélidos Sudamericano*. *Spermova* 2(1): 6 - 9. <http://spermova.pe/site/files/revista2012/06-9-Giuliano-camelido.pdf>
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., & Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal reproduction science*, 104(2-4), 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.016>
- Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M., & Miragaya, M. (2010). Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal reproduction science*, 118(1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.005>
- Giuliano, S., & Santa Cruz, R. (2011). Métodos de recuperación de espermatozoides en camélidos. *Spermova* 1(1), 58-59.
- Giuliano, S., Santa Cruz, R., Arraztoa, C., Fumuso, F., Bertuzzi, M., & Carretero, M. (2019). Selección espermática de semen refrigerado de llama con diluyente a base de yema de huevo. *SPERMOVA*, 9(1), 35–41. <https://doi.org/10.18548/aspe/0007.05>
- Gonzales, H. (2008). Obtención y Criopreservación de Espermatozoides de Alpacas. *Scientia* 10(10): 223-234.
- Gosalvez, J., Vazquez, J. M., Enciso, M., Fernandez, J. L., Gosalbez, A., Bridle, J. R., & Lopez-Fernandez, C. (2008). Sperm DNA Fragmentation in Rams Vaccinated with Miloxan. *The Open Veterinary Science Journal*, 2(1), 7–10. <https://doi.org/10.2174/1874318800802010007>
- Hafez, E. & Hafez, B. (2002). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. México D.F., México: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 7 ed., 519 p.
- Hanzen, C., Cucho, H., Ampuero, E., Ordoñez, C. & Sumar, J. (2014). *Principios de la reproducción de los camélidos sudamericanos*. Cusco, Perú: Editorial Universitaria. 1 ed., 157 p.

- Huanca, N. (2015). Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de alpacas (*vicugna pacos*) utilizando el integrated semen analysis system – ISAS (Tesis pregrado) UNSAAC, Cusco-Perú.
- Huanca, N., Ordóñez, C., Ampuero, E., & Cucho H. (2020). Índice de fragmentación del ADN espermático de alpacas (*Vicugna pacos*) utilizando la prueba de dispersión de la cromatina espermática. *Rev Inv Vet Perú* 2020; 31(4): e19025. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19025>
- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T. & Adams, G. (2007). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15(1): 195-201. <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/53086/1/la07052.pdf>
- Huo, L. J., Ma, X. H., & Yang, Z. M. (2002). Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology*, 58(7), 1349–1360. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00953-6](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00953-6)
- Irvine, D. S., Twigg, J. P., Gordon, E. L., Fulton, N., Milne, P. A., & Aitken, R. J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of andrology*, 21(1), 33–44. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03273.x>
- Jasko, D. J., Lein, D. H., & Foote, R. H. (1990). Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197(3), 389–394.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & 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. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>

- 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., & Maxwell, W. M. (2012a). Advancing artificial insemination in camelids, particularly the alpacas. RIRDC Publication 12/016.
- Kershaw-Young, C. M., & Maxwell, W. M. (2012b). Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species. *Reprod. Dom. Anim.* 47(4): 369-375.
- Kodama, H., Yamaguchi, R., Fukuda, J., Kasai, H., & Tanaka, T. (1997). Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and sterility*, 68(3), 519–524. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)00236-7](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)00236-7)
- Larson, J. L., & Miller, D. J. (1999). Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular reproduction and development*, 52(4), 445–449. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199904\)52:4<445::AID-MRD14>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199904)52:4<445::AID-MRD14>3.0.CO;2-6)
- Laruta, F., Loza, M., & Delgado, P. (2016). Evaluación de características microscópicas de semen de llama (*Lama glama*) crioconservados en dos dilutores. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 3(1), 8-21. Recuperado en 16 de noviembre de 2021, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2311-25812016000100002&lng=es&tlng=es.
- Leduc, F., Maquennehan, V., Nkoma, G. B., & Boissonneault, G. (2008). DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice. *Biology of reproduction*, 78(2), 324–332. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064162>
- Maxi, E. (2019). Efecto protector de la yema de huevo de tres diferentes especies de aves durante la criopreservacion del semen de Alpaca (*vicugna pacos*) (Tesis pregrado) UNSAAC, Cusco, Perú.
- Morton, K. M., Bathgate, R., Evans, G., & Maxwell, W. M. (2007). Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents

and pellets and straws. *Reproduction, fertility, and development*, 19(7), 792–796.

<https://doi.org/10.1071/rd07049>

Morton K., M., Vaughan J., L., & Maxwell W., M. (2008). The continued development of artificial insemination technology in Alpacas. University of Sydney - NSW, Australia: ReproGen – Rural Industries Research and Development Corporation (RIRDC).

Olaguivel, C. & Naveros, M. (2014). Efecto de la enzima colagenasa en la congelación de semen en alpacas (*Vicugna pacos*). *Spermova* 4(1): 64.

Oliva, A., Spira, A., & Multigner, L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(8), 1768–1776.
<https://doi.org/10.1093/humrep/16.8.1768>

Ordóñez, C., Ampuero, E., Cucho, H., & 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.

Ordoñez, C., Cucho, H., Ampuero, E., Antezana, W., & Cayo, S. (2013). Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. *Spermova* 1:65-66.

Ordoñez, C., Ampuero, E., Alarcón, V., Franco, E., Hanzen, C., & Cucho, H. (2015). Evaluación de tres dilutores en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*) en pelets. *Spermova* 5(1):119-123.

Ortega, A. 2012. Análisis de la fragmentación de ADN espermático de muestras del banco de semen y su capacidad de fertilización en técnicas de reproducción asistida. Tesis Pregrado. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de Mexico.

Pacheco J. 2008. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *REDVET* 9(4): 1-17.

- Pacheco, J., Mamani, R., Franco, F., Zea, O., Pezo, D., & 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
<https://hdl.handle.net/20.500.12955/1092>
- Paricahua, E. 2001. Evaluación del Eyaculado sin la Secreción de las Glándulas Anexas en Alpacas (*Vicugna pacos*). (Tesis de pregrado)., FMVZ- UNA,. Puno,. Perú.
- Posado, R. (2014). Estudio de la calidad seminal del toro de lidia fragmentación del ADN espermático. Tesis Doctoral. Madrid, España: Univ. Complutense de Madrid. 233 p.
- Posado, R., Hernández, M., García, J., Bartolomé, D., Olmedo, S., Rodríguez, L., López-Fernández, C., & Gosálvez, J. (2008), Evaluación de la fragmentación del ADN en semen bovino congelado .Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Madrid. 60:(231): 441- 444p
- 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.
- 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 Fac. de Veterinaria. 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.
- Ramalho-Santos, J., Schatten, G., & Moreno, R. (2002). Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. . *Biol Reprod* 67(4): 1043-51.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1043>
- Rodriguez, M. 2013. Índice de fragmentación del ADN espermático y test de hos en semen de llamas (*Lama glama*) utilizando el integrated sperm analysis system (ISAS) Tesis FCA-UNSAAC. Cusco-Perú.

- Rubes, J., Selevan, S. G., Evenson, D. P., Zudova, D., Vozdova, M., Zudova, Z., Robbins, W. A., & Perreault, S. D. (2005). Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Human reproduction* (Oxford, England), 20(10), 2776–2783. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei122>
- Rybak, R., Faldikova, L., Faldyna, M., Machatkova, M., & Rubes, J. (2012). Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay in the Czech Republic. *Veterinární Medicína*, 49(No. 1), 1–8. <https://doi.org/10.17221/5668-vetmed>
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. (2000). Storage of ram semen. *Animal reproduction science*, 62(1-3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00155-x](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00155-x)
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nelson, D. R., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Alvarez, J. G., Thomas, A. J., Jr, & Sharma, R. K. (2002). Increased sperm nuclear DNA damage in normozoospermic infertile men: a prospective study. *Fertility and sterility*, 78(2), 313–318. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)03219-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)03219-3)
- Salisbury, G. & Vandermark, L. (1982). *Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los bóvidos*. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza. España.
- Sandoval, R. (2005). *Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes*. Tesis Med. Vet. Lima, Perú, UNMSM. 81 p
- Santiani, A., Huanca, W., Sapana, R., Huanca, T., Sepúlveda, N., & Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian journal of andrology*, 7(3), 303–309. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x>
- Schmid, T. E., Eskenazi, B., Baumgartner, A., Marchetti, F., Young, S., Weldon, R., Anderson, D., & Wyrobek, A. J. (2007). The effects of male age on sperm DNA damage in healthy

- non-smokers. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(1), 180–187.
<https://doi.org/10.1093/humrep/del338>
- Silva, P. F., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5), 958–978.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., Estes, M. C., Núñez, J., Moreira, P. N., Núñez, M., Gutiérrez, R., Sancho, M., & Garde, J. J. (2005). Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology*, 64(5), 1236–1243.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.018>
- Sorensen, A. (1991). *Reproducción animal, principios y prácticas*. México: Ed. McGraw-Hill Interamericana.
- Stuart, C. & Bathgate, R. (2015). Advancing assisted reproductive technologies in camelids (especially the alpaca). <https://rirdc.infoservices.com.au/items/15-067>. Accessed April 25, 2017
- Sumar, J. (2002). Llamas y alpacas. En Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (Eds.). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (pp. 224-242). México D.F., México: Ed. McGraw-Hill Interamericana, 7 ed.
- Sumar, J. & Leyva, V. (1981). Colección de Semen Mediante Vagina Artificial en la Alpaca (*vicugna pacos*). IV Convención Internacional. sobre cCamélidos sSudamericanos.
- Themes, U. (2017). *Anatomy and physiology of reproduction in the female llama and alpaca*. Veterian Key. <https://veteriankey.com/anatomy-and-physiology-of-reproduction-in-the-female-llama-and-alpaca/>
- Tibary, A., & Vaughan, J. (2006). Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research*, 61(2–3), 283–298. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.018>

- Tribulo, H. (2009). Curso de congelado de semen bovino. Argentina. Instituto de Reproducción Animal Córdoba IRAC. Guía práctica. P 31-33.
- Tsarev, I., Bungum, M., Giwercman, A., Erenpreisa, J., T. Ebessen, T., Ernst, E., & Erenpreiss, J. 2009. Evaluación del potencial de fertilidad masculina mediante la prueba de azul de toluidina para la evaluación de la estructura de la cromatina del espermatozoide. *Human Reproduction* , Volumen 24, páginas 1569–1574.
- Ugarelli, A. (2015). Evaluación de diferentes concentraciones de FITC-PSA y FITC-PNA para la valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca. *SPERMOVA*, 5(1), 87–92. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.20>
- Valle, E. M. (2013). "Evaluación de dos técnicas de colección de semen en llamas (*Lama glama*)" en la estación experimental de Cchoquenaira (Tesis de pregrado) en La Paz, Bolivia.
- Vásquez, J., Florentini, E. A., & Valdivia, M. (2012) Hypoosmotic swelling test in alpaca (*Vicugna pacos*) epididymal spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 2012;47(6):e83-7. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01988.x>
- Vaughan, J. L., Galloway, D., & Hopkins, D. (2003). Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Australia, RIRDC, Project AAA-1A.
- Waterhouse, K. E., Haugan, T., Kommisrud, E., Tverdal, A., Flatberg, G., Farstad, W., Evenson, D. P., & De Angelis, P. M. (2006). Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reproduction, fertility, and development*, 18(7), 781–788. <https://doi.org/10.1071/rd06029>
- Zimmermann, MF. (2007). Efeito da diluição do crioprotetor dimetilformamida em amostras de sêmen equino descongeladas utilizando-se dois diferentes diluentes comerciais (em línea). Tesis Mg.Sc. Brasilia, Brasil, Universidad de Brasilia. 65 p.
- Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., & Zenzes, M. T. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile and infertile

men. *Fertility and sterility*, 75(4), 674–677. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01796-9](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01796-9)

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 Med. Vet. Lima, Perú, UNMSM. 71 p.

ANEXOS

ANEXO 1. Reactivos para la preparación de dilutor base Tris

Preparación de dilutor base Tris (dilutor A).

Para la preparación de 100 ml de dilutor A, se usó 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

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% GLI
Dilutor A (ml)	9.5
Glicerol (ml)	0.5
Total (ml)	10

ANEXO 2. Análisis de variancia de las características microscópicas en muestra de semen fresco, refrigerado y descongelado de llama colectadas por EE.

ANVA de Vitalidad en semen fresco, refrigerado y descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	1693.758757	423.439689	2.44	0.0618
COLECTA	3	169.874338	56.624779	0.33	0.8065
ESTADO	2	9126.776243	4563.388122	26.28	<.0001
LLAMA*ESTADO	8	1124.266673	140.533334	0.81	0.5983
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.624181	24.66411	13.17849	53.43183		

ANVA de motilidad (EMP + EMNP) espermática en semen fresco, refrigerado y descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	4966.309693	1241.577423	5.65	0.0010
COLECTA	3	2218.554673	739.518224	3.36	0.0274
ESTADO	2	5479.584003	2739.792002	12.46	<.0001
LLAMA*ESTADO	8	3840.468997	480.058625	2.18	0.0486
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.641156	46.46064	14.83039	31.92033		

ANVA de EMP en semen fresco, refrigerado y descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	30.08432333	7.52108083	1.51	0.2174
COLECTA	3	40.50137333	13.50045778	2.71	0.0574
ESTADO	2	47.32231000	23.66115500	4.74	0.0139
LLAMA*ESTADO	8	22.52895667	2.81611958	0.56	0.8008
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.401221	99.01895	2.233867	2.256000		

ANVA de EMNP en semen fresco, refrigerado y descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	4973.017977	1243.254494	5.87	0.0008
COLECTA	3	1896.640925	632.213642	2.99	0.0418
ESTADO	2	4544.469250	2272.234625	10.73	0.0002
LLAMA*ESTADO	8	3410.042133	426.255267	2.01	0.0682
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.625098	49.04651	14.54940	29.66450		

ANVA de VCL en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	1803.248857	450.812214	4.38	0.0048
COLECTA	3	749.113952	249.704651	2.42	0.0791
ESTADO	2	4903.055583	2451.527792	23.80	<.0001
LLAMA*ESTADO	8	3986.364783	498.295598	4.84	0.0003
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.725607	20.31716	10.14981	49.95683		

ANVA de VSL en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	44.84322333	11.21080583	1.07	0.3817
COLECTA	3	67.00269833	22.33423278	2.14	0.1097
ESTADO	2	34.37786333	17.18893167	1.65	0.2050
LLAMA*ESTADO	8	72.87673667	9.10959208	0.87	0.5472
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.333114	27.65614	3.231666	11.68517		

ANVA de VAP en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	240.5981233	60.1495308	2.18	0.0873
COLECTA	3	202.5449783	67.5149928	2.45	0.0767
ESTADO	2	134.4612100	67.2306050	2.44	0.0994
LLAMA*ESTADO	8	364.5762067	45.5720258	1.65	0.1386
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.448845	20.53103	5.248449	25.56350		

ANVA de LIN en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	275.7855167	68.9463792	2.37	0.0674
COLECTA	3	225.6624850	75.2208283	2.59	0.0654
ESTADO	2	442.4642033	221.2321017	7.62	0.0015
LLAMA*ESTADO	8	119.8309633	14.9788704	0.52	0.8378
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.465822	22.03656	5.389225	24.45583		

ANVA de STR en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	672.7541233	168.1885308	2.61	0.0488
COLECTA	3	309.3485383	103.1161794	1.60	0.2034
ESTADO	2	57.8397733	28.9198867	0.45	0.6412
LLAMA*ESTADO	8	124.1475267	15.5184408	0.24	0.9805

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.300903	17.50880	8.024605	45.83183

ANVA de WOB en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	93.000307	23.250077	0.46	0.7628
COLECTA	3	213.870085	71.290028	1.42	0.2509
ESTADO	2	2112.570763	1056.285382	21.01	<.0001
LLAMA*ESTADO	8	789.892253	98.736532	1.96	0.0753

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.603167	13.33572	7.090360	53.16817

ANVA de ALH en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	7.18495667	1.79623917	2.87	0.0343
COLECTA	3	4.56339167	1.52113056	2.43	0.0783
ESTADO	2	9.94724333	4.97362167	7.95	0.0012
LLAMA*ESTADO	8	2.80897333	0.35112167	0.56	0.8029

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.482707	63.26644	0.790725	1.249833

ANVA de BCF en semen fresco, refrigerado y descongelado de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	24.42924000	6.10731000	1.96	0.1180
COLECTA	3	29.63697333	9.87899111	3.17	0.0339
ESTADO	2	64.13059000	32.06529500	10.30	0.0002
LLAMA*ESTADO	8	8.31586000	1.03948250	0.33	0.9479
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.491767	78.97883	1.764387	2.234000		

ANVA de Integridad acrosomal en semen fresco, refrigerado y descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	401.3560000	100.3390000	0.72	0.5820
COLECTA	3	377.8431667	125.9477222	0.91	0.4463
ESTADO	2	420.5023333	210.2511667	1.51	0.2322
LLAMA*ESTADO	8	581.0760000	72.6345000	0.52	0.8328
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.233697	13.76204	11.79108	85.67833		

ANVA de Funcionalidad de la membrana espermática en semen fresco, refrigerado y descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	8010.940000	2002.735000	7.25	0.0002
COLECTA	3	4713.014000	1571.004667	5.69	0.0023
ESTADO	2	2056.123000	1028.061500	3.72	0.0325
LLAMA*ESTADO	8	3274.862000	409.357750	1.48	0.1927
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.608879	33.74094	16.61741	49.25000		

ANVA de Índice de Fragmentación de ADN espermático (IFAE) en semen fresco, refrigerado y descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	102.5700000	25.6425000	0.56	0.6949
COLECTA	3	82.1420000	27.3806667	0.59	0.6218
ESTADO	2	55.7013333	27.8506667	0.61	0.5507
LLAMA*ESTADO	8	78.0020000	9.7502500	0.21	0.9871
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.141431	118.6711	6.784029	5.716667		

ANVA de Área de Núcleo de espermatozoides de llama colectado por EE

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	1466.985667	366.746417	27.05	<.0001
COLECTA	3	43.193200	14.397733	1.06	0.3642
TIPO	2	152.330093	76.165047	5.62	0.0037
LLAMA*TIPO	8	745.498573	93.187322	6.87	<.0001
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.107007	12.38202	3.682331	29.73933		

ANVA de Área de Halo de espermatozoides de llama colectado por EE

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	786.1176620	196.5294155	2.95	0.0210
COLECTA	3	298.2293931	99.4097977	1.49	0.2178
TIPO	2	139.9846997	69.9923498	1.05	0.3518
LLAMA*TIPO	8	337.3269750	42.1658719	0.63	0.7505
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.087216	15.81320	8.167606	51.65057		

ANVA de Área de Núcleo de espermatozoides fragmentados de llama colectado por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	112.2766160	28.0691540	2.80	0.0328
COLECTA	3	36.7576423	12.2525474	1.22	0.3091
TIPO	2	2.8056756	1.4028378	0.14	0.8699
LLAMA*TIPO	8	135.9408630	16.9926079	1.69	0.1162

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.296477	11.03951	3.168982	28.70581

ANVA de Área de Halo de espermatozoides fragmentados de llama colectado por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	63.378385	15.844596	0.50	0.7334
COLECTA	3	97.112880	32.370960	1.03	0.3857
TIPO	2	1161.371385	580.685692	18.45	<.0001
LLAMA*TIPO	8	596.011454	74.501432	2.37	0.0261

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.472549	9.312144	5.610783	60.25233

ANVA de Área de Núcleo de espermatozoides no fragmentados de llama colectado por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	1699.274896	424.818724	31.53	<.0001
COLECTA	3	46.456058	15.485353	1.15	0.3280
TIPO	2	164.104735	82.052367	6.09	0.0023
LLAMA*TIPO	8	715.559805	89.444976	6.64	<.0001

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.122481	12.31688	3.670701	29.80219

ANVA de Área de Halo de espermatozoides no fragmentados de llama colectado por EE.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
LLAMA	4	65.5147553	16.3786888	0.78	0.5384
COLECTA	3	203.4900487	67.8300162	3.24	0.0238
TIPO	2	109.8486501	54.9243250	2.62	0.0758
LLAMA*TIPO	8	683.1261467	85.3907683	4.08	0.0002
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media		
0.241792	9.640572	4.576494	47.47119		