

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS

“EFECTO DE TRES CURVAS DE CONGELACIÓN RÁPIDA EN LOS PARÁMETROS MICROSCÓPICOS DEL SEMEN DE LLAMA (*Lama glama*) EMPLEANDO UN EQUIPO DE CRIOCONSERVACIÓN AUTOMÁTICA DE SEMEN”

PRESENTADO POR:

- BR. NERY TARIFA ARQUE

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO ZOOTECNISTA.

ASESORES:

Dr. LUCIO ENRIQUE AMPUERO CASQUINO

MSc. HERNÁN CARLOS CUCHO DOLMOS

Mgt. AYDEE MEZA CHATATA

CUSCO – PERU

2023

DEDICATORIA

A **DIOS**, por guiar mis pasos, por su compañía, por darme confianza y seguridad por hacerme fuerte.

Por su amor incondicional, por cuidar y derramar bendiciones en toda mi familia.

Por haberme regalado varios momentos de felicidad y ser el mejor consejero de vida.

A mis padres, **GENOVEVA ARQUE FLORES** y **TEODORO TARIFA FLORES**, por ser los mejores padres del mundo, por su confianza por estar lado mío en cada paso que doy y por ser el motivo de mis logros.

A mi único y querido hermano **KENYI TARIFA ARQUE**, por ser el mejor ejemplo a seguir, por ser mi consejero, por entenderme siempre, por compartir muchos momentos llenos de risas y alegrías.

A mis abuelos maternos, **Lorenzo Arque** y **Paula Flores**, por su infinito amor y cariño.

A mis abuelos paternos, **Alberto Tarifa** () y **Agripina Flores** () se que desde el cielo siempre guiaron mis pasos y cuidaron de mi familia.

Con especial cariño a mi tío **Nestor Arque** () por inculcarme el valioso mundo del estudio

AGRADECIMIENTOS

- Expresar mi agradecimiento a la plana docente de la Escuela Profesional de Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias, por compartir sus conocimientos y experiencias, en clases teóricas y prácticas, contribuyendo en mi formación profesional.
- De manera especial agradezco a mis asesores el Ing. Enrique Ampuero, Ing. Hernán Cucho y la Ing. Aydee Meza por permitirme aprender de cada uno de ellos, por su gran apoyo, orientación y por confiar en mi persona.
- Agradecer a todo el personal administrativo y técnico del Centro de Investigación en camélidos sudamericanos CICAS - La Raya – UNSAAC; quienes me brindaron su comprensión, consejos y apoyo desinteresado.
- Manifestar el enorme agradecimiento en especial al señor Nicolas Morales, señor Fortunato por su gran apoyo para la elaboración del presente trabajo de investigación.
- De la misma manera a Efrain Huayllani, Rosalio Kuakira, Uriel Cutire quienes estuvieron apoyándome en los buenos y dificultosos momentos durante la elaboración de mi tesis.
- A mis familiares en general por sus consejos alentadores para seguir adelante.
- A mis mejores amigas Sughey Sumire y Ester Mamani, gracias por los buenos deseos y vibras positivas.
- A mis ahijados Juan Benigno y Joel Ayma por haber confiado en mi persona como guía dentro de la carrera de zootecnia.
- A mis compañeros: Tamia Cano, Katherine Chipa, Miluska Quispe, Rina Ccoa, Jonathan Trujillo, Nilton Espinoza; Juan Yucra, Waldir Ccalloquispe, por su compañía a lo largo de la carrera profesional.

INDICE

Tabla de contenido

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE	iii
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FOTOS	xi
INDICE DE FIGURAS	xiii
GLOSARIO	xiv
RESUMEN	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	2
PROBLEMA OBJETO DE ESTUDIO	2
PROBLEMA GENERAL	3
PROBLEMAS ESPECIFICOS	3
1.1 OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN	3
1.1.1 OBJETIVO GENERAL	3
1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
1.2 JUSTIFICACIÓN	4
CAPITULO II	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Peculiaridades del semen	5

2.1.1 El semen.....	5
2.1.2 Células espermáticas.....	5
2.2 Métodos de colección de semen.....	5
2.2.1 Electroeyaculación.....	6
2.3 Evaluación de características seminales	6
2.3.1 Características macroscópicas del semen	7
2.3.2 Características microscópicas del semen	9
2.4 Crioconservación de semen	16
2.4.1 Degelificación	16
2.4.2 Diluyente o dilutor	17
2.5 Congelación.....	20
2.5.1 Velocidades de enfriamiento.....	20
2.6 Descongelado.....	21
2.7 Equipo de congelación automática de semen.....	22
CAPITULO III	24
MATERIALES Y METODOS	24
3.1 Lugar de estudio	24
3.1.1 Ubicación geográfica	24
3.2 Materiales y equipo.....	25
3.2.1 Materiales biológicos	25
3.2.2 Equipos y materiales para la colección de semen.....	25

3.2.3	Equipo de congelación automática de semen	26
3.2.4	Equipos de laboratorio.....	26
3.2.5	Materiales de laboratorio	27
3.2.6	Reactivos e insumos	27
3.2.7	Equipo y materiales de escritorio.....	27
3.3	Metodología de la investigación.....	28
3.3.1	De los animales	28
3.3.2	Colección de semen de llama por el método de electroeyaculación.....	31
3.3.3	Evaluación de las características macroscópicas de semen	34
3.3.4	Degelificación	37
3.3.5	Evaluación de las características microscópicas de semen	37
3.3.6	Crioconservación de semen.....	42
3.3.7	Refrigeración	43
3.3.8	Empajillado y equilibrado	43
3.3.9	Congelación.....	44
3.3.10	Almacenamiento	51
3.3.11	Descongelado.....	51
3.4	Flujograma de crioconservación	52
3.5	Análisis estadístico	53
3.5.1	Características del semen de llama en estado fresco y refrigerado.....	53
3.5.2	Características microscópicas en semen congelado/descongelado.....	54

CAPITULO IV	55
RESULTADOS Y DISCUSION.....	55
4.1 Evaluación de las características macroscópicas para el objetivo N°1.....	55
4.1.1 Volumen	55
4.1.2 Color.....	55
4.1.3 Filancia	56
4.1.4 Potencial de hidrogeniones.....	56
4.2 Evaluación de las características microscópicas para el objetivo N°1.....	57
4.2.1 Concentración espermática	57
4.2.2 Vitalidad espermática.....	57
4.2.3 Integridad acrosomal	58
4.2.4 Funcionalidad de la membrana espermática.....	59
4.2.5 Motilidad espermática	60
4.2.6 Morfometría espermática.....	62
4.3 Evaluación de las características microscópicas para el objetivo N°2.....	64
4.3.1 Vitalidad espermática.....	64
4.3.2 Integridad acrosomal	65
4.3.3 Funcionalidad de la membrana espermática.....	65
4.3.4 Motilidad espermática	66
4.3.5 Morfometría espermática	67
4.4. Evaluación del efecto de las curvas rápida de congelación sobre las características microscópicas para el objetivo N°3.	69

4.4.1 Vitalidad espermática.....	69
4.4.2 Integridad acrosomal	70
4.4.3 Funcionalidad de la membrana espermática	71
4.4.4 Motilidad espermática	71
4.4.5 Morfometría espermática	74
CAPITULO V	76
CONCLUSIONES.....	76
CAPITULO VI	77
RECOMENDACIONES	77
CAPITULO VII.....	78
REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS	78
ANEXOS.....	91
ANEXO 1. Análisis de varianza para características macroscópicas.	91
ANEXO 2. Análisis de varianza para características microscópicas en semen fresco.	91
ANEXO 3. Analisis de varianza de características microscópicas en semen refrigerado.	93
ANEXO 4. Análisis de varianza de características microscópicas en semen descongelado, congelado con tres curvas rápidas.	95

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Volumen seminal (Media \pm DS) en llamas colectadas por el método de electroeyaculación.	7
Cuadro 2. Color seminal (%) de llamas colectadas por el método de electroeyaculación.....	7
Cuadro 3. Filancia seminal (Media \pm DS) en llamas colectados por el método de electroeyaculación.	8
Cuadro 4. Potencial de hidrogeniones (Media \pm DS) en semen de llama colectado por el método de electroeyaculación.	8
Cuadro 5. Porcentaje de motilidad espermática (Media \pm DS) en llamas, colectados por el método de electroeyaculación.	9
Cuadro 6. Porcentaje (Media \pm DS) de espermatozoides móviles progresivos (EMP) y espermatozoides móviles no progresivos (EMNP) colectados por el método de electroeyaculación en llamas.	10
Cuadro 7. Parámetros de velocidad (Media \pm DS) de espermatozoides (Media \pm DS) en semen de llama en fresco colectado por electroeyaculación.	10
Cuadro 8. Parametros de velocidad (Media \pm DS) en espermatozoide de alpaca colectado por electroeyaculación.	11
Cuadro 9. Concentración espermática (Media \pm DS) en llamas colectado por electroeyaculación.	11
Cuadro 10. Vitalidad espermática (Media \pm DS) en llamas, colectado por el método de electroeyaculación.	12
Cuadro 11. Funcionalidad de la membrana espermática (Media \pm DS) en llamas con 50 mOsm, colectado por el método de electroeyaculación.....	13
Cuadro 12. Integridad acrosomal espermática (Media \pm DS) en llamas colectado por el método de electroeyaculación.	14

Cuadro 13. Morfometría espermática (Media \pm DS) de llamas colectados por electroeyaculación, reportes en semen fresco.....	15
Cuadro 14. Raza, edad y peso de las llamas machos utilizados para la ejecución del trabajo de investigación.	29
Cuadro 15. Biometría de los testículos de las llamas utilizadas en el presente trabajo de investigación.	30
Cuadro 16. Tiempo de colecta y voltaje alcanzado según el proceso de colección de semen por el método de electroeyaculación en llamas, usando un electroeyaculador (ElectroJac5®).	34
Cuadro 17. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos del volumen seminal de llamas colectadas por electroeyaculación.	55
Cuadro 18. Color seminal de llamas colectadas por el método de electroeyaculación.	55
Cuadro 19. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la filancia seminal de llamas obtenidos por el método de electroeyaculación.....	56
Cuadro 20. Potencial de hidrogeniones (pH) del semen de llama colectado por electroeyaculación (n=4).	56
Cuadro 21. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la concentración espermática en semen de llama colectado por electroeyaculación.	57
Cuadro 22. Media (n=4), desviación etandar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la vitalidad espermática en semen de llama colectado por electroeyaculación.	58
Cuadro 23. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la integridad acrosomal del espermatozoide en semen fresco de llama colectado por electroeyaculación.	59
Cuadro 24. Media (n=4), desviación estandar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la funcionalidad de la membrana espermática en semen de llama colectado por electroeyaculación.	59

Cuadro 25. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la motilidad progresiva (MP), motilidad no progresiva (MNP) y motilidad total (MT) de espermatozoides en semen de llama colectado por electroeyaculación.	60
Cuadro 26. Media de los parámetros de velocidad de espermatozoides en semen de llama colectado por electroeyaculación (n=4).....	61
Cuadro 27. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la morfometría de la cabeza del espermatozoide de llama colectado por electroeyaculación.....	62
Cuadro 28. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la morfometría de la pieza intermedia del espermatozoide de llama colectado por EE.	63
Cuadro 29. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la vitalidad espermática en semen refrigerado de llama.....	64
Cuadro 30. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la integridad acrosomal espermática en semen refrigerado de llama.	65
Cuadro 31. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la funcionalidad de la membrana espermática en semen refrigerado de llama.....	65
Cuadro 32. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la motilidad progresiva (MP), motilidad no progresiva (MNP) y motilidad total (MT) de espermatozoides en semen refrigerado de llama.	66
Cuadro 33. Parámetros de velocidad espermática de llama (n=4) en semen refrigerado.	67
Cuadro 34. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la morfometría de la cabeza del espermatozoide de llama en semen refrigerado.....	68
Cuadro 35. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la morfometría de la pieza intermedia del espermatozoide de llama en semen refrigerado.....	69
Cuadro 36. Media (n=16), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos del efecto de las curvas de congelación sobre la vitalidad espermática en semen descongelado de llamas.	70

Cuadro 37. Media (n=16), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos del efecto de las curvas de congelación sobre la integridad acrosomal del espermatozoide de llama en semen descongelado.....	70
Cuadro 38. Media (n=16), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos del efecto de las curvas de congelación sobre la funcionalidad de la membrana espermática de llama en semen descongelado.....	71
Cuadro 39. Media (n=16) y desviación estándar (DS) del efecto de las curvas de congelación sobre la motilidad progresiva (MP), motilidad no progresiva (MNP) y motilidad total (MT) del espermatozoide de llama en semen descongelado.....	72
Cuadro 40. Media del efecto de las curvas de congelación sobre los parámetros de velocidad espermática de llama (n=16) en semen descongelado.	73
Cuadro 41. Media (n=16) y desviación estándar (DS) del efecto de las curvas de congelación sobre la morfometría de la cabeza del espermatozoide de llama en semen descongelado.....	74
Cuadro 42. Media (n=16) y desviación estándar (DS) del efecto de las curvas de congelación sobre la morfometría de la pieza intermedia del espermatozoide de llama en semen descongelado.....	75

INDICE DE FOTOS

Foto 1. Instalaciones del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS – La Raya	24
Foto 2. Equipo y materiales para la colección de semen por electroeyaculación.....	25
Foto 3. Equipo de congelación automática de semen y embriones (Cryologic - CL8800i).	26
Foto 4. Llamas machos seleccionados para la colección de semen.	28
Foto 5. Peso de los animales usando una balanza digital.	29
Foto 6. Medición de los testículos de los machos con un vernier digital.	30

Foto 7. Traslado de los animales un día antes de la colección.	31
Foto 8. Aplicación de Xilacina y Ketamina por vía intravenosa (pierna).	32
Foto 9. Desenvaine del prepucio para la colección de semen por EE.	33
Foto 10. Colores de semen colectado por E.E: A) blanco lechoso y B) blanco lechoso claro. ...	35
Foto 11. Evaluación del volumen de semen de llama colectado por E.E.	35
Foto 12. Evaluación de la filancia del semen colectado por E.E.	36
Foto 13. Evaluación del pH del semen de llama usando bandas de peachimetro.....	36
Foto 14. Evaluación de la motilidad espermática usando el ISAS.....	37
Foto 15. Evaluación de la vitalidad espermática con tinción eosina – nigrosina.....	38
Foto 16. Imágenes de los espermatozoides capturadas en el microscopio	39
Foto 17. Evaluación de la morfometría espermática imágenes digitalizadas con un sistema ISAS®.....	40
Foto 18. Evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática (HOST).....	41
Foto 19. Evaluación de la integridad acrosomal espermática con tinción comassie blue: A) Con acrosoma y B) Sin acrosoma.	42
Foto 20. Proceso de refrigeración de la muestra diluida.	43
Foto 21. Proceso de empajillado de la muestra diluida.....	44
Foto 22. Programación del equipo de congelación automático de semen.	45
Foto 23. Proceso de colocación del criochamber dentro del criobath con nitrógeno líquido.....	45
Foto 24. Proceso de colocación de las pajillas en el criochamber previo a la congelación.	46
Foto 25. Pajillas protegidas con la tapa del criochamber.	46
Foto 26. Criobath con tapa para iniciar la congelacion de pajillas.....	47
Foto 27. Representación gráfica de la curva rápida N° 1.....	48
Foto 28. Representación gráfica de la curva rápida N° 2.....	49
Foto 29. Representación gráfica de la curva rápida N° 3.....	50
Foto 30. Almacenamiento de las pajillas en un balón con nitrógeno líquido (-196°C).	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parámetros de evaluación morfométrica del espermatozoide de llama (cabeza y pieza intermedia) (Fuente: Soler et al., 2005).....	15
--	----

GLOSARIO

ALH	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
BCF	Frecuencia de batida de la cabeza
C1	Curva rápida de congelación N° 1
C2	Curva rápida de congelación N° 2
C3	Curva rápida de congelación N° 3
CB	Comassie Blue
CICAS	Centro de investigación de camélidos sudamericanos
CSA	Camélidos Sudamericanos
CV	Coefficiente de variabilidad
DS	Desviación estándar
EE	Electroeyaculación
EMNP	Espermatozoides móviles no progresivos
EMP	Espermatozoides móviles progresivos
HOST	Hypoosmotic Swelling Test.
IA	Inseminación artificial
ISAS	Integrated Semen Analysis System
LIN	Índice de linealidad
PS	Plasma seminal
STR	Índice de rectitud
VAP	Velocidad media
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad rectilínea
WOB	Índice de oscilación

RESUMEN

El presente trabajo de investigación: “Efecto de tres curvas de congelación rápida en los parámetros microscópicos del semen de llama (*Lama glama*) empleando un equipo de crioconservación automática de semen” fue realizado en el CICAS la Raya, de la UNSAAC, durante la época reproductiva de diciembre del 2020 a julio del 2021. El objetivo fue determinar el efecto de tres curvas de congelación rápida sobre las características microscópicas de semen de llama colectada por electroeyaculación (EE) empleando un equipo de congelación automática de semen. Se utilizaron 4 llamas machos, se realizaron 4 colectas por animal con intervalos de una semana por el método de EE. Las muestras seminales con buena concentración y motilidad fueron degelificadas con papaína (0.1 mg mL^{-1} , 20 min, 37°C) e inhibidor E-64 (10 μM , 37°C , 5 min). Luego fueron diluidas con dilutor base tris, yema de huevo de codorniz y glicerol al 7% a 37°C , la refrigeración se hizo por 2.5 horas, el tiempo de equilibrado fue de 5 minutos. El proceso de congelación se realizó utilizando un equipo de congelación automática de semen y embriones donde se dibujo tres curvas rápidas (**C**): **C1**: 13 minutos (-5°C a -122°C); **C2**: 15 minutos (-5°C a -95°C) y **C3**: 18 minutos (5°C a -112°C) todas con caída libre al finalizar. Las pajillas fueron descongeladas después de 7 días en agua a 37°C por 30 segundos. Se evaluaron las características microscópicas vitalidad, motilidad, integridad acrosomal, morfometría, funcionalidad de la membrana (fresco, refrigerado y descongelado). Se halló diferencias significativas ($p < 0.05$) para los parámetros microscopicos del semen como integridad acrosomal, funcionalidad de la membrana espermática y WOB las cuales se conservaron mejor con las curvas de congelación rápida 1 y 2. Así mismo VCL, VAP se vieron disminuidas con la curva de congelación rápida 1. BCF se conservó mejor en la curva 1 y 3. Sin embargo, los parametros microscópicos del semen como vitalidad, motilidad total, VSL, LIN, STR, ALH y las variables morfométricas se conservaron similares sin diferencias significativas ($p > 0.05$) para las tres curvas de congelación rápida empleadas.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación y la utilización del semen congelado mediante Inseminación Artificial (IA), ha causado gran impacto, debido a que favorece el comercio nacional e internacional de razas o líneas genéticas y formación de bancos de germoplasma (Aller *et al.*, 2003). Vivanco, (2018) indica los objetivos del uso de esta tecnología que es lograr el incremento de la tasa reproductiva de animales selectos con una composición genética de acuerdo a las necesidades del mercado, la prevención de enfermedades transmisibles vía reproductiva y la conservación de los recursos zoogenéticos. Sin embargo en los camélidos sudamericanos domésticos, su utilización es casi inexistente debido a la falta de información para obtener muestras de buena calidad luego del descongelamiento (Santiani, 2015).

La criopreservación de semen es un procedimiento que permite mantener viables a espermatozoides por periodos de tiempo indefinidos mediante el mantenimiento de estas células en temperaturas muy bajas (-196 °C en nitrógeno líquido) (Santiani, 2015). Al criopreservar espermatozoides estos son sometidos a reducción de temperatura, deshidratación, congelación y descongelación; sin embargo, los espermatozoides no están adaptados para soportar bajas temperaturas, lo que genera muerte celular y alteraciones funcionales, por eso, es necesario un control de la velocidad de enfriamiento y la adición de diluyentes y compuestos protectores del semen (Medeiros *et al.*, 2002).

La velocidad de congelamiento es importante para la viabilidad espermática durante el rango crítico de temperatura, este rango es definido como el periodo donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular y comprende los -5°C y los -50°C (Kumar *et al.*, 2003). La velocidad óptima de congelamiento es aquella suficientemente lenta para prevenir la formación de hielo intracelular, pero rápida para minimizar los efectos de la exposición prolongada a un medio extracelular hiperosmótico (Holt, 2000).

CAPITULO I

PROBLEMA OBJETO DE ESTUDIO

Los estudios sobre conservación de semen fresco, refrigerado y congelado de camélidos sudamericanos (CSA), para su empleo en la inseminación artificial, no ha obtenido el éxito esperado como en otras especies domésticas; existe una gran limitación en lo concerniente al desarrollo de protocolos adecuados para la conservación de espermatozoides de CSA (dilutores, temperatura de equilibrio, velocidad de congelación y descongelación, entre otros) (Choez *et al.*, 2017).

En la crianza de camélidos sudamericanos existe escasa información, sobre la congelación de semen y los estudios que se han realizado no han tenido mucho éxito, probablemente las curvas de congelación no han sido las correctos y la crioconservación realizada a la muestra espermática para el almacenado no es la adecuada, debido a la viscosidad que dificulta el manejo que impide la evaluación de ciertos parámetros (Santiani, 2015).

Huanca *et al.*, (2011), indica que existe alta variabilidad por el factor macho que influye sobre las diferentes características seminales como volumen, filancia, motilidad, concentración, recuento de espermatozoides normales, anormalidades de la cola y gota citoplásmica; también menciona que existe variabilidad por la época de colección ya que las mejores respuestas para las variables: espermatozoides normales, anormalidades de la cabeza y cola se dan en la época de lluvias sin embargo el menor porcentaje de espermatozoides con gota citoplásmica se presenta en la época seca.

La mayoría de los dilutores, así como las técnicas de refrigeración y congelación, utilizadas en los últimos 20 años, se han tratado de adaptar de otras especies como vacunos y ovinos (Adams *et al.*, 2009).

PROBLEMA GENERAL

¿Cuáles son los efectos de la aplicación de curvas de congelación rápidas en la criopreservación de semen de llama colectado por electroeyaculación, empleando un equipo de congelación automática de semen?

PROBLEMAS ESPECIFICOS

- 1 ¿Cuáles son las características macroscópicas y microscópicas del semen fresco en llama colectado por electroeyaculación?
- 2 ¿Cuáles son las características microscópicas de semen de llama evaluadas en la etapa de refrigerado?
- 3 ¿Cuál es el efecto de las curvas de congelación rápida en las características microscópicas de semen de llama al descongelado?

1.1 OBJETIVO Y JUSTIFICACIÓN

1.1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de tres curvas de congelación rápida sobre las características microscópicas de semen de llama colectada por electroeyaculación empleando un equipo de congelación automática de semen.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar las características macroscópicas (volumen seminal, pH, filancia y color seminal) y microscópicas (motilidad espermática, concentración espermática, vitalidad espermática, funcionalidad de la membrana espermática, integridad acrosomal y morfometría espermática) del semen fresco de llama colectado por electroeyaculación.
- Evaluar las características microscópicas (motilidad espermática, vitalidad espermática, funcionalidad de la membrana espermática, integridad acrosomal y morfometría espermática) en la etapa de refrigerado del semen de llama colectado por electroeyaculación.

- Evaluar el efecto de tres curvas de congelación rápida en las características microscópicas (motilidad espermática, vitalidad espermática, funcionalidad de la membrana espermática, integridad acrosomal y morfometría espermática) del semen de llama.

1.2 JUSTIFICACIÓN

En nuestro país, la crianza de los camélidos es una actividad de importancia e impacto en el desarrollo socio económico de la población altoandina, no solo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones medioambientales, sino por su utilización como una fuente alimenticia de proteína de origen animal y como un recurso para la producción de fibra de buena calidad (Huanca *et al.*, 2007). La Región del Cusco, es la segunda productora de llamas a nivel nacional con alrededor de 122.000 ejemplares en 9900 unidades familiares, la mayor parte en las denominadas provincias altas del Cusco (Canas, Canchis y Espinar) (INEI, 2012).

En este sentido se busca obtener mejores resultados en la producción de llamas, implementando biotecnologías como es la inseminación artificial para el avance genético. Sin embargo, uno de los problemas de la IA, es el congelado y descongelado del semen ya que las características seminales se ven afectadas, obteniendo una tasa de preñez mínima en la IA con semen congelado. Quispe (2018), evaluó 2 curvas de congelación en semen de alpacas, una rápida de 15 minutos y una lenta de 62 minutos, siendo la curva rápida superior a la curva lenta en las variables microscópicas evaluadas. Motivo por lo cual planteamos el presente trabajo de investigación, con el título “Efecto de tres curvas de congelación rápida en los parámetros microscópicos del semen de llama (*Lama glama*) empleando un equipo de crioconservación automática de semen” con la finalidad de obtener una curva de congelación adecuada que mejore la supervivencia del espermatozoide y nos permita la utilización de semen congelado.

CAPITULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Peculiaridades del semen

2.1.1 El semen

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino, la porción líquida de dicha suspensión, se conoce como plasma seminal (Hafez y Hafez, 2002). El plasma seminal consiste en una compleja mezcla de secreciones que se originan principalmente en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias del macho (Töpfer-Petersen *et al.*, 2005). Este cumple un rol de protección de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra (Troedsson *et al.*, 2005), donde, por ejemplo, las proteínas presentes en el plasma seminal protegen selectivamente a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los polimorfonucleares neutrófilos presentes en el útero y, asimismo, juegan un rol importante en el transporte y eliminación de espermatozoides muertos (Loomis, 2006).

2.1.2 Células espermáticas

Los espermatozoides se forman en los tubos seminíferos de los testículos, estos tubos contienen una serie de células germinales en desarrollo que finalmente constituirán los gametos masculinos; los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que es necesaria para la motilidad celular; el acrosoma es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide; un cuello une la cabeza del espermatozoide con su cola (flagelo), la cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (Hafez, 1989).

2.2 Métodos de colección de semen

Los primeros trabajos de colección de semen en camélidos sudamericanos (CSA) se hicieron con el uso de fundas vaginales (Mogrovejo, 1952), luego se utilizó electroeyaculación

(Fernández-Baca y Calderón, 1966).

La dificultad en la colección del semen es atribuida entre otras causas, a las características peculiares de monta (posición de cúbito ventral), que dura entre 20 a 30 min, aproximadamente (Laruta *et al.*; 2016).

2.2.1 Electroeyaculación

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, 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).

En principio, implica tranquilizar al animal por vía intravenosa con una mezcla de xilaxina, en dosis de 0,2 mg/kg y de ketamina 1,5 mg/kg; la colección se realiza con el animal acostado; la sonda del electro eyaculador consta de tres electrodos, lo cual es introducida sobre la próstata, cuya profundidad es evaluada por medio de un transductor ecográfico, la estimulación ocurre mediante impulsos eléctricos de 0,2 voltios a intervalos de un segundo durante tres segundos; el voltaje va incrementando progresivamente de 2 a 10 voltios en 6 a 12 minutos (Giuliano *et al.*, 2008).

2.3 Evaluación de características seminales

El espermiograma convencional utilizado para evaluar una muestra de semen incluye la evaluación del volumen, concentración espermática, motilidad, viabilidad, morfología, entre otros, algunos de estos parámetros tienen el inconveniente de que se realiza de forma subjetiva, limitando la información sobre el potencial fértil de una muestra seminal (Maroto, 2012). Sin embargo, los avances tecnológicos realizados han permitido valorar las características espermáticas de forma objetiva, así se han desarrollado sistemas automáticos de análisis de semen (CASA) (Verstegen *et al.*, 2002).

2.3.1 Características macroscópicas del semen

A. Volumen

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

Cuadro 1. Volumen seminal (Media \pm DS) en llamas colectadas por el método de electroeyaculación.

Autor	Media \pm DS(ml)
Carretero <i>et al.</i> , (2012)	2.8 \pm 1.6
Rodríguez (2013)	1.6 \pm 0.69
Laruta <i>et al.</i> , (2016)	1.67 \pm 0.29
Valle (2013)	0.25
Ccoiso (2019)	3.63 \pm 1.64
Gallegos (2019)	3.8 \pm 0.80

Fuentes: indicadas.

B. Color

Tibary y Vaughan (2006), reportan que el color del semen podría depender de la concentración espermática y la proporción de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias.

Cuadro 2. Color seminal (%) de llamas colectadas por el método de electroeyaculación.

Autor	Color	%
Ccoiso (2019)	Blanco cristalino	80
	Blanco lechoso	20
Gallegos (2019)	Cristalino brillante	56.3
	Blanco lechoso	34.4
	Gris	9.4
Rodríguez (2013)	Blanco lechoso	73.4
	Blanco cremoso	13.3
	Blanco cristalino	13.3

Fuentes: indicadas.

C. Filancia

Dos de las más importantes características que presenta el PS, son su capacidad de formar hilo cuando se lo pipetea y de presentar viscosidad estructural alta (Casaretto *et al.*, 2012). Con respecto al manejo del semen, estas características reológicas dificultan la separación de los espermatozoides del plasma, la dilución del eyaculado, la homogeneidad de las muestras, la separación en alícuotas y el envasado en pajuelas (Giuliano *et al.*, 2010).

Cuadro 3. Filancia seminal (Media \pm DS) en llamas colectados por el método de electroeyaculación.

Autor	Media \pm DS(cm)
Ccoiso (2019)	3.63 \pm 0.93
Gallegos (2019)	3.7 \pm 0.64

Fuentes: indicadas.

D. Potencial de hidrogeniones

Un pH aproximado es de 7.0 (de 6.9 a 7.5 para las diferentes especies) cae en límites de actividad óptima de la mayoría de las enzimas del espermatozoide, por lo tanto, si se mantiene un pH neutro (7.0) se espera una tasa metabólica elevada; si el pH del semen se desvía hacia la alcalinidad o acidez, se reducirá el índice metabólico (Sumar, 1991). Se requiere de un metabolismo energético por fosforilización oxidativa a nivel de las mitocondrias presentes en la pieza intermedia o por glicólisis para la movilidad espermática; los espermatozoides de los bovinos requieren del metabolismo mitocondrial, mientras que los espermatozoides de la mayoría de las especies dependen de la glicolisis (Flores y Vilanova, 2015).

Cuadro 4. Potencial de hidrogeniones (Media \pm DS) en semen de llama colectado por el método de electroeyaculación.

Autor	Media \pm DS
Quispe y Delgado (2012)	7.7
Gallegos (2019)	7 \pm 0.1
Ccoiso (2019)	7.25 \pm 0.48
Valle (2013)	7.08

Fuentes: Indicadas.

2.3.2 Características microscópicas del semen

A. Motilidad

González (2000), indica que la motilidad es una característica de la célula espermática y se trata de uno de los parámetros más importantes en las concentraciones seminales, debido a que es imprescindible para que se produzca la fecundación del ovulo, pero no es sinónimo de fertilidad.

El porcentaje de motilidad es muy importante sin embargo en la mayoría de casos la motilidad es inferior al 60%; además la mayoría de los espermatozoides de un eyaculado no diluido realizan movimientos oscilatorios sobre sí mismos y solamente entre el 5 y 10% muestran movimiento progresivo (Bravo *et al.*, 1997; Ordoñez *et al.*, 2013).

La motilidad individual de la llama es lenta, lineal y rotatoria, es decir que la motilidad espermática de la llama es en mayor porcentaje de movimientos no progresivos y estáticos en relación al porcentaje de los espermatozoides motiles progresivos de un mismo eyaculado, que se muestra siempre menor, por el carácter filante que presenta el semen de la llama (Rodríguez, 2013).

Cuadro 5. Porcentaje de motilidad espermática (Media \pm DS) en llamas, colectados por el método de electroeyaculación.

Autor	Estado	Media \pm DS(%)
Laruta <i>et al.</i> , (2016)	Fresco	22.8 \pm 5.6
Giuliano <i>et al.</i> , (2019)	Fresco	32.3 \pm 20,4
Ccoiso (2019)	Fresco	63.36 \pm 15.53
Fumuso <i>et al.</i> , (2021)	Fresco	47.2 \pm 12.6
Cucho <i>et al.</i> , (2021)	Fresco	44.68 \pm 18.93
Carretero <i>et al.</i> , (2014)	Refrigerado	23.2 \pm 21.2
Giuliano <i>et al.</i> , (2019)	Refrigerado	15.5 \pm 19,1
Fumuso <i>et al.</i> , (2021)	Refrigerado	43.1 \pm 16.4
Carretero <i>et al.</i> , (2014)	Descongelado	3.2 \pm 6.0
Laruta <i>et al.</i> , (2016)	Descongelado	17.03 \pm 1.83
Fumuso <i>et al.</i> , (2021)	Descongelado	11.5 \pm 7.1

Fuentes: indicadas.

Cuadro 6. Porcentaje (Media \pm DS) de espermatozoides móviles progresivos (EMP) y espermatozoides móviles no progresivos (EMNP) colectados por el método de electroeyaculación en llamas.

Autor	Estado	Variables	
		EMP	EMNP
		Prom \pm DS(%)	Prom \pm DS(%)
Giuliano et al., (2010)	Fresco	4.4 \pm 10.43	-
Rodríguez (2013)	Fresco	1.2 \pm 2.0	12.7 \pm 2.0
Valle (2013)	Fresco	-	54.67
Ccoiso et al., (2019)	Fresco	4.41 \pm 10.43	58.95 \pm 13.56
Fumuso et al., (2021)	Fresco	6.0 \pm 10.8	41.2 \pm 10.3
Fumuso et al., (2021)	Refrigerado	1.2 \pm 3.5	41.9 \pm 17.1
Fumuso et al., (2021)	Descongelado	1.7 \pm 4.4	9.8 \pm 7.4

Fuentes: indicadas.

Cuadro 7. Parámetros de velocidad (Media \pm DS) de espermatozoides (Media \pm DS) en semen de llama en fresco colectado por electroeyaculación.

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

Fuentes: indicadas.

Cuadro 8. Parametros de velocidad (Media \pm DS) en espermatozoide de alpaca colectado por electroeyaculación.

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

Fuente: Flores *et al.*, (2021)

B. Concentración

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

Cuadro 9. Concentración espermática (Media \pm DS) en llamas colectado por electroeyaculación.

Autor	Media \pm DS (10 ⁶ /ml)
Ccoiso (2019)	101.71 \pm 39.52
Gallegos (2019)	97.14 \pm 44.22
Rodriguez (2013)	84.39 \pm 71.93
Laruta <i>et al.</i>, (2016)	39.14 \pm 11.22
Casaretto <i>et al.</i>, (2012)	78.43 \pm 101.48
Carretero <i>et al.</i>, (2009)	148.4 \pm 164.4

Fuente: Indicadas.

C. Vitalidad

Garner (1997) demuestra que el estudio de la viabilidad espermática se basa en el análisis de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, usando dos fluorocromos combinados: un fluorocromo es capaz de traspasar las membranas plasmáticas

dañadas o degeneradas, lo que permite identificar a las células muertas o en proceso de degeneración, sin embargo el otro fluorocromo es capaz de traspasar membranas celulares intactas lo que permite identificar la población de espermatozoides viables.

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). La frecuencia de vivos (espermatozoides blancos) y muertos (espermatozoides rojos) se expresó en porcentaje (Cabrera y Pantoja, 2012)

Cuadro 10. Vitalidad espermática (Media \pm DS) en llamas, colectado por el método de electroeyaculación.

Autor	Estado de semen	Media \pm DS(%)
Laruta, et al., (2016)	Fresco	86.67 \pm 5.77
Fumuso et al., (2019)	Fresco	66.5 \pm 10.1
Giuliano et al., (2019)	Fresco	54,1 \pm 17,0
Ccoiso (2019)	Fresco	61.32 \pm 12.85
Fumuso et al., (2021)	Fresco	54.8 \pm 13.9
Cucho et al., (2021)	Fresco	64.56 \pm 13.54
Carretero et al., (2016)	Refrigerado	55.1 \pm 10.6
Giuliano et al., (2019)	Refrigerado	55,5 \pm 9,5
Fumuso et al., (2021)	Refrigerado	52.7 \pm 15.2
Laruta, et al., (2016)	Descongelado	20.13 \pm 2,06
Fumuso et al., (2019)	Descongelado	8.8 \pm 5.6
Fumuso et al., (2021)	Descongelado	14.9 \pm 11.7

Fuentes: indicadas.

D. Funcionalidad de la membrana espermática host

En la actualidad se utilizan varias pruebas que evalúan la integridad y/o funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide de llama como las tinciones vitales con Fluorocromos (tinción con Diacetato de 6-carboxifluoresceína e Ioduro de Propidio) y la prueba de endósmosis o HOST (Giuliano *et al.*, 2008; Carretero *et al.*, 2012; Casaretto *et al.*, 2012). A pesar del uso cotidiano de la técnica de HOS para evaluar espermatozoides de llama, aún no se ha comprobado que tan factible es, fijar la muestra y evaluarla tiempo después, permitiendo así distanciar el momento de evaluación de la extracción de semen (Carretero *et al.*, 2018).

Cuadro 11. Funcionalidad de la membrana espermática (Media \pm DS) en llamas con 50 mOsm, colectado por el método de electroeyaculación.

Autor	Estado	Media \pm DS(%)
Ccoiso, (2019)	Fresco	53.10 \pm 8.14
Giuliano <i>et al.</i>, (2019)	Fresco	36,1 \pm 13,1
Carretero <i>et al.</i>, (2014)	Fresco	30.4 \pm 12.8
Rodríguez, (2013)	Fresco	38.2 \pm 7.2
Giuliano <i>et al.</i>, (2019)	Refrigerado	50,4 \pm 18,9
Carretero <i>et al.</i>, (2016)	Refrigerado	51.6 \pm 12.3
Carretero <i>et al.</i>, (2014)	Descongelado	25.6 \pm 6.7

Fuentes: indicadas.

E. Integridad acrosomal

El acrosoma es una organela membranosa de doble capa que esta ubicada en la parte apical de la cabeza del espermátazoide, esta organela es importante por que contiene enzimas hidrolíticas que son la hialuronidasa y la acrosina las cuales permitirán la fecundación del ovocito (Ugarelli *et al.*, 2017).

Para la evaluacion de la reacción acrosomal y al mismo tiempo la viabilidad espermática se ha utilizado la tinción fluorescente de FITC-PNA/PI (Isotiocianato de Fluoresceína conjugado con *Arachis Hypogea* agglutinin e Ioduro de propidio), sin embargo, esta técnica requiere de equipamiento e insumos costosos, como son el microscopio de fluorescencia y los fluorocromos (Carretero *et al.*, 2015).

Giuliano *et al.*, (2012) pusieron a punto una técnica sencilla, utilizando la tinción de Coomassie Blue (CB), que utiliza la microscopía de campo claro para evaluar el estado acrosomal del espermatozoide, esta coloración permite determinar la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal en el espermatozoide, pero no indica la viabilidad del mismo; en otras especies como es el equino y el porcino se ha utilizado la combinación de la prueba de endósmosis (HOST) que es para la evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática y la tinción de Coomassie Blue (CB) para evaluar estas características simultáneamente (Ferrante *et al.*, 2017).

Cuadro 12.Integridad acrosomal espermática (Media \pm DS) en llamas colectado por el método de electroeyaculación.

Autor	Estado	Media \pm DS(%)	Tinción
Fumuso et al., (2014)	Fresco	81.51 \pm 10.95	Coomasie blue
Carretero et al., (2015)	Fresco	64.44 \pm 13.6	FITC-PNA
Ccoiso (2019)	Fresco	59.18 \pm 6.90	Coomasie blue
Fumuso et al., (2019)	Fresco	79.7 \pm 8.1	FITC-PNA
Cucho et al., (2021)	Fresco	59.33 \pm 7.16	Coomasie blue
Giuliano et al., (2012)	Refrigerado	78.5	Coomasie blue
Giuliano et al., (2012)	Descongelado	61.5	Coomasie blue
Choez et al., (2014)	Descongelado	15.3	Doble tincion
Fumuso et al., (2019)	Descongelado	40.6 \pm 16.0	FITC-PNA

Fuentes: indicadas.

F. Morfometría espermática

Los análisis de morfometría asistido por computadora (CASA) han sido desarrollados para realizar correctamente las medidas de las dimensiones de la forma de la cabeza del espermatozoide, estos programas han mostrado ser precisos y repetibles, además revelan diferencias sutiles entre individuos las cuáles no puede ser detectado con métodos subjetivos (Martí et al., 2011).

Soler et al., (2005), indican que el módulo de morfometría del ISAS® realiza un análisis automático de la morfología y la morfometría espermática a partir de muestras teñidas; además el análisis morfométrico que realiza el ISAS® aporta un total de 14 parámetros como: (tamaño, longitud, anchura, perímetro y área); forma de la cabeza (Elipticidad, elongación, rugosidad, y regularidad); porcentaje del acrosoma, nivel de color de la cabeza, tamaño del acrosoma (área y anchura) y el angulo de inserción como la distancia de inserción de la pieza intermedia del espermatozoide.

Choez, (2010) indica que durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir a daños letales o sub-letales, en la célula espermática, los cuales comprometen su funcionalidad, como su capacidad fertilizante y la reducción o interrupción reversible del metabolismo celular.

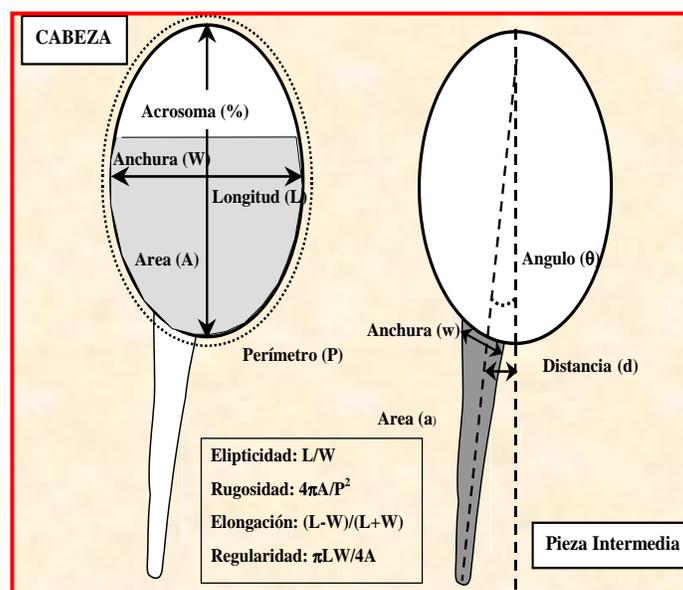


Figura 1. Parámetros de evaluación morfométrica del espermatozoide de llama (cabeza y pieza intermedia) (Fuente: Soler et al., 2005)

Cuadro 13. Morfometría espermática (Media ± DS) de llamas colectados por electroeyaculación, reportes en semen fresco.

Autor	Casaretto et al., (2012)	Rodriguez (2013)	Cucho et al., (2021)	
	Media± DS	Media± DS	Media± DS	
CABEZA	Longitud(μm)	6.6 ± 3.83	5.2 ± 0.5	5.23 ± 0.39
	Ancho (μm)	4.14 ± 2.78	3.1 ± 0.3	3.1 ± 0.27
	Area (μm ²)	20.09 ± 2.75	13.6 ± 1.9	13.55 ± 1.61
	Perimetro (μm)	18.54 ± 0.47	16.6 ± 2	16.61 ± 1.43
	Acrosoma (%)	-	46.3 ± 6.7	51.67 ± 6.23
	Elipticidad (#)	1.28 ± 3.7	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.16
	Rigocidad (#)	-	0.6 ± 0.1	0.62 ± 0.07
	Elongacion (#)	1.59 ± 1.02	0.2 ± 0.1	0.26 ± 0.04
	Regularidad (#)	-	0.9 ± 0.1	0.94 ± 0.05
PIEZA INTERMEDIA	Anchura (μm)	-	1.4 ± 0.4	1.39 ± 0.39
	Area de P.I. (μm ²)	-	3 ± 0.7	2.89 ± 0.84
	Dist. Insercion (μm)	-	0.2 ± 0.2	0.23 ± 0.18
	Ang. Insercion (°)	-	11 ± 13.5	10.72 ± 12.09

Fuentes: indicadas.

Cuadro 14. Morfometría espermática de alpacas (Media \pm DS) en semen descongelado, colectado por electroeyaculación.

Parámetros morfométricos		Desc. 7% GLI	
		Media	\pm DS
CABEZA	Largo (μm)	5.503	0.439
	Ancho (μm)	3.095	0.309
	Área (μm^2)	14.149	1.815
	Perímetro (μm)	16.56	1.442
	Acrosoma (%)	50.081	7.261
	Elipticidad(#)	1.793	0.222
	Rugosidad (#)	0.653	0.077
	Elongación (#)	0.279	0.056
	Regularidad (#)	0.946	0.049
		Ancho (μm)	1.483
	Área (μm^2)	3.342	1.001
PIEZA INTERMEDIA	Distancia de inserción (μm)	0.208	1.161
	Angulo de inserción ($^\circ$)	9.242	9.994

Fuente: Ciprian, (2019)

2.4 Crioconservación de semen

La conservación de las estructuras espermáticas y de su capacidad fertilizante exige la reducción o interrupción reversible del metabolismo celular, durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir, en la célula espermática, daños letales o sub-letales los cuales comprometen su funcionalidad (Choez, 2010).

2.4.1 Degelificación

El mayor impedimento para desarrollar protocolos de criopreservación probablemente sea la viscosidad del semen, la cual puede ser reducida empleando enzimas como la papaína (Kershaw-Young *et al.*, 2013)

Es necesario reducir la viscosidad del plasma seminal sin afectar la función de los espermatozoides antes de la congelación para mejorar el éxito y mejorar el desarrollo de los

protocolos de crioconservación en los camélidos (Kershaw-Young *et al.*, 2012).

2.4.2 Diluyente o dilutor

Por diluyentes entendemos la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, para preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado (Carballo, 2009).

Un buen diluyente debe realizar las siguientes funciones: a) contener nutrientes como reserva de energía, b) proteger del efecto nocivo del enfriamiento rápido por medio de lipoproteínas y colesterol presentes por ejemplo en la yema de huevo c) ajustar las alteraciones del pH, d) promover una presión osmótica y concentración de electrólitos normales, e) incrementar el volumen del semen y g) poseer crioprotectores que reduzcan los daños a las células durante la congelación y descongelación (Barrera *et al.*, 2008; Yildiz *et al.*, 2000).

El diluyente que se añade para congelación generalmente es del tipo TRIS (buffer), el diluyente debe contener sustancias iónicas o no iónicas que mantengan la osmolaridad del medio (TRIS), una fuente de lipoproteína de alto peso molecular (yema de huevo, leche descremada), una fuente de energía como fructosa o glucosa, y un rico crioprotector (Escobar, 2011).

A. Tris

Holt (2000), reporta que este es capaz de regular la concentración de iones hidrógeno y neutraliza los productos de desecho del metabolismo de los espermatozoides.

B. Ácido cítrico

El ácido cítrico es usado frecuentemente junto con el Tris como parte del diluyente, siendo esta sustancia un contribuyente en la preservación del pH; los iones citrato, presentes en el ácido cítrico, forman sales llamadas citratos con muchos iones metálicos, estas sales generan unas condiciones de tolerancia al cambio del pH en la solución, adicionalmente a ello el ácido cítrico funciona como un antioxidante, característica que lo hace útil pensando en mitigar los cambios de pH en la solución donde se encuentran los espermatozoides (Silva, 2007).

C. Crioprotector

Los crioprotectores son componentes importantes de los dilutores, pues permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas y, en consecuencia, una menor concentración de electrolitos, posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación (Stornelli *et al.*, 2005).

En los medios de congelación se incluyen sustancias crioprotectoras, que se pueden dividir en no permeables (azúcares, proteínas y lipoproteínas, que se adicionan mediante el uso de productos naturales como la yema de huevo y la leche descremada) y permeables siendo el glicerol el más utilizado (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Crioprotectores no permeables

Son sustancias de alto peso molecular, utilizadas a velocidades altas de congelación, son importantes ya que su acción promueve la rápida deshidratación celular y suelen ser usados asociándose a agentes penetrantes; los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano, estos compuestos generalmente son polímeros que forman puentes hidrógeno con el agua, reduciendo la actividad del agua a una magnitud mucho mayor que la que se calcularía por su concentración molar, por lo que no obedecen a la ley de Raoult; la adición del crioprotector genera estrés osmótico sobre las células porque aumenta la osmolaridad del medio; las células al inicio se deshidratan para compensar la fuerza osmótica causada por la presencia de los ACP y después se hidrata, la definición de los parámetros biofísicos de cada célula y el estudio de la interacción con los ACP durante el proceso de congelación y descongelación de las células deben ser determinados para establecer los límites físicos que garanticen la supervivencia de la célula (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Como no penetran en la célula, no son crioprotectores propiamente dichos, pero ejercen su acción promoviendo la deshidratación celular (Boiso, 2001).

Crioprotectores permeables

El uso de crioprotectores permeables es esencial para la viabilidad pos descongelamiento

de los espermatozoides, ya que se minimiza la formación de hielo intracelular; sin embargo, la introducción y remoción de estos agentes crioprotectores pueden dañar la célula (Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005; Valdivia *et al.*, 2005). Los crioprotectores permeables son sustancias nocivas para los espermatozoides debido fundamentalmente a la inducción de daños osmóticos que provocan, por ello es muy importante la concentración a la cual se añaden al medio de congelación (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Son de bajo peso molecular y permeable a través de la membrana celular, son utilizados: El glicerol, dimetilsulfoxido (DMSO), propanediol (PROH) y dimetilformamida (DMF) (Zirena, 2014).

Glicerol

EL glicerol atraviesa la membrana celular debido a su bajo peso molecular (Medeiros *et al.*, 2002), y reduce el estrés de enfriamiento de las células actuando a través de un mecanismo de “sal buffer”, deshidratando las células, consiguiendo disminuir el volumen de agua intra-celular disponible para congelarse, pero manteniendo el volumen celular (Rasul *et al.*, 2007), lo que evita el colapso de las células por una deshidratación excesiva (Medeiros *et al.*, 2002).

D. Yema de huevo

Se ha demostrado que la yema de huevo sirve para proteger al espermatozoide del daño producido durante el enfriamiento y descongelamiento (Zirena, 2014; Salomón y Maxwell, 2000). Esta acción protectora se atribuye a las proteínas de baja densidad (LDL – low density proteins) (Moussa *et al.*, 2002).

Moussa *et al.*, (2002); Amirat *et al.*, (2005) demostraron que las LDL son responsables del proceso de solidificación en la crio preservación, durante el cual se alterarían las estructuras de las LDL favoreciéndose la deshidratación de los espermatozoides, confiriendo así resistencia al shock térmico del proceso de congelación-descongelación, sin embargo, el mecanismo preciso por el que la yema de huevo ayuda a la protección de los espermatozoides no ha sido claramente establecido.

Maxi (2019), reporta que la yema de huevo de gallina y codorniz tuvieron mejores resultados en los parámetros de vitalidad e integridad acrosomal durante la criopreservación e incubación de los espermatozoides de alpaca en comparación a la yema de huevo de pata y recomienda usar yema de huevo de codorniz y gallina para criopreservación de semen de alpaca.

2.5 Congelación

Un gran número de protocolos de congelación han sido desarrollados, debido principalmente a las diferencias observadas entre especies, como respuesta a las tasas de congelación y descongelación empleadas, por esta circunstancia, las técnicas y procedimientos actuales deben ser validados empleando el semen de la especie de interés, para de esta forma lograr su conservación a largo plazo sin afectar significativamente su capacidad fecundante (Woelders, 1993; Ciereszco *et al.*, 1999).

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 durante el rango crítico de congelación, 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).

2.5.1 Velocidades de enfriamiento

La sobrevivencia después de la crioconservación de muchos tipos de células, incluyendo los espermatozoides, es fuertemente dependiente de la tasa de congelación y descongelación, y especialmente de la temperatura a la cual las células son enfriadas antes de su introducción en nitrógeno líquido, fenómeno conocido como “temperatura intermedia de sumergimiento sub-cero” (Watson *et al.*, 1992; Sukhato *et al.*, 2001).

Se ha reportado que uno de los factores críticos para la sobrevivencia de las células durante el proceso de congelación, es abolir la formación de cristales de hielo intracelular, por medio de una deshidratación adecuada antes de que estas células seas sumergidas en nitrógeno líquido, lo cual también esta estrechamente relacionado con las bajas tasas de enfriamiento que

permiten un mayor eflujo de agua intracelular (Mazur, 1970; Medina et al., 2005)

Si la velocidad con que desciende la temperatura es muy rápida, la célula puede no ser capaz de deshidratarse suficientemente rápido y al llegar a la temperatura de nucleación, el agua remanente se congela formando hielo intracelular; si por el contrario la velocidad de enfriamiento es demasiado lenta, la deshidratación será extrema pudiéndose llegar al colapso celular (Boiso, 2001).

Con una velocidad de enfriamiento adecuada, la célula se deshidratará y concentrará intracelularmente antes de alcanzar la temperatura de nucleación, de forma que la posibilidad de congelación intracelular y consecuentemente de daño celular se minimizará (Mazur, 1984). Por tanto, la supervivencia celular será máxima a una velocidad de enfriamiento óptima, que es específica para cada tipo celular (Boiso, 2001).

Westendorf *et al.*, (1975), reporta que para congelar semen porcino se utiliza una curva lenta, donde se produce un descenso paulatino de la temperatura por un tiempo muy prolongado, alrededor de 5 horas. Miragaya *et al.*, (2001). Indica que desarrollaron un protocolo de congelación para semen equino, aplicando una curva rápida, que consta de una estabilización corta, un descenso rápido en dos fases hasta alcanzar los -120°C y finalmente la inmersión de las pajuelas en nitrógeno líquido a -196°C . Así como también el fabricante equipo congelador automático modelo Cryologic - CL8800i ofrece protocolos estándar para semen con velocidades de enfriamiento ya determinadas para equinos (24°C a -6°C por 80 minutos), bovinos (20°C a -45°C por 1 minutos), ovinos y caprinos (22°C a -50°C por 80 minutos), porcinos (20°C a -35°C por 130 minutos) y Buffalo (20°C a -50°C por 43 minutos). Son curvas ya determinados para estas especies, pero para camélidos no se encuentra una curva de congelación establecida.

2.6 Descongelado

La descongelación lenta se lleva a cabo también mediante el uso de un congelador programable, mientras que la descongelación rápida se hace a temperatura ambiente o usando

un baño de agua a 30°C, para evitar la recristalización (Boiso, 2001).

Sin embargo Cayo, (2013); Quispe, (2015); Franco, (2015) indican que el proceso de descongelación se realiza a 37 °C por 30 segundos.

Cuba (2000) reporta que no hay diferencias significativas para motilidad y vitalidad en semen descongelado a diferentes tiempos: 24 horas, 7, 15 y 30 días.

2.7 Equipo de congelación automática de semen

Existen básicamente dos métodos de congelación de semen, el convencional y el automatizado, donde, luego del refrigerado del semen el método convencional consiste en colocar las pajillas 6 cm por encima de la superficie líquida durante 20 minutos en una gradilla de metal dentro de una caja de poliestireno con nitrógeno líquido cumplido el tiempo de congelación a vapores de nitrógeno las pajillas son inmersas en nitrógeno líquido, posteriormente, almacenadas en un termo de nitrógeno; sin embargo para el método automatizado, la muestra envasada y posterior a ello las pajillas son congeladas utilizando un equipo congelador de semen automático con un protocolo estándar según recomendaciones del fabricante, luego de la congelación las pajillas son almacenadas directamente en el termo de nitrógeno líquido (Vasconcelos-Filho, 2010).

Generalmente, se utiliza el método convencional de congelación, utilizando materiales simples como la nevera, para iniciar la curva de enfriamiento, y la congelación en una caja de poliestireno con nitrógeno líquido; esta técnica ha demostrado ser viable, aunque la estandarización de las curvas de enfriamiento y congelación son imprecisas, además que dependen de la calidad del material utilizado, como sellamiento de la nevera, tamaño de la caja de poliestireno y el nivel de nitrógeno. De esta manera, se han desarrollado sistemas electrónicos automatizados portátiles, de bajo costo para el control de las curvas de congelación del semen (Gonzalez, 2004).

La estandarización de la curva de enfriamiento y de congelación parece ser una ventaja del método automatizado sobre la convencional, ya que durante la técnica manual esa

estandarización es difícil, ya que depende de la calidad del material utilizado y existe el riesgo de una posible falla humana; además, la practicidad de tener todas las etapas controladas por un aparato constituye otra ventaja (Vasconcelos, 2010).

Se hizo el uso de estos métodos de congelación de semen en bovinos donde González (2004) reporta no haber observado diferencias significativas entre las técnicas de congelación de semen como son la técnica convencional y la técnica de congelación automatizada para los parámetros de evaluación como la motilidad, vigor e integridad de membrana plasmática acrosomal y mitocondrial. Entre tanto también Vasconcelos (2010) indica que obtuvo mejores resultados para motilidad y vigor después de la crioconservación utilizando la técnica automatizada de congelación en semen bovino.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1 Lugar de estudio

3.1.1 Ubicación geográfica

El trabajo de investigación se ejecutó en el Centro de Investigación en 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. Se halla comprendido entre:

- Latitud Sur. 14°28.448'
- Longitud Oeste. 71°02.753'
- Altitud. 4133 msnm (GPS Garmin© Oregón 300)
- Promedio de precipitación pluvial. 965 mm.
- Temperatura promedio Anual. 6.5 °C - 13.5 °C.

(Fuente: Estación meteorológica de La Raya, 2021).



Foto 1. Instalaciones del Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS

– La Raya

3.2 Materiales y equipo

3.2.1 Materiales biológicos

Se utilizaron 4 llamas machos reproductores, para realizar las colecciones de semen por el método de electroeyacuación.

3.2.2 Equipos y materiales para la colección de semen



Foto 2. Equipo y materiales para la colección de semen por electroeyacuación.

- Electroeyaculador (ElectroJac5®).
- Xilacina (Dormi-Xyl®2, Agrovvet Market)
- Ketamina (Halatal KT, Montana)
- Jeringas de 10ml
- Agujas hipodérmicas N° 21
- Alcohol 96°
- Algodón
- Guantes quirúrgicos
- Frazadilla térmica
- Tubos falcón de 15ml
- Gel
- Trabas
- Colchón
- Papel toalla

3.2.3 Equipo de congelación automática de semen

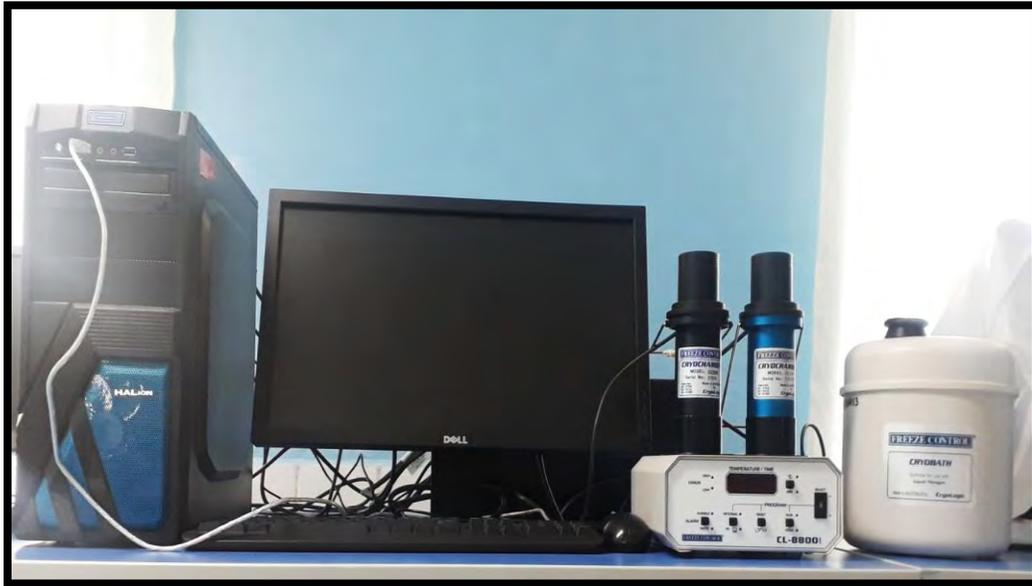


Foto 3. Equipo de congelación automática de semen y embriones (Cryologic - CL8800i).

- Freeze control modelo CL-8800
- Cryochamber modelo CC23S (semen)
- Cryochamber modelo CC23F (embriones)
- Cryobath para el nitrógeno líquido.
- Software CG5 CryoGenesis
- 8 programas preinstalados, también pueden programarse otros a través del software CryoGenesis
- Rango de temperaturas: +40°C a -120°C

3.2.4 Equipos de laboratorio

- Microscopio de contraste de fases, fluorescencia, platina térmica (UOP UB200i), videocámara (Proiser ISAS 782C) y computadora (con programa ISAS v.1.2).
- Platina

- Baño seco
- Refrigeradora
- Motic microscopio
- Termocouple (Oakton Temp 10K)
- Balanza de precisión (Highland-Adam Equipment, 120g x 0.001g).
- Osmómetro
- Vortex

3.2.5 Materiales de laboratorio

- | | | |
|----------------------|----------------------|-----------------|
| • Micropipeta | • Tuberculinas | • Cortapajillas |
| • Portaobjetos | • Pajillas | • Termo |
| • Cubreobjetos | • Globets | • Hervidora |
| • Vasos precipitados | • Porta globets | • Tips |
| • Tubos falcón | • Canastillas | • Algodón |
| • Tubos eppendorf | • Termo de nitrógeno | |

3.2.6 Reactivos e insumos

- | | | |
|------------------------|-----------------------|------------------------|
| • Papaína | • Fructuosa | • Glicerol al 7% |
| • Inhibidor de papaína | • Formaldehido al 40% | • Alcohol polivinílico |
| • Eosina/Nigrosina | • PBS | • Alcohol de 90° |
| • Citrato de sodio | • Aceite de inmersión | • Metanol |
| • Hemacolor | • Base tris | • Acido acetico |
| • Comasielblue | • Ácido cítrico | • Huevo de codorniz |

3.2.7 Equipo y materiales de escritorio

- | | |
|---------------------------|----------------------|
| • Laptop con programa SAS | • Cuaderno |
| • Lapicero | • Cámara fotográfica |

3.3 Metodología de la investigación

3.3.1 De los animales

A. Selección

Se seleccionaron 4 llamas machos reproductores del centro de investigación de camélidos sudamericanos, CICAS La Raya, que respondieron eficazmente a la colección de semen por el método de electroeyaculación.

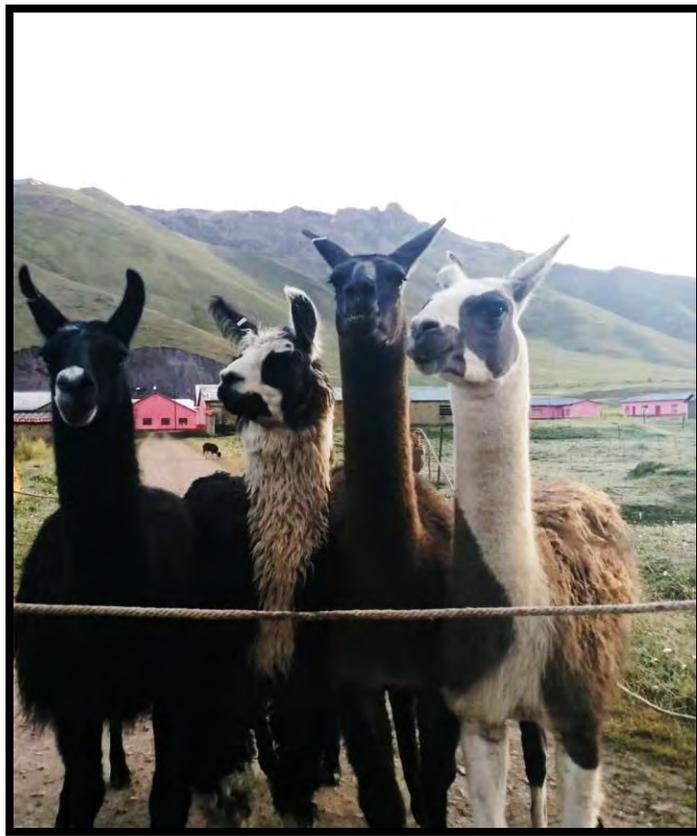


Foto 4. Llamas machos seleccionados para la colección de semen.

B. Peso y edad

Se realizó la toma de datos del peso y edad de los 4 animales, el peso fue evaluado mediante el uso de una balanza, este acto se hizo para determinar la dosis de xilacina y ketamina para la sedación de los animales antes de la colección de semen por el método de electroeyaculación, también se registró su edad por la fecha de nacimiento que indica su arete.

Cuadro 14. Raza, edad y peso de las llamas machos utilizados para la ejecución del trabajo de investigación.

Llama	Arete	Raza	Peso (Kg)	Edad (Años)
1	LL1145	Q 'ara	136.6	7
2	LL1207	Ch'aku	133.6	6
3	LL1345	Q 'ara	150.8	5
4	LL1374	Q 'ara	153.4	6
Media			143.60	6.00
DS			9.95	0.82



Foto 5. Peso de los animales usando una balanza digital.

C. Evaluación clínica de los testículos

Se evaluaron los testículos para descartar alguna anomalía, también se midieron el largo y ancho de los testículos izquierdo y derecho de cada animal con ayuda de un vernier digital, para observar las diferencias que existe entre los animales y reconocer el efecto que se produce por el factor animal ya que la muestra seminal está relacionado al tamaño testicular.

Cuadro 15. Biometría de los testículos de las llamas utilizadas en el presente trabajo de investigación.

Llama	Testículo derecho		Testículo izquierdo	
	Largo(cm)	Ancho(cm)	Largo(cm)	Ancho(cm)
1	5.28	2.85	5.6	2.74
2	5.06	2.74	4.72	2.4
3	5.55	2.87	5.82	2.75
4	6.38	2.62	6.28	2.49
Media	5.57	2.77	5.61	2.60
DS	0.58	0.12	0.65	0.18



Foto 6. Medición de los testículos de los machos con un vernier digital.

D. Alimentación

Los animales se alimentaron al pastoreo en un pastizal dominado por a la familia de las Poaceas (60.08%), seguido de las Cyperaceas (15.18%), Rosaceas (14.68%). De estas especies se estableció que el 69.66% son deseables, el 8.81% son poco deseables y el 12.64% son indeseables (Puma, 2014), con disposición de agua *ad libitum* y se les suministro vitaminas por vía oral cada 15 días.

E. Traslado de las llamas machos

Para realizar la colección seminal, los animales fueron trasladados un día antes de su corral a un galpón cerca al lugar de colección, y evitar el estrés del traslado y la ingesta de alimentos.



Foto 7. Traslado de los animales un día antes de la colección.

3.3.2 Colección de semen de llama por el método de electroeyaculación

A. Intervalo de tiempo de colección

Se realizaron 4 colectas por animal con intervalos de una semana (una colecta por semana), después de haber efectuado 2 colectas, los machos participaron en el empadre controlado de llamas del CICAS La Raya, luego de haber desarrollado este proceso se realizaron las siguientes dos colectas.

B. Sedación

Se realizó la sedación de los cuatro animales con una dosis general de xilacina (1ml) y ketamina (2ml), por vía intravenosa en la pierna. Este proceso se realizó previo a la colección por el método de electroeyaculación, para ello se derribó al macho sobre un colchón y se

sujetaron las patas delanteras y posteriores con trabas para evitar algún accidente (golpes, patadas o movimientos bruscos del ejemplar).



Foto 8. Aplicación de Xilacina y Ketamina por vía intravenosa (pierna).

C. Colección de semen

La colección de la muestra seminal se realizó por el método de electroeyaculación, para ello se utilizó el equipo de electroeyaculador Minitube e320, con el siguiente procedimiento:

1. Se calentaron los tubos falcón de 15ml cubiertos con papel toalla (para evitar que la luz solar llegue directamente a la muestra y evitar daños a los espermatozoides) en una frazadilla térmica a 37°C para mantenerlos calientes y no causar un shock térmico a los espermatozoides al momento de la colección.
2. Una vez recostado el animal después de la sedación se procedió a retirar las heces del recto con guantes y gel para facilitar la limpieza, y no causar lesiones en el recto al introducir la mano.

3. Inmediatamente después se limpió el aparato reproductor del macho (suele haber presencia de orina, polvo, pelos o restos de paja), limpiándolos con papel toalla, para no contaminar la muestra al momento de la colección.
4. Para realizar la colección de semen se sujetó el pene del animal, previo desvaine del prepucio luego este se colocó en el tubo falcón calentado para obtener la muestra seminal.
5. Se colocó gel en el transductor del electroeyaculador y se introdujo por el recto del macho (empezando desde 0.5 V) hasta lograr la erección del pene y posteriormente la colección de semen. Observándose diferencia en la reacción entre los machos en el voltaje y tiempo de colección.
6. La muestra que se obtuvo fue inmediatamente trasladada al laboratorio y colocada en baño seco a 37°C.
7. Terminada la colección de semen se retiró las trabas cuidadosamente y se esperó a que el animal se recupere y levante.



Foto 9. Desvaine del prepucio para la colección de semen por EE.

Cuadro 16. Tiempo de colecta y voltaje alcanzado según el proceso de colección de semen por el método de electroeyaculación en llamas, usando un electroeyaculador (*ElectroJac5®*).

Llama	Colecta	Respuesta a la Colección (Voltios)			Tiempo de colección (Minutos)
		Ereccion	Eyaculacion Inicial	Eyaculacion Final	
1	1	7	9	10	10
1	2	7	10	12	12
1	3	7	9	11	10
1	4	8	10	12	12
2	1	7	8	10	10
2	2	7	10	12	10
2	3	5	7	10	15
2	4	6	8	12	14
3	1	8	10	13	10
3	2	8	10	11	6
3	3	5	8	10	8
3	4	5	6	7	6
4	1	6	8	10	11
4	2	6	7	12	12
4	3	7	10	13	15
4	4	5	6	8	10
Media		6.50	8.50	10.81	10.69
D.S		1.10	1.46	1.68	2.68

3.3.3 Evaluación de las características macroscópicas de semen

A. Color

Inmediatamente después de la colección de la muestra por el método de electroeyaculación, esta característica fue evaluada por la visualización, logrando diferenciar 2 variaciones de colores de la muestra seminal como es el blanco lechoso y blanco lechoso claro.

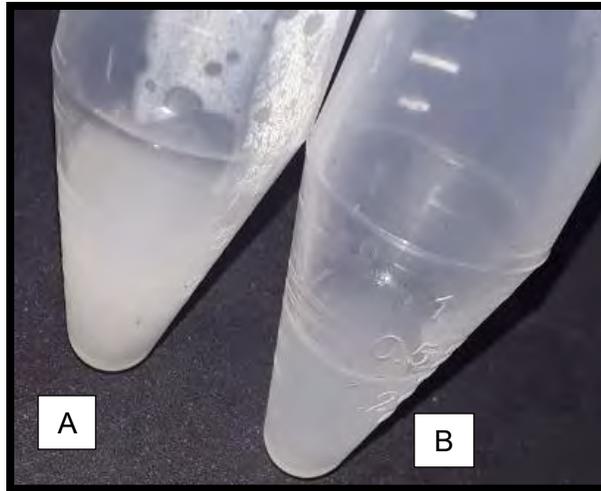


Foto 10. Colores de semen colectado por E.E: A) blanco lechoso y B) blanco lechoso claro.

B. Volumen

Dicha característica se evaluó usando el tubo falcón de 15ml, en el que se colecto la muestra .

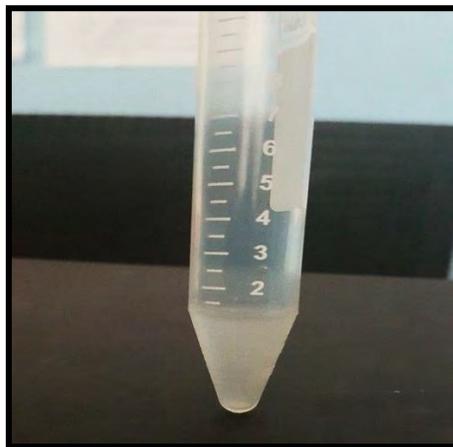


Foto 11. Evaluación del volumen de semen de llama colectado por E.E.

C. Filancia

La filancia fue determinada con ayuda de una micropipeta con la que se absorvio 5 μ L de muestra de semen y se extendió hacia arriba para medir el punto de ruptura en centímetros con una regla.



Foto 12. Evaluación de la filancia del semen colectado por E.E.

D. Potencial de hidrogeniones

El pH se evaluó usando bandas para medir el pH, las que se sujetaron con una pinza sobre la muestra seminal por 5 segundos culminado el tiempo se retiró la banda y se esperó por 5 segundos para observar la coloración, luego se realizó la comparación con los datos de coloración del producto.



Foto 13. Evaluación del pH del semen de llama usando bandas de peachimetro.

3.3.4 Degelificación

Inmediatamente después de haber obtenido la muestra seminal, estas fueron evaluadas y aquellas muestras con motilidad y concentración superior a 35 millones de espermatozoides por ml fueron degelificadas con la enzima papaína (0.1 mg mL^{-1} , 20 min, 37°C), concluido el tiempo de incubación de la papaína se le agrego el inhibidor de papaína E-64 ($10 \text{ }\mu\text{M}$, 5 min, 37°C), cumplido el tiempo de acción del inhibidor las muestras fueron evaluadas.

3.3.5 Evaluación de las características microscópicas de semen

A. Motilidad espermática

Para su evaluación se utilizó una platina térmica a 37°C , en la cual se colocó $5 \text{ }\mu\text{L}$ de muestra en un portaobjetos y luego un cubreobjetos, este se visualiza en el microscopio con el objetivo 10x y se capturan 6 fotos en el módulo de motilidad del ISAS.

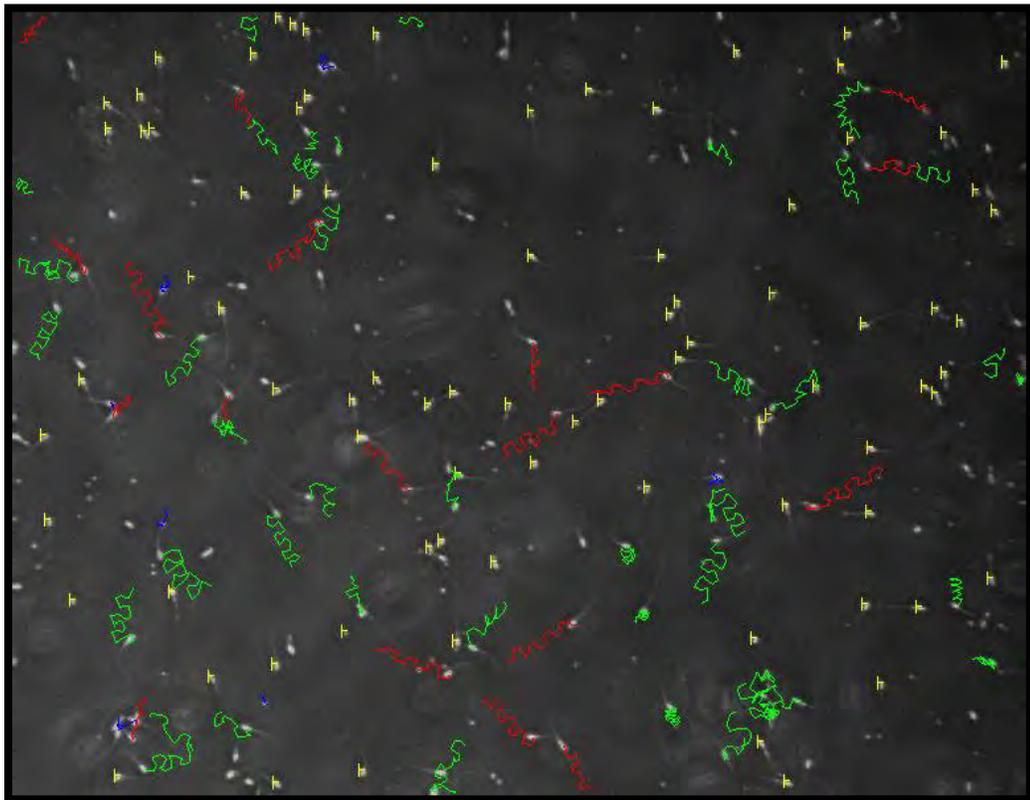


Foto 14. Evaluación de la motilidad espermática usando el ISAS.

B. Concentración espermática

El proceso de evaluación fue el mismo que el de motilidad ya que el equipo nos brinda la información al momento de realizar la captura de las fotos para motilidad. El resultado es expresado en millones de espermatozoides por ml.

C. Vitalidad espermática

Su evaluación se determinó con tinción eosina – nigrosina (Tribulo, 2009):

1. La muestra seminal obtenida se colocó en baño seco a 37°C.
2. Se calentó los portaobjetos y cubreobjetos en una platina térmica a 37°C.
3. Se calentó la eosina y nigrosina en el baño seco a 37°C
4. Se rotulo la lámina portaobjetos con los datos de la llama macho, fecha de colección, estado de la muestra y el nombre de la característica a evaluar.
5. En un portaobjetos se colocó 5 μ L de muestra inmediatamente después se colocó 5 μ L de eosina y luego 5 μ L de nigrosina, se mezcló y se realizó el frotis.
6. El frotis secó a temperatura ambiente y luego se observó en el microscopio BA310 Motic con objetivo 100X con aceite de inmersión y se utilizo el software Motic Imagen Plus 2.0 ML para el conteo de 200 espermatozoides: vivos (color blanquecino) y muertos (color rojizo).



Foto 15. Evaluación de la vitalidad espermática con tinción eosina – nigrosina.

D. Morfometría espermática

La morfometría fue evaluada según el procedimiento del kit de coloración Hemacolor® de la siguiente manera:

1. Se rotuló la lámina portaobjetos con los datos de la llama macho, fecha de colección, estado de la muestra y el nombre de la característica a evaluar.
2. Se colocó 5 μL de muestra y se realizó el frotis dejando secar a temperatura ambiente.
3. Una vez seco el frotis se realizó la tinción utilizando el kit de Hemacolor el cual consta de 3 soluciones, continuando con el siguiente protocolo:
 - Solución I: sumergir el frotis por 5 veces.
 - Solución II: sumergir el frotis por 3 veces.
 - Solución III: sumergir el frotis por 6 veces.
4. Terminado este proceso, se hizo secar el frotis en posición vertical a temperatura ambiente.
5. Se observó con el objetivo 100x con aceite de inmersión en el módulo de morfometría del ISAS, previo lavado del envés del portaobjetos con algodón y alcohol.
6. Se tomaron 200 fotos de espermatozoides.

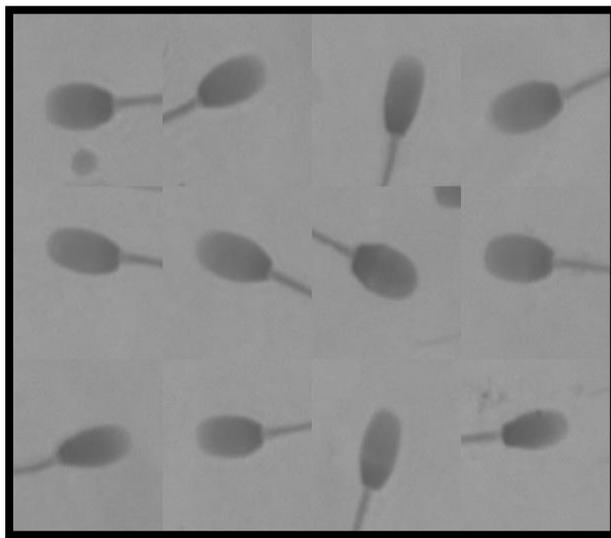


Foto 16. Imágenes de los espermatozoides capturadas en el microscopio

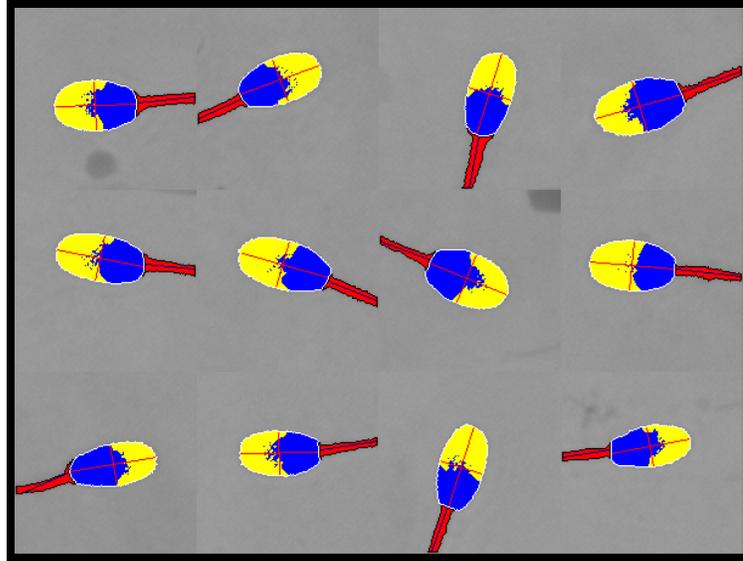


Foto 17. Evaluación de la morfometría espermática imágenes digitalizadas con un sistema ISAS®.

E. Funcionalidad de la membrana espermática

Esta característica microscópica fue evaluada con el procedimiento descrito por Jeyedran *et al.*, (1984):

1. Se rotuló los datos de la llama macho, fecha de colección, estado de la muestra y el nombre de la característica a evaluar en el tubo eppendorf.
2. Se colocó 100 μL de solución hiposmotica en un tubo eppendorf que esta en baño seco a 37°C e inmediatamente se adicionó 25 μL de muestra dejando incubar por 5 minutos.
3. Cumplido el tiempo se adiciono 31 μL de solución formolada, y se retiró el tubo eppendorf del baño seco.
4. Para la lectura de la funcionalidad de membrana espermática, se puso 5 μL de la mezcla sobre un portaobjetos y se colocó un cubreobjetos el cual fue visualizado con el objetivo 40X del ISAS.
5. Se observaron 3 patrones de membrana espermática:
 - I: cola enrollada (reacción fuerte)

- II: cola semienrollada (reacción moderada)
 - III: cola recta (sin reacción)
6. Se contabilizaron 200 espermatozoides.

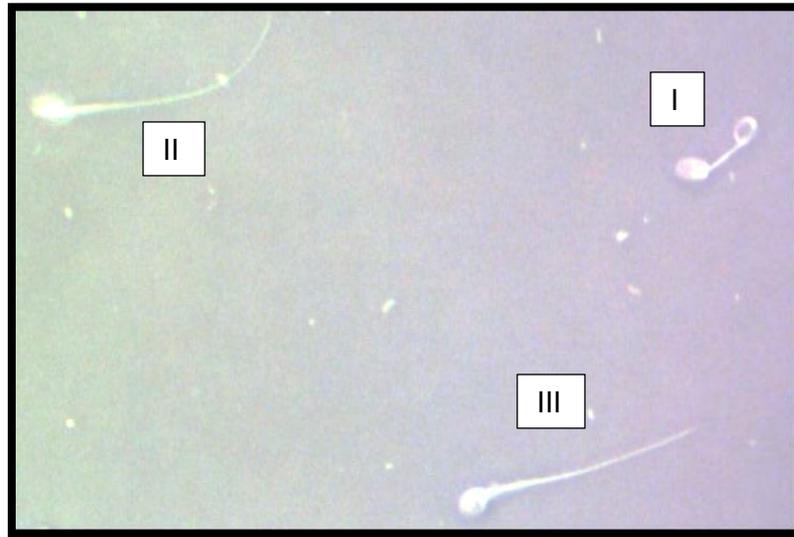


Foto 18. Evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática (HOST).

F. Integridad acrosomal espermática

El proceso de evaluación de la integridad acrosomal se realizó según lo descrito por Fumuso *et al.*, (2014):

1. Se rotuló la lámina portaobjetos con los datos de la llama macho, fecha de colección, estado de la muestra y el nombre de la característica a evaluar.
2. Sobre la lámina portaobjetos se colocó 5 μ L de muestra de semen enseguida se realizó el frotis dejándolo secar a temperatura ambiente.
3. Una vez seco el frotis, la placa fue sumergida en formaldehído al 4% por 15 minutos. Luego se lavó en PBS sumergiéndolo 2 veces seguidas e inmediatamente se dejó secar por 2 minutos.
4. Cumplido el tiempo de secado, para la tinción la placa fue puesta en comassie blue por 5 minutos. Pronto se lavó en agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente.

5. La placa fue observada en el Motic con objetivo 40X y con aceite de inmersión.
6. Se contabilizaron 200 espermatozoides: con acrosoma (teñido de color azul) y sin acrosoma (sin coloración)

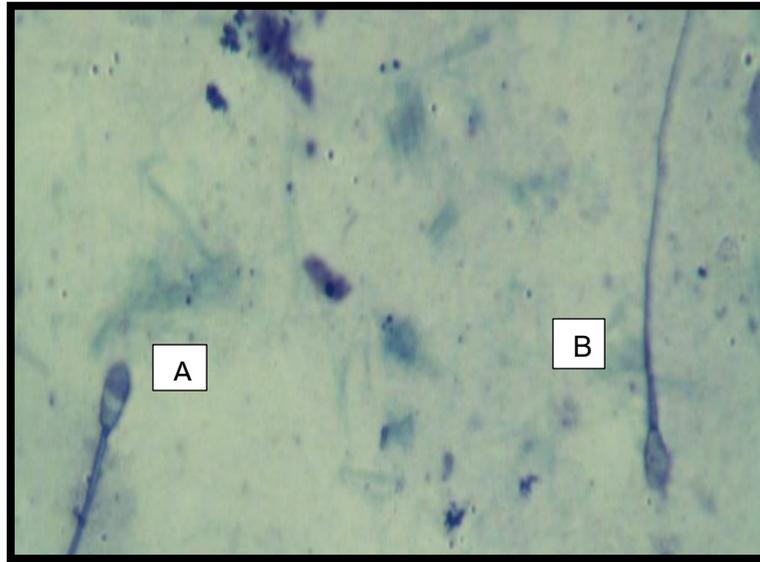


Foto 19. Evaluación de la integridad acrosomal espermática con tinción comassie blue:

A) Con acrosoma y B) Sin acrosoma.

3.3.6 Crioconservación de semen

A. Formulación del dilutor madre

Este fue preparado con:

- 3.028 gr de base tris
- 1.700 gr de ácido cítrico
- 1.250 gr de fructuosa
- 100 ml de agua destilada

El volumen final fue determinado con la siguiente formula:

$$V_f = \frac{\text{muestra(ml)} \times \text{concentración muestra (n x 10}^6\text{)}}{\text{concentración esperada (20 X 10}^6\text{)}}$$

$$\text{DILUTOR} = V_f - \text{muestra (ml)}$$

B. Crioprotector

El crioprotector que se utilizó fue glicerol al 7% y la cantidad utilizada se determinó calculando el 7% de Vf.

C. Yema de huevo

La yema de huevo utilizada fue de codorniz y se utilizó el 25% del Vf.

D. Dilución

Las muestras seminales ya degelificadas y evaluadas sus características microscópicas, fueron diluidas con dilutor madre (base tris) – yema de huevo de codorniz – glicerol al 7% a 37°C.

3.3.7 Refrigeración

La refrigeración es el proceso de enfriamiento de la muestra y para ello la muestra diluida en un tubo falcón fue colocado en un vaso precipitado con agua a 37°C durante 2.5 horas en la refrigeradora hasta que la temperatura del agua descienda a los 5°C.



Foto 20. Proceso de refrigeración de la muestra diluida.

3.3.8 Empajillado y equilibrado

Inmediatamente después de que el agua este a los 5°C, se procedió a empajillar en pajillas de 0.5ml con ayuda de una jeringa de tuberculina modificada, en las pajillas se colocó la muestra sobrando un espacio considerable al final (con aire), las pajillas fueron selladas con

alcohol polivinílico. Las pajillas fueron colocadas de forma horizontal en un envase con agua en un vaso precipitado que se usó para el equilibrado, por 5 minutos.



Foto 21. Proceso de empajillado de la muestra diluida.

3.3.9 Congelación

El proceso de congelación se realizó con el equipo de congelación automático de espermatozoides y embriones modelo CL8800i, el cual cuenta con curvas ya definidas para otras especies animal como también se pueden programar curvas, de tal forma que para este trabajo se evaluaron 10 curvas y se seleccionaron aquellas 3 que mostraron buenos resultados en motilidad.

- Para la congelación se programó el equipo con la curva seleccionada, se modificó los comandos del equipo: activar a PC (ya que ahí están grabadas las curvas programadas), se resetea antes y después de iniciar la curva, y se activa el módulo run para correr la curva.



Foto 22. Programación del equipo de congelación automático de semen.

- Se procedió a adicionar nitrógeno líquido hasta las $\frac{3}{4}$ partes del criobath para luego colocar el crio-chamber (equipo encargado de regular las temperaturas de acuerdo a la curva, en el que también se colocan las pajillas)



Foto 23. Proceso de colocación del crio-chamber dentro del criobath con nitrógeno líquido.

- Prontamente se colocaron las pajillas en el criochamber y se tapó el equipo con sus respectivas tapas del criochamber y criobath, para evitar fugas extremas de nitrógeno líquido, rápidamente se hace click en el módulo Star Job en el monitor del equipo para iniciar con la curva de congelación.



Foto 24. Proceso de colocación de las pajillas en el criochamber previo a la congelación.



Foto 25. Pajillas protegidas con la tapa del criochamber.



Foto 26. Criobath con tapa para iniciar la congelacion de pajillas.

A. Curva rápida N°1

La curva 1 fue de 13 minutos la cual inicia en -5°C con descenso de $15^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta los -29°C luego con descenso de $20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta los -40°C siendo estable por 1 minuto continua con descenso de $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los 78°C por 4 minutos luego desciende 15°C hasta los -105°C son descenso de $9^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -114°C y finalmente desciende $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -122°C programado con caída libre(freefall).

B. Curva rápida N°2

La curva 2 fue de 15 minutos la cual inicia en -5°C con descenso de $8^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta los -20°C por 2 minutos, luego con descenso de $12^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta los -35°C siendo estable por 4 minutos continua con descenso de $18^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -52°C luego desciende 10°C hasta los -80°C son descenso de $9^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -89°C y finalmente desciende $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -95°C programado con caída libre(freefall).

C. Curva rápida N°3

La curva 3 fue de 18 minutos la cual inicia en 5°C con descenso de $10^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta los -19°C siendo estable por 3 minutos luego con descenso de $16^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta los -30°C siendo estable por 5 minuto continua con descenso de $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -68°C luego desciende 13°C hasta los -95°C son descenso de $9^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -104°C y finalmente desciende $4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta los -112°C programado con caída libre(freefall).

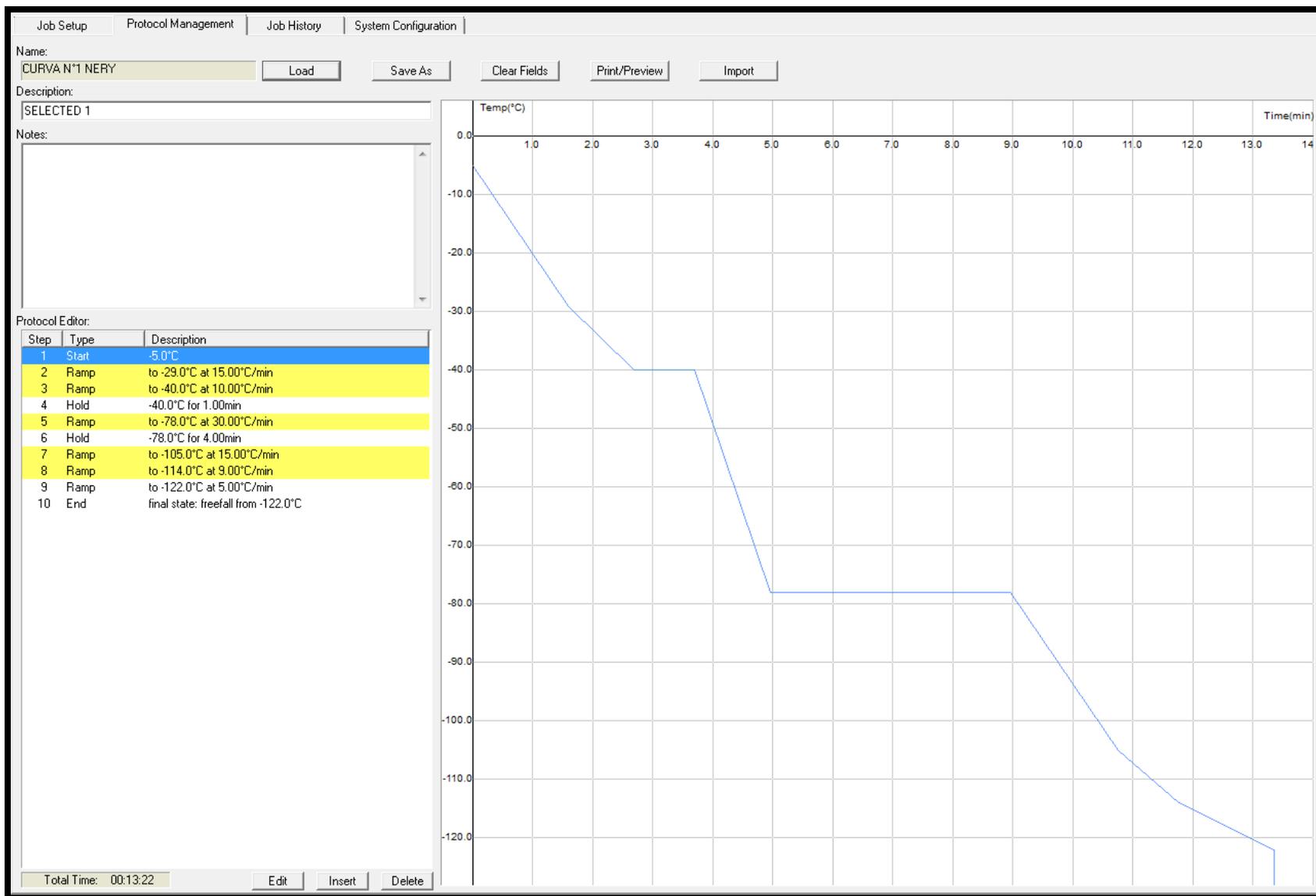


Foto 27. Representación gráfica de la curva rápida N° 1.

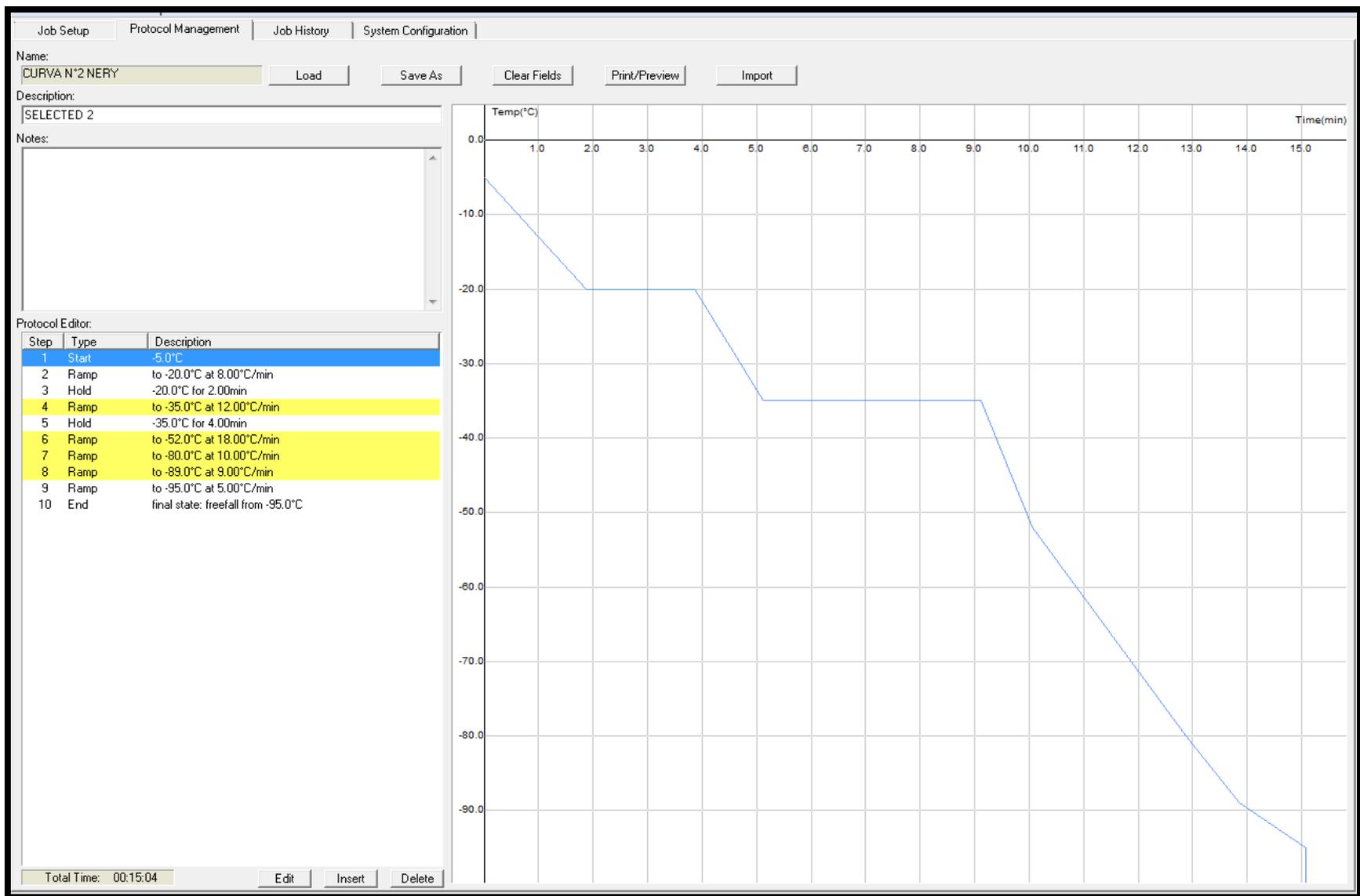


Foto 28. Representación gráfica de la curva rápida N° 2.

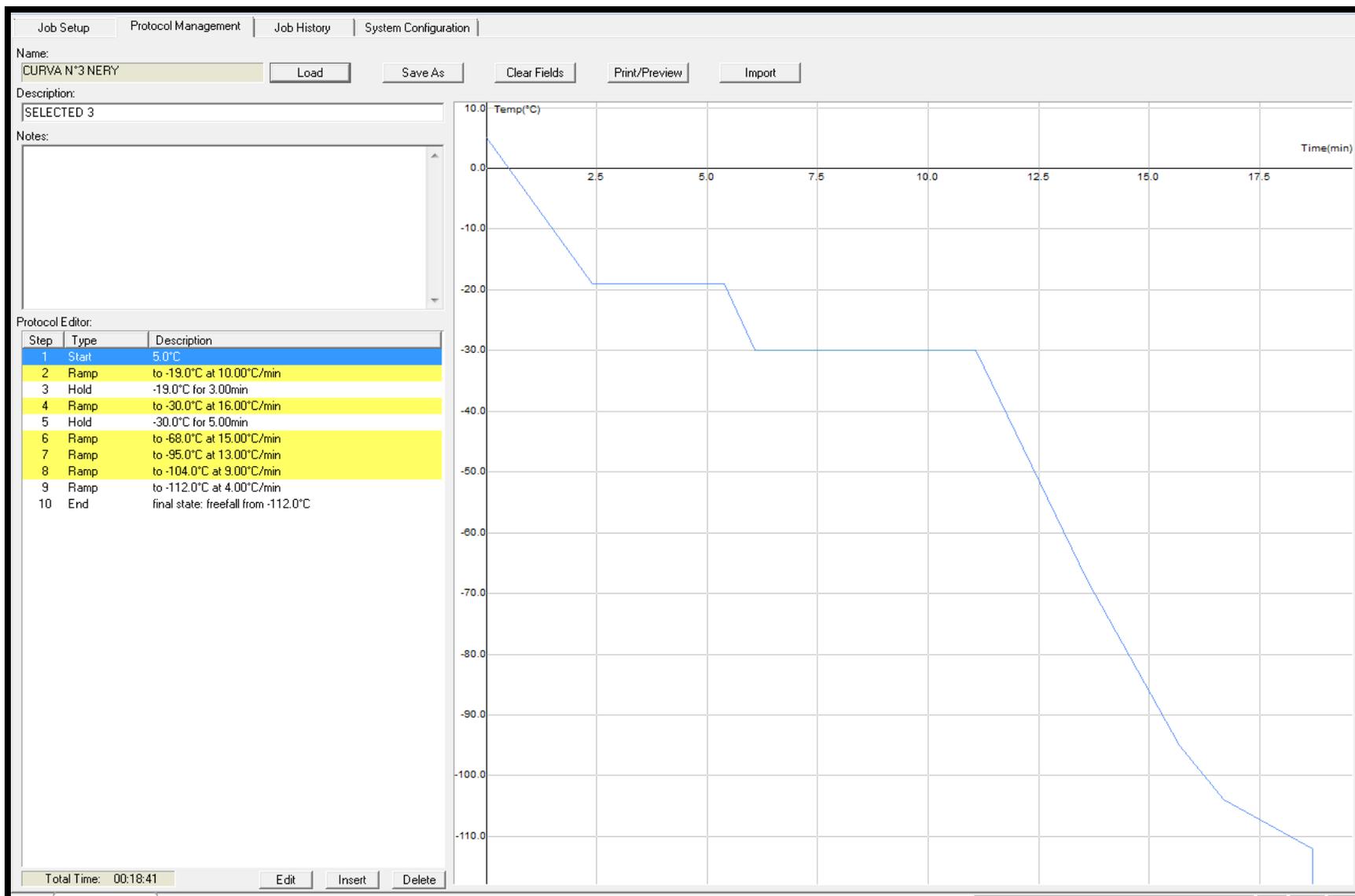


Foto 29. Representación gráfica de la curva rápida N° 3.

3.3.10 Almacenamiento

Culminado el proceso de congelación con el equipo automático de congelación de semen y embriones, inmediatamente las pajillas fueron extraídas del chamber y colocadas en globets las mismas que se colocan en las canastillas para de esta forma almacenarlo en nitrógeno líquido (-196°C).

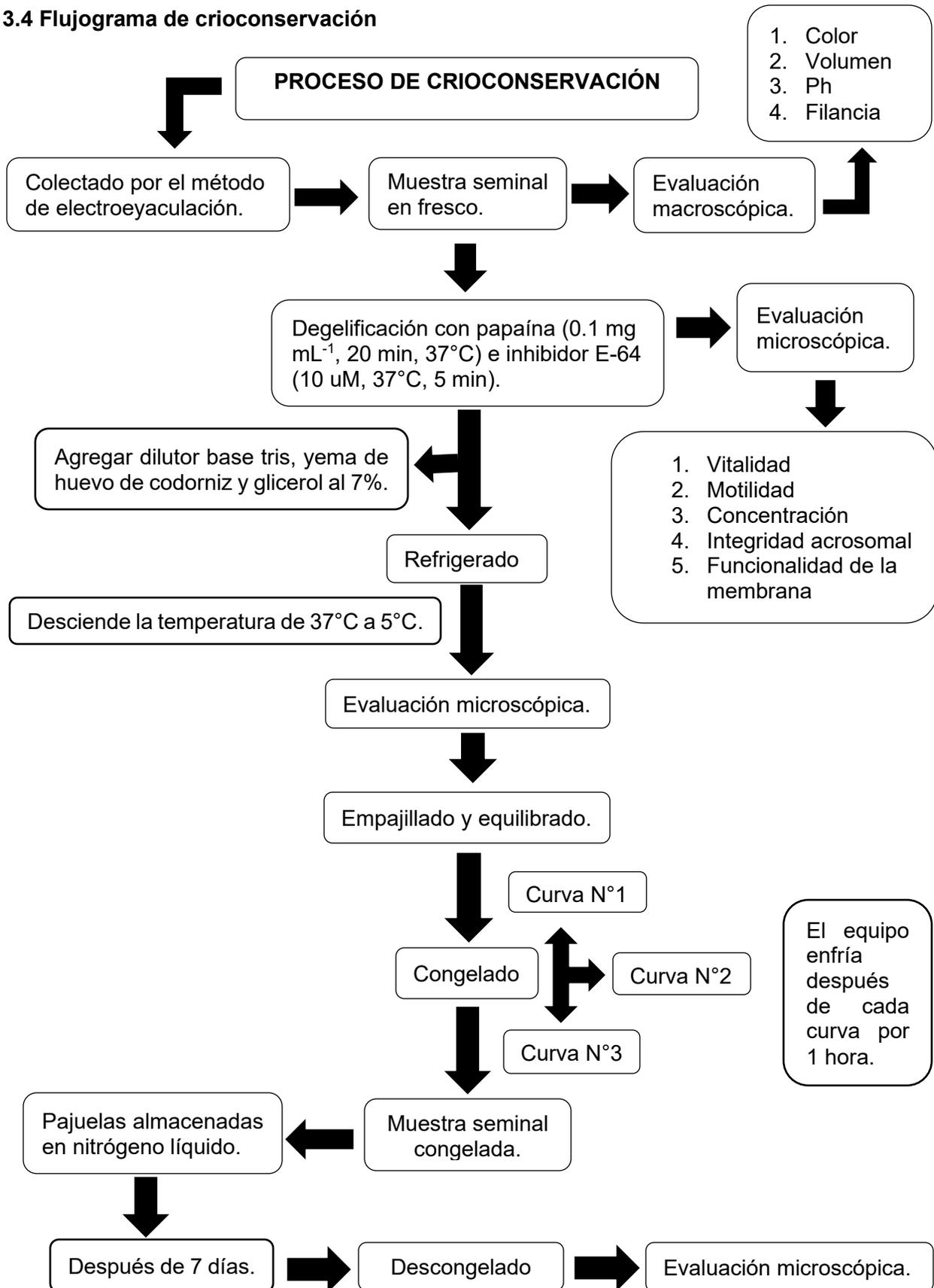


Foto 30. Almacenamiento de las pajillas en un balón con nitrógeno líquido (-196°C).

3.3.11 Descongelado

Las pajuelas fueron descongeladas después de 7 días en un termo con agua a 37°C por 30 segundos e inmediatamente fue secado con un papel toalla para eliminar restos de agua, luego se realizó el corte del lado del alcohol polivinílico con ayuda de un cortapajillas, las pajuelas fueron colocadas en baño seco a 37°C.

3.4 Flujo de criopreservación



3.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la evaluación de las características macroscópicas (volumen, ph, filancia) y microscópicas (motilidad espermática, vitalidad espermática, integridad acrosomal del espermatozoide, funcionalidad de la membrana espermática y morfometría espermática) para semen fresco, refrigerado y descongelado de las tres curvas rápidas aplicadas, fueron evaluadas con la prueba de homogeneidad de varianzas (Test de Levene) y distribución normal (Test de Shapiro - Wilks), luego se realizó el análisis de varianzas. El paquete estadístico usado fue el SAS v 9.4.

3.5.1 Características del semen de llama en estado fresco y refrigerado.

Se aplicó estadística paramétrica para la evaluación de las características macroscópicas (volumen, ph y filancia) y microscópicas (concentración, motilidad, vitalidad, funcionalidad de la membrana espermática, integridad acrosomal y morfometría espermática) del semen de llama. Se empleó un diseño aleatorizado en bloques al azar, comparando la media entre animales con la prueba de Tukey, el modelo aditivo lineal utilizado fue:

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

Dónde:

i = Animales (4)

j = Colecta (4)

Y_{ij} = Es la observación de la i -ésima macho de semen dentro del j -ésimo colecta

μ = Media

T_i = Efecto del i -animal (tratamiento).

B_{ij} = Efecto de la j -ésima colecta (bloques)

e_{ij} = Error experimental.

3.5.2 Características microscópicas en semen congelado/descongelado.

Para la evaluación del efecto de las tres curvas rápidas de congelación programadas con un equipo automático de congelación de semen sobre las características microscópicas (motilidad, vitalidad, funcionalidad de la membrana espermática, integridad acrosomal y morfometría espermática) en semen de llama descongelado, se utilizó un arreglo factorial comparando las medias con la prueba de Tukey.

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + C_k + (T*B)_{ij} + \epsilon_{ijkl}$$

Dónde:

i = Curvas rápidas de congelación (3)

j = Animales (4)

k = Colectas (4)

Y_{ijkl} = Es la observación de la *k*-ésima colecta de semen dentro del *j*-ésimo macho en el *i*-ésimo curvas rápidas de congelación.

μ = Media

T_i = Efecto de la *i*-ésima curva rápida de congelación (tratamiento).

B_j = Efecto del *j*-ésimo animal

C_k = Efecto de la *k*-ésima colecta

$(T*B)_{ij}$ = Efecto de la interacción de la curva rápida con el animal

ϵ_{ijkl} = Error experimental.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Evaluación de las características macroscópicas para el objetivo N°1.

4.1.1 Volumen

La evaluación de las medias del volumen seminal en llamas colectadas por el método de electroeyaculación, muestra que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre animales.

Cuadro 17. Media ($n=4$), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos del volumen seminal de llamas colectadas por electroeyaculación.

Llama	Media (ml) ± DS(ml)	CV(%)	Máximo (ml)	Mínimo (ml)	
1	0.90 b	0.18	20.29	1.10	0.70
2	0.92 b	0.47	50.99	1.60	0.50
3	2.55 a	0.31	12.19	3.00	2.30
4	1.30 b	0.60	46.15	2.20	1.00
Total	1.42	0.79	55.69	3.00	0.50

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

La media del volumen seminal obtenido fue 1.42 ± 0.79 ml, siendo inferior a lo reportado por Ccoiso (2019) de 3.63 ml, Gallegos (2019) de 3.8 ml y Laruta *et al.*, (2016) de 1.67 ml; pero superior al hallado por Valle (2013) de 0.25 ml; las diferencias podrían deberse al efecto animal, frecuencia de colecta, tiempo de colecta y alimentación por piso ecológico.

4.1.2 Color

Se obtuvieron dos colores de muestra seminal (cuadro 18) en llamas colectados por EE.

Cuadro 18. Color del semen de llamas colectadas por el método de electroeyaculación.

Color	N	%
Blanco lechoso	7	43.80
Blanco lechoso claro	9	56.30
Total	16	100

N: número de colectas

Con 56.30% el color predominante obtenido fue el blanco lechoso claro como lo reportado por Rodríguez (2013) 73.4% de predominancia de color blanco lechoso, pero diferente a lo

reportado por Ccoiso (2019) 80% de blanco cristalino, Gallegos (2019) 56.3% de cristalino brillante. Estas variaciones probablemente se diferenciarían por la concentración espermática y el criterio del observador quien evalúa la muestra.

4.1.3 Filancia

La evaluación de las medias de la filancia seminal en llamas colectadas por el método de EE, muestra que si hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre animales. Presentando mayor filancia en el animal 3.

Cuadro 19. Media ($n=4$), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la filancia seminal de llamas obtenidos por el método de electroeyaculación.

Llama	Media (cm)	± DS	% CV	Máximo (cm)	Mínimo (cm)
1	0.28 b	0.10	34.82	0.40	0.20
2	1.23 a	0.79	64.75	2.30	0.40
3	1.73 a	0.43	24.77	2.00	1.10
4	1.38 a	0.65	47.27	2.00	0.50
Total	1.15	0.75	64.84	2.30	0.20

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

El valor de filancia seminal obtenido fue 1.15 ± 0.75 cm resultando inferior a lo reportado por Ccoiso (2019) con 3.63 cm; Gallegos (2019) 3.7 cm. Diferencias observadas posiblemente por el efecto animal.

4.1.4 Potencial de hidrogeniones

Cuadro 20. Potencial de hidrogeniones (pH) del semen de llama colectado por electroeyaculación ($n=4$).

Llama	Media	± DS	CV	Máximo	Mínimo
1	7.08 a	0.10	1.35	7.20	7.00
2	7.00 a	0.08	1.17	7.10	6.90
3	7.00 a	0.16	2.33	7.20	6.80
4	6.95 a	0.13	1.86	7.10	6.80
Total	7.01	0.12	1.69	7.20	6.80

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

La media de pH obtenido es similar a lo reportado por Gallegos (2019) e inferior al de Ccoiso (2019), variaciones probables por el efecto animal, inferiores a los reportes de Quispe y Delgado (2012) , y Valle (2013), que podrían deberse al tipo de alimentación.

4.2 Evaluación de las características microscópicas para el objetivo N°1.

4.2.1 Concentración espermática

Nose encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) para la concentración espermatica entre animales. Colectadas por el método de E.E.

Cuadro 21. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la concentración espermática en semen de llama colectado por electroeyaculación.

Llama	Media (10 ⁶ /ml)	± DS	CV	Máximo (10 ⁶ /ml)	Mínimo (10 ⁶ /ml)
1	189.77 a	125.57	66.17	375.05	96.44
2	176.96 a	125.10	70.69	297.73	67.02
3	50.05 a	8.50	16.99	60.79	40.00
4	72.98 a	41.92	57.45	119.70	35.22
Total	122.44	103.44	84.49	375.05	35.22

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

El valor de concentración espermática en las llamas colectados por EE, fue: 122.44 ± 103.44 10⁶/ml, mayor a los reportes de Casaretto *et al.*, (2012); Rodriguez (2013); Laruta *et al.*, (2016); Ccoiso (2019) y Gallegos (2019); pero inferior a lo reportado por Carretero *et al.*, (2009). Estos valores nos indica que los datos para esta característica microscópica no son uniformes en muestras obtenidas por el mismo método de colección, esta diferencia probablemente este relacionada al efecto animal.

4.2.2 Vitalidad espermática

Las medias de la vitalidad espermática en llamas colectadas por el método de colección de electroeyaculación, indican que no hay diferencias significativas ($p>0.05$) entre animales. Observando que estos datos de vitalidad espermática en fresco (cuadro 22) estadísticamente.

Cuadro 22. Media (n=4), desviación etandar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y minimos de la vitalidad espermática en semen de llama colectado por electroeyaculación.

Llama	Media (%) ± DS	% CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
1	65.39 a 3.41	5.22	69.95	62.44
2	62.19 a 1.04	1.67	62.98	60.66
3	67.19 a 3.03	4.51	71.50	64.39
4	62.19 a 1.04	1.67	62.98	60.66
Total	64.24 3.08	4.80	71.50	60.66

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

La vitalidad espermática para semen fresco obtenido fue de 64.24 ± 3.08 %, superior a los reportes de Giuliano *et al.*, (2019) quien utilizo y ioduro de propidio (PI) y fluorocromos diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA); Ccoiso (2019) tinción eosina -nigrosina pero con diferente tiempo de degelificación (papaína) y Fumuso *et al.*, (2021) evaluo dos caracteriscitcas al mismo tiempo mezclando tincion FITC-PNA (acrosoma) y Tinción Isotiocianato de fluoresceína—Arachis aglutinina hipogea combinado con ioduro de propidio (vitalidad), diferencias encontradas posiblemente por el protocolo de evaluación y factores medioambientales; pero inferior a Laruta *et al.*, (2016) quien evaluó sus muestras con 10 μ L de semen, y 10 μ L de eosina al 2% + 10 μ L nigrosina al 1% , Fumuso *et al.*, (2019) separó el plasma seminal de la muestra y evaluó la vitalidad con tinción de diacetato y yoduro de propidio (CFDA/PI) del cual el factor medioambiental seria la causa probable de las diferencias y similar a Cucho *et al.*, (2021) con 64.56 quien trabajo en las mismas condiciones del presente trabajo de investigación.

4.2.3 Integridad acrosomal

Los resultados para integridad acrosomal en semen fresco muestra que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los machos llamas.

Cuadro 23. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la integridad acrosomal del espermatozoide en semen fresco de llama colectado por electroeyaculación.

Llama	Media (%)	± DS	% CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
1	90.64	b 2.18	2.40	92.79	88.06
2	95.18	a 1.72	1.81	97.00	93.00
3	93.08	b 2.58	2.77	95.50	89.50
4	90.34	b 2.28	2.53	92.50	88.24
Total	92.31	2.84	3.07	97.00	88.06

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

La media obtenida para integridad acrosomal del espermatozoide en semen fresco fue 92.31 ± 2.84 , resultando ser superior a lo reportado por Fumuso *et al.*, (2014); Ccoiso (2019); Cucho *et al.*, (2021); autores que para su evaluación también utilizaron tinción comasie blue, el efecto animal sería la probable causa de las diferencias. Este promedio también es superior a lo hallado por autores que evaluaron dos características al mismo tiempo mezclando tinción FITC-PNA (acrosoma) y tinción PI Isotiocianato de fluoresceína–*Arachis hypogaea* aglutinina/yoduro de propidio (vitalidad) como Carretero *et al.*, (2015) y Fumuso *et al.*, (2019), las diferencias con nuestro resultado, probablemente se deba al efecto animal y la tinción empleada.

4.2.4 Funcionalidad de la membrana espermática

El análisis de los resultados para funcionalidad de la membrana espermática en semen fresco de llama analizado a 50 mOsm, señala que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los animales.

Cuadro 24. Media (n=4), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la funcionalidad de la membrana espermática en semen de llama colectado por electroeyaculación.

Llama	Media (%)	± DS	CV(%)	Máximo (%)	Mínimo (%)
1	91.07	a 2.70	2.97	94.91	88.61
2	87.69	a 1.52	1.73	89.45	85.85
3	89.00	a 1.03	1.16	90.43	88.06
4	87.69	a 0.93	1.06	89.00	86.89
Total	88.86	2.08	2.35	94.91	85.85

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

La media de la evaluación para la funcionalidad de membrana espermática en semen fresco obtenida, fue: 88.86 ± 2.08 resultando ser superior a lo reportado por los siguientes autores quienes realizan su evaluación con HOS test, Rodríguez (2013); Ccoiso (2019); Giuliano *et al.*, (2019) probables diferencias por el tiempo de degelificación, efecto animal y factor medioambiental y para Carretero *et al.*, (2014) quien no realizo el proceso de degelificación.

4.2.5 Motilidad espermática

a. Motilidad progresiva, motilidad no progresiva y motilidad total en semen fresco.

El análisis de las medias para motilidad total y espermatozoides móviles no progresivos revelan que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$), sin embargo, el análisis estadístico para espermatozoides motiles progresivos muestran que si hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los machos llamas en semen fresco colectado por EE.

Cuadro 25. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la motilidad progresiva (MP), motilidad no progresiva (MNP) y motilidad total (MT) de espermatozoides en semen de llama colectado por electroeyaculación.

Llama	Variable					
	MP		MNP		MT	
	Media ($\mu\text{m/s}$)	\pm DS	Media ($\mu\text{m/s}$)	\pm DS	Media ($\mu\text{m/s}$)	\pm DS
1	5.30 a	1.74	47.41 a	12.49	52.70 a	13.12
2	4.05 ab	1.18	57.78 a	8.10	61.82 a	7.45
3	2.95 b	0.73	36.01 a	6.89	38.96 a	7.33
4	3.82 ab	1.19	48.38 a	13.69	52.20 a	14.58
Total	4.03	1.42	47.39	12.44	51.42	13.03

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

La media obtenida de espermatozoides MP fue: 4.03 ± 1.42 resultando ser inferior a los reportes de Ccoiso (2019) quien realizó la degelificación con papaína por 20 minutos y Fumuso *et al.*, (2021) que evaluó inmediatamente después de la colección; Giuliano *et al.*, (2010) quien degelifico sus muestras en colagenasa, probable diferencia por el efecto animal y alimentacion; pero es superior al reporte de Rodriguez (2013) quien evaluó sus muestras sin ser degelificadas diferencias probable por el efecto animal.

Para espermatozoides MNP, la media obtenida fue de 47.39 ± 12.44 , el cual es inferior a lo reportado por Valle (2013) quien evaluo sin degelificar el semen y su evaluacion fue subjetiva; Ccoiso (2019), degelifico sus muestras con papaína por 20 minutos, la diferencia podría deberse al tiempo de incubación. Es superior a lo hallado por Rodríguez (2013) el cual su evaluación se realizo inmediatamente después de la colección y Fumuso *et al.*, (2021) su evaluacion fue subjetiva, el efecto animal, frecuencia de colecta y la alimentación seria la probable causa de las diferencias.

La media para espermatozoides con motilidad total (MT) fue, 51.42 ± 13.03 es superior a los reportes de Laruta *et al.*, (2016), Guiliano *et al.*, (2019) quien realizó la degelificación del semen en colagenasa a 0.1%; Fumuso *et al.*, (2021) quien evaluó en muestra no degelificada y Cucho *et al.*, (2021) quien uso papaína para su incubación, probables diferencias se mostrarían por alimentacion por factor medio ambiental, proceso de degelificacion y efecto animal pero inferior al reporte de Ccoiso (2019) probable motivo seria el efecto animal.

b. Parámetros de velocidad.

Las medias analizadas estadísticamente para los parámetros de velocidad en semen fresco indica que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los animales.

Cuadro 26. Media de los parámetros de velocidad de espermatozoides en semen de llama colectado por electroeyaculación (n=4).

Paramentros de velocidad	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Llama	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	(%)	(%)	(%)	(μm)	(Hz)
1	56.87 a	17.82 a	31.54 a	31.45 a	56.22 a	55.97 a	2.94 a	5.22 a
2	74.65 a	16.76 a	29.23 a	29.40 a	56.59 a	52.14 a	3.40 a	6.08 a
3	69.77 a	15.27 a	32.64 a	21.85 a	46.54 a	46.89 a	2.04 a	3.93 a
4	67.45 a	14.47 a	31.41 a	24.3 a	46.58 a	47.21 a	1.71 a	3.31 a
Total	67.18	16.08	31.2	26.75	51.48	50.55	2.52	4.63

Letras distintas por columna muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$); VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio de desplazamiento; LIN: Porcentaje de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza; BCL: Frecuencia de batido.

La media obtenida para VCL fue: 67.18 ± 14.88 VSL fue: 16.08 ± 2.65 VAP: 31.2 ± 3.88 STR: 51.48 ± 6.77 ALH: 2.52 ± 1.11 BCF: 4.63 ± 1.98 son superiores a Rodriguez (2013) e inferiores a Ccoiso (2019), sin embargo estos autores son superiores a la media para LIN: 26.75 ± 5.30 , y la media de WOB 50.55 ± 6.94 es superior al de Ccoiso (2019), e inferior al de Rodriguez (2013). Diferencias observadas probablemente por el tiempo de colecta, efecto animal y tratamiento de la muestra previa evaluación.

4.2.6 Morfometría espermática.

La evaluación estadística de las medias de las variables de la cabeza del espermatozoide entre animales en el cuadro 27 nos muestra que si hay diferencias significativas ($p < 0.05$) a excepción del parámetro de regularidad que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$).

Cuadro 27. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la morfometría de la cabeza del espermatozoide de llama colectado por electroeyaculación.

Llama	CABEZA									
	Long. (μm)	Anch. (μm)	Area (μm^2)	Per. (μm)	Acros. (%)	Elip. (#)	Rig. (#)	Elon. (#)	Reg. (#)	
1	Media	5.59 a	3.12 b	14.78 a	15.88 a	43.12 b	1.80 a	0.73 ab	0.28 a	0.93 a
	\pm DS	0.07	0.04	0.20	0.24	2.44	0.04	0.02	0.01	0.01
2	Media	5.14 b	3.12 b	13.67 b	14.98 b	40.08 b	1.65 b	0.77 a	0.24 b	0.93 a
	\pm DS	0.16	0.06	0.65	0.41	2.33	0.02	0.03	0.01	0.00
3	Media	5.61 a	3.35 a	15.72 a	16.09 a	48.76 a	1.68 b	0.76 ab	0.26 b	0.94 a
	\pm DS	0.15	0.08	0.59	0.40	1.35	0.04	0.01	0.01	0.01
4	Media	5.72 a	3.1 b	14.88 a	16.1 a	49.26 a	1.86 a	0.72 b	0.30 a	0.94 a
	\pm DS	0.15	0.02	0.29	0.24	0.60	0.04	0.01	0.01	0.02
Total	Media	5.52	3.17	14.76	15.76	45.3	1.75	0.75	0.27	0.93
	\pm DS	0.26	0.11	0.86	0.56	4.32	0.09	0.03	0.02	0.01

Letras distintas en columnas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en columnas. Long: longitud; Anch: Ancho; Per: perímetro; Acros: Acrosoma; Elip: Elipticidad; Rig: Rigiosidad; Elon: Elongacion; Reg: Regularidad

La media de la longitud obtenida es superior a Cucho *et al.*, (2021) y Rodriguez (2013) e inferior a Casaretto *et al.*, (2012) quien utilizo Tincion 15[®] (Biopur S.R.L., Rosario, Argentina) y una camara Leica DC180 (Leica Microsystems Co., Wetzlar, Alemania). La media del ancho de la cabeza es similar a Cucho *et al.*, (2021) y Rodriguez (2013) y Casaretto *et al.*, (2012). La media

del área es superior a Cucho *et al.*, (2021) y Rodriguez (2013) pero inferior a Casaretto *et al.*, (2012). El perímetro es inferior a los autores mencionados diferencias observadas posiblemente por el efecto animal, factor medio ambiental y alimentación. El acrosoma es inferior a Cucho *et al.*, (2021) y Rodriguez (2013). La elipticidad es superior a todos los autores mencionados. La media de Rigocidad es superior a Cucho *et al.*, (2021) y Rodriguez (2013), La media de elongación es similar a Cucho *et al.*, (2021) y Rodriguez (2013) e inferior a Casaretto *et al.*, (2012). La media para regularidad es similar a Cucho *et al.*, (2021) y Rodriguez (2013). Estas diferencias para las características de la cabeza del espermatozoide de llama posiblemente se deba al efecto animal con Cucho *et al.*, (2021) y Rodriguez (2013); y con Casaretto *et al.*, (2012) posiblemente por el factor medio ambiental y alimentación. .

Cuadro 28. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la morfometría de la pieza intermedia del espermatozoide de llama colectado por EE.

Llama	PIEZA INTERMEDIA (P.I)				
		Anchura	Área de P.I.	Distancia de Inserción	Ángulo de Inserción
		(μm)	(μm^2)	(μm)	($^\circ$)
1	Media	1.25 a	2.73 a	0.20 ab	6.26 b
	± DS	0.08	0.03	0.01	0.43
2	Media	1.25 a	2.80 a	0.19 ab	8.05 a
	± DS	0.11	0.30	0.02	0.75
3	Media	1.21 a	3.17 a	0.15 b	6.26 b
	± DS	0.06	0.62	0.01	0.44
4	Media	1.23 a	3.04 a	0.25 a	7.39 ab
	± DS	0.07	0.42	0.07	0.09
Total	Media	1.23	2.93	0.20	6.99
	± DS	0.08	0.41	0.05	0.90

Letras distintas por columna muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en columnas.

El análisis para las variables de la pieza intermedia del espermatozoide revelan que no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) para anchura y área; para Dist. Inserción y Ang. Inserción muestra que si hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los machos llamas. La media obtenida para Anchura es inferior a Cucho *et al.*, (2021) y Rodriguez (2013), el area de PI es inferior a

Rodriguez (2013), y superior a Cucho *et al.*, (2021). La media de la Dist. Inserción es similar a los reportes de ambos autores ya mencionados y La media del Ang. Inserción es inferior a los reportes de los mismos autores. Estas diferencias observadas con los resultados obtenidos y la de los autores para las características de la cabeza del espermatozoide de llama probablemente se deba al efecto animal.

4.3 Evaluación de las características microscópicas para el objetivo N°2.

4.3.1 Vitalidad espermática

La evaluación de los resultados de vitalidad espermática en semen refrigerado, muestra que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los diferentes animales.

Cuadro 29. Media ($n=4$), desviación estandar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la vitalidad espermática en semen refrigerado de llama.

LLAMA	Media (%)	± DS	% CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
1	54.31 a	1.73	3.18	56.00	52.11
2	46.28 b	1.44	3.11	48.42	45.33
3	49.19 b	1.74	3.54	50.95	46.88
4	52.73 a	0.77	1.45	53.50	51.76
TOTAL	50.63	3.48	6.88	56.00	45.33

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

La media para vitalidad en semen refrigerado de llamas obtenido es de $50.63 \pm 3.48\%$ el cual es inferior a los reportes de Carretero *et al.*, (2016) quien hizo una dilución con lactosa; yema de huevo y evaluo con fluorocromos 6-carboxifluoresceína diacetato (CFDA) y yoduro de propidio (PI), Guiliano *et al.*, (2019) evaluo con fluorocromos diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) y yoduro de propidio (PI), con una dilucion en base lactosa, yema de huevo, coloide Androcoll-E-Large y Fumuso *et al.*, (2021) quien hizo una dilución con lactosa mas EDTA-glucosa yema de huevo, Equex® y glicerol al 6% y su evaluación se realizó conjuntamente con el acrosoma con tincion FITC-PNA y Tinción PI (Isotiocianato de fluoresceína—Arachis aglutinina hipogea combinado con yoduro de propidio). Diferencias que quizas se deban al dilutor utilizado, protocolos de refrigerado, momento de asignación de crioprotectoren la muestra.

4.3.2 Integridad acrosomal

La medias de integridad acrosomal en semen refrigerado entre los distintos machos llamas muestran que si hay diferencias significativas ($p < 0.05$); observándose que el semen de llama 2 de raza chak'u no se vio tan afectado con el descenso de temperatura con respecto a los otros tres machos llamas.

Cuadro 30. Media ($n=4$), desviación estandar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la integridad acrosomal espermática en semen refrigerado de llama.

Llama	Media (%)	± DS	% CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
1	83.54 ab	2.32	2.78	85.64	80.50
2	89.42 a	2.58	2.89	91.67	85.92
3	82.99 ab	4.66	5.61	88.73	78.50
4	77.74 b	4.22	5.43	81.59	72.50
Total	83.42	5.34	6.41	91.67	72.50

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

La media obtenida para la integridad acrosomal en semen refrigerado de llamas es de $83.42 \pm 5.34\%$ siendo superior a lo reportado por Guiliano *et al.*, (2012) quien utilizo la misma tinción sin embargo la diferencia se debería al crioprotector ya que utilizo dimetilformamida.

4.3.3 Funcionalidad de la membrana espermática

El resultado de la evaluación estadística de las medias de los animales para la funcionalidad de la membrana espermática (cuadro 31) nos muestra que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las llamas en semen refrigerado.

Cuadro 31. Media ($n=4$), desviación estandar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos de la funcionalidad de la membrana espermática en semen refrigerado de llama.

Llama	Media (%)	± DS	% CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
1	83.56 a	3.04	3.63	86.27	79.25
2	80.78 a	1.84	2.27	82.50	78.50
3	85.36 a	1.35	1.58	86.70	83.57
4	82.98 a	1.58	1.90	84.76	81.00
Total	83.17	2.50	3.00	86.70	78.50

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

La media de la funcionalidad de la membrana espermática en semen refrigerado obtenida fue 83.17 ± 2.50 % es superior a lo reportado por Guiliano *et al.*, (2019) diluyo en base lactosa, yema de huevo, coloide Androcoll-E-Large con tratamiento Percoll® y Carretero *et al.*, (2016) quien hizo una dilución con lactosa y yema de huevo .

4.3.4 Motilidad espermática

a. Motilidad progresiva, motilidad no progresiva y motilidad total en semen fresco.

Los resultados para MT, MP y MNP en semen refrigerado de llamas (cuadro 35) indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre animales.

Cuadro 32. Media (n=4) y desviación estandar (DS) de la motilidad progresiva (MP), motilidad no progresiva (MNP) y motilidad total (MT) de espermatozoides en semen refrigerado de llama.

Llama	Variable					
	MP		MNP		MT	
	Media (%)	± DS	Media (%)	± DS	Media (%)	± DS
1	3.33 a	0.40	64.36 a	21.89	67.70 a	22.14
2	2.64 a	0.81	72.69 a	14.36	75.33 a	14.76
3	2.19 a	0.32	60.51 a	13.59	62.70 a	13.44
4	2.74 a	0.73	66.33 a	7.93	69.07 a	8.38
Total	2.72	0.68	65.97	14.40	68.70	14.61

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

La media en semen refrigerado para MT es de 68.70 ± 14.61 $\mu\text{m/s}$ es superior a los reportes de Carretero *et al.*, (2014) diluyente de lactosa-EDTA-yema de huevo, Guiliano *et al.*, (2019) diluyo en base lactosa mas yema de huevo mas coloide Androcoll-E-Large con tratamiento Percoll® y Fumuso *et al.*, (2021) diluicion con lactosa mas EDTA-glucosa, yema de huevo y Equex® y glicerol al 6%.

La media para MP obtenida fue 2.72 ± 0.68 $\mu\text{m/s}$ es superior a Fumuso *et al.*, (2021) y la media de MNP obtenida fue 65.97 ± 14.40 $\mu\text{m/s}$ el cual es superior al reporte de Fumuso *et al.*, (2021).

Diferencias observadas entre los resultados del actual trabajo de investigación y autores, posiblemente sea a causa del dilutor empleado, tiempo de refrigeración, velocidad de enfriamiento, momento de colocación de crioprotector.

b. Parametros de velocidad.

La evaluación estadística de los parámetros de velocidad en semen refrigerado indica que entre animales para las variables VCL, VSL, VAP, LIN, STR yWOB muestra que no hay diferencia significativas ($p>0.05$) y para ALH y BCF si hay diferencia significativa ($p<0.05$).

Cuadro 33. Parámetros de velocidad espermática de llama (n=4) en semen refrigerado.

Parametros	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
Llama	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media	Media
	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	($\mu\text{m/s}$)	(%)	(%)	(%)	(μm)	(Hz)
1	50.40 a	13.99 a	27.62 a	27.81 a	50.90 a	54.89 a	2.03 a	3.62 a
2	45.43 a	13.02 a	28.43 a	29.23 a	45.86 a	63.49 a	0.90 b	1.57 ab
3	40.75 a	10.67 a	26.66 a	26.53 a	40.39 a	66.82 a	0.64 b	1.11 b
4	43.85 a	10.71 a	27.51 a	24.59 a	38.98 a	63.82 a	0.41 b	0.54 b
Total	45.11	12.10	27.56	27.04	44.03	62.25	1.00	1.71

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$). VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio de desplazamiento; LIN: Porcentaje de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza; BCL: Frecuencia de batido.

La media de VCL, VSL y STR es inferior y la media de las variables VAP LIN WOB es superior al reporte de Flores *et al.*, (2021) en principio pues la diferencia es en la especie animal ya que el mencionado autor trabajo con alpacas y su dilución se realizo a base tris y como crioprotector dimetilformamida al 7%.

No se encuentran reportes sobre parámetros de velocidad en semen refrigerado de llamas colectado por EE.

4.3.5 Morfometría espermática

La evaluación de las variables de la morfometría de la cabeza en semen refrigerado muestran que si hay diferencias significativas ($p<0.05$) entre los machos llamas.

Cuadro 34. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la morfometría de la cabeza del espermatozoide de llama en semen refrigerado.

Llama	CABEZA									
	Long. (μm)	Anch. (μm)	Area (μm^2)	Per. (μm)	Acros. (%)	Elip. (#)	Rig. (#)	Elon. (#)	Reg. (#)	
1	Media	5.52 a	3.12 b	14.66 b	15.50 a	45.70 b	1.78 a	0.77 ab	0.28 a	0.92 a
	± DS	0.19	0.04	0.41	0.41	5.71	0.07	0.02	0.02	0.01
2	Media	5.19 b	3.11 b	13.89 c	14.86 b	41.18 b	1.67 b	0.78 a	0.25 b	0.92 a
	± DS	0.07	0.03	0.18	0.19	2.84	0.03	0.01	0.01	0.00
3	Media	5.46 a	3.39 a	15.60 a	15.79 a	50.75 a	1.62 b	0.79 a	0.24 b	0.94 a
	± DS	0.09	0.03	0.07	0.22	2.88	0.04	0.02	0.01	0.01
4	Media	5.62 a	3.17 b	15.11 a	15.98 a	51.29 a	1.78 a	0.73 b	0.28 a	0.92 a
	± DS	0.01	0.16	0.58	0.12	4.38	0.09	0.01	0.02	0.01
Total	Media	5.45	3.20	14.81	15.53	47.23	1.71	0.77	0.26	0.92
	± DS	0.19	0.14	0.73	0.50	5.63	0.09	0.03	0.02	0.01

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en columnas. Long: longitud; Anch: Ancho; Per: perímetro; Acros: Acrosoma; Elip: Elipticidad; Rig: Rigosidad; Elon: Elongacion; Reg: Regularidad

No hay reportes para las variables de la morfometría espermática en llamas colectados por EE para semen refrigerado

Cuadro 35. Media (n=4) y desviación estándar (DS) de la morfometría de la pieza intermedia de la célula espermática de llama en semen refrigerado.

Llama	PIEZA INTERMEDIA (P.I)				
		Anchura (μm)	Area de P.I. (μm^2)	Distancia de Insercion (μm)	Angulo de Insercion ($^{\circ}$)
1	Media	1.14 a	2.46 a	0.21 a	6.09 a
	\pm DS	0.024	0.242	0.034	0.234
2	Media	1.13 a	2.55 a	0.17 a	6.24 a
	\pm DS	0.02	0.18	0.01	0.12
3	Media	1.16 a	2.63 a	0.16 a	6.31 a
	\pm DS	0.02	0.26	0.03	0.37
4	Media	1.14 a	2.66 a	0.20 a	6.41 a
	\pm DS	0.08	0.76	0.04	0.44
Total	Media	1.14	2.57	0.18	6.26
	\pm DS	0.04	0.39	0.04	0.31

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

En el cuadro 35 se muestra la evaluación estadística de las variables de la morfometría espermática en semen refrigerado e señalan que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre llamas.

No hay reportes para los parámetros de morfometría de la pieza intermedia en semen refrigerado de llamas colectados por EE.

4.4. Evaluación del efecto de las curvas rápida de congelación sobre las características microscópicas para el objetivo N°3.

4.4.1 Vitalidad espermática

En el cuadro 36 se muestra la evaluación estadística para vitalidad espermática al descongelado sometido a tres diferentes curvas de congelación rápida. Observándose que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las curvas de congelación sin embargo la curva 1 de 13.22 minutos es ligeramente superior a la curva 2 y curva 3.

Cuadro 36. Media (n=16), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos del efecto de las curvas de congelación sobre la vitalidad espermática en semen descongelado de llamas.

Curva	Media (%)	± DS	% CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
1	30.55 a	7.44	24.35	39.22	18.27
2	29.98 a	8.14	27.16	39.21	13.27
3	29.46 a	6.96	23.64	40.00	17.91

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

La media de la curva de congelación rápida 1, 2 y 3 para vitalidad son superiores a los reportado por Laruta *et al.*, (2016) quien congelo en vapores de nitrógeno por 15 minutos y uso gentamicina en el dilutor, Fumuso *et al.*, (2019) su procedimiento de congelación fue colocar las pajillas en etanol 2-popanona sobre vapores de nitrógeno a medio ambiente hasta -15°C , -120°C y -196°C ; y Fumuso *et al.*, (2021) quien coloco el crioprotector a los 5°C , congelo en vapores de nitrógeno por 15 minutos y descongelo después de un mes. Diferencias posiblemente a causa del método de congelación, y descenso de temperatura.

4.4.2 Integridad acrosomal

La evaluación estadística para la integridad acrosomal espermática sometida a las tres curvas de congelación rápida muestra que si hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre curvas (cuadro 37), observándose que la curva 1 y 2 de minutos de congelación rápida es superior a la curva 3.

Cuadro 37. Media (n=16), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos del efecto de las curvas de congelación sobre la integridad acrosomal del espermatozoide de llama en semen descongelado.

Curva	Media (%)	± DS	% CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
1	76.81 a	9.93	12.93	90.70	57.50
2	74.73 a	9.54	12.76	88.63	59.90
3	72.14 b	7.62	10.56	82.50	60.40

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

La media de las curvas de congelación rápida 1, 2 y 3 del semen de llamas colectado por EE son superiores a los reportes de Guilliano *et al.*, (2012), Choez *et al.*, (2014) quien utilizó leche descremada, yema de huevo y frutuosa, el proceso de equilibrado fue por 30 minutos y congelo

en vapores de nitrógeno por 20 minutos y Fumuso *et al.*, (2019) congeló colocando las pajillas en etanol 2-propanona en un bote de bronce sobre vapores de nitrógeno primero en medio ambiente hasta -15°C, -120°C y -196°C. Diferencias posiblemente a causa del protocolo de criopreservación, método de congelación, y descenso de temperatura, tiempo de congelación.

4.4.3 Funcionalidad de la membrana espermática

La evaluación de las medias para la funcionalidad espermática (cuadro 38) en semen descongelado de tres curvas de congelación rápida nos indica que si hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las curvas; donde la curva 1 de 13.22 minutos de congelación rápida es estadísticamente superior a la curva 3 y similar a la curva 2, pero estadísticamente superior solo a la curva 3.

Cuadro 38. Media (n=16), desviación estándar (DS), coeficiente de variabilidad (CV), máximos y mínimos del efecto de las curvas de congelación sobre la funcionalidad de la membrana espermática de llama en semen descongelado.

Curva	Media (%)	± DS	% CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
1	79.06 a	1.48	1.87	81.59	76.00
2	78.44 a	2.36	3.01	82.00	74.15
3	76.97 b	1.85	2.40	79.52	72.50

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

Las medias de las tres curvas de congelación rápida obtenidas para la funcionalidad de la membrana espermática evaluadas al descongelado son superiores al reporte de Carretero *et al.*, (2014) uso un medio de dilución en lactosa EDTA - yema de huevo y glicerol al 7% y para la congelación las pajillas fueron colocadas en etanol 2-propanona en un bote de bronce sobre vapores de nitrógeno a medio ambiente hasta 5°C -15°C (10 A 12°C/MIN) a -120 (25 A 40 °C/MIN) y -196°C en nitrógeno líquido. Diferencias posiblemente a causa del protocolo de criopreservación, método de congelación, y descenso de temperatura, tiempo de congelación.

4.4.4 Motilidad espermática

Los resultados para las diferentes curvas de congelación, indican que para MT y MNP no hay diferencias significativas ($p > 0.05$); pero para los espermatozoides con MP si se muestra

diferencia significativa ($p < 0.05$), observándose que la curva 1 es superior a las otras curvas evaluadas.

Cuadro 39. Media ($n=16$) y desviación estándar (DS) del efecto de las curvas de congelación sobre la motilidad progresiva (MP), motilidad no progresiva (MNP) y motilidad total (MT) del espermatozoide de llama en semen descongelado.

Curva	MP		MNP		MT	
	Media ($\mu\text{m/s}$)	\pm DS	Media ($\mu\text{m/s}$)	\pm DS	Media ($\mu\text{m/s}$)	\pm DS
1	2.23 a	0.54	28.11 a	12.86	30.34 a	12.84
2	0.88 b	0.84	25.78 a	11.15	26.66 a	11.39
3	0.77 b	0.93	26.23 a	9.51	27.00 a	9.79

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

La media de MT para las diferentes curvas de congelación aplicadas es superior al reporte de Laruta *et al.*, (2016) quien congelo en vapores de nitrógeno por 15 minutos y utilizó gentamicina en el dilutor y Fumuso *et al.*, (2021) colocó el crioprotector a 5°C , se congelo en vapores de nitrógeno por 15 minutos y descongelo después de un mes y Carretero *et al.*, (2014) utilizo un medio de dilución en lactosa EDTA - yema de huevo y glicerol al 7% y para la congelación las pajillas fueron colocadas en etanol 2-propanona en un bote de bronce sobre vapores de nitrógeno a medio ambiente hasta 5°C - 15°C (10 A $12^{\circ}\text{C}/\text{MIN}$) a -120 (25 A $40^{\circ}\text{C}/\text{MIN}$) y -196°C en nitrógeno liquido. La media de MP en las tres curva de congelación son inferiores a lo reportado por Fumuso *et al.*, (2021). Pero la media de MNP es superior a lo reportado por Fumuso *et al.*, (2021). Diferencias posiblemente a causa del protocolo de criopreservación, método de congelación, y descenso de temperatura, tiempo de congelación.

Cuadro 40. Media del efecto de las curvas de congelación sobre los parámetros de velocidad espermática de llama (n=16) en semen descongelado.

Curva	Parametros de velocidad							
	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
	Media ($\mu\text{m/s}$)	Media ($\mu\text{m/s}$)	Media ($\mu\text{m/s}$)	Media (%)	Media (%)	Media (%)	Media (μm)	Media (Hz)
1	39.60 b	10.08 a	22.74 b	25.32 a	44.97 a	58.32 a	0.47 a	0.84 a
2	45.08 a	11.84 a	26.31 a	25.90 a	43.31 a	60.78 a	0.25 a	0.41 b
3	51.19 a	12.37 a	27.70 a	23.39 a	42.14 a	54.75 b	0.40 a	0.95 a

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en columnas. VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio de desplazamiento; LIN: Porcentaje de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza; BCL: Frecuencia de batido.

El cuadro 40 nos muestra resultados del análisis de los parametros de velocidad para las tres curvas de congelación rápida aplicadas, donde los parámetros VSL, LIN, STR y ALH muestran que no hay diferencias significativa ($p > 0.05$); para las tres curvas de congelacion pero para las variables VCL, VAP, WOB y BCF muestran que si hay diferencias significativas ($p < 0.05$),.

Las medias de las tres curvas para las variables VCL, VSL, VAP y WOB son superiores y las variables LIN y STR son inferiores al reporte de Flores *et al.*, (2021) quien trabajo en apacas y sus muestras las incubó con colagenasa en medio HEPES-TALP por 4 minutos y luego fue diluida en base tris – yema de huevo – dimetilformamida, se refrigero por 2 horas luego se equilibrio por una hora y se congelo en vapores de nitrógeno por 15minutos.

Diferencias posiblemente a causa del protocolo de criopreservación, método de congelación, y descenso de temperatura, tiempo de congelación.

No hay reportes para ALH y BCF (parámetros de velocidad del espermatozoide) en semen descongelado de llama colectado por EE.

4.4.5 Morfometría espermática

El cuadro 41 nos muestra la evaluación de los parámetros de la morfometría de la cabeza del espermatozoide el cual revela que no hay diferencias significativas ($p>0.05$); en semen descongelado para las tres curvas de congelación.

Cuadro 41. Media ($n=16$) y desviación estándar (DS) del efecto de las curvas de congelación sobre la morfometría de la cabeza del espermatozoide de llama en semen descongelado.

Curva	CABEZA									
	Long. (μm)	Anch. (μm)	Area (μm^2)	Per. (μm)	Acros. (%)	Elip. (#)	Rig. (#)	Elon. (#)	Reg. (#)	
1	Media	5.45 a	3.18 a	14.80 a	15.58 a	47.88 a	1.72 a	0.76 a	0.26 a	0.92 a
	± DS	0.21	0.14	0.78	0.55	4.48	0.09	0.04	0.02	0.01
2	Media	5.47 a	3.17 a	14.71 a	15.61 a	48.21 a	1.73 a	0.76 a	0.27 a	0.92 a
	± DS	0.18	0.11	0.55	0.43	3.15	0.10	0.03	0.03	0.01
3	Media	5.48 a	3.18 a	14.78 a	15.63 a	48.09 a	1.73 a	0.76 a	0.26 a	0.92 a
	± DS	0.17	0.13	0.84	0.43	3.90	0.09	0.02	0.02	0.01

Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) en columnas. Long: longitud; Anch: Ancho; Per: perímetro; Acros: Acrosoma; Elip: Elipticidad; Rig: Rigosidad; Elon: Elongacion; Reg: Regularidad.

No hay reportes de morfometría espermática para los parámetros de la cabeza del espermatozoide en semen descongelado en llamas colectadas por EE. Se encontró un reporte en alpacas. La media de longitud; perímetro y regularidad para las tres curvas de congelación es levemente inferior al reporte de Ciprian (2019), la media del ancho, área, elipticidad, rigosidad para las tres curvas de congelación es superior a la de Ciprian, (2019). La media del acrosoma de las tres curvas de congelación es inferior a la de Ciprian, (2019) y la media de elongación de la curva 2 es igual al autor mencionado pero Ciprian, (2019) es superior al resultado de las curvas de congelación 1 y 3. Estas diferencias probablemente se deberían a la especie animal.

Cuadro 42. Media (n=16) y desviación estándar (DS) del efecto de las curvas de congelación sobre la morfometría de la pieza intermedia del espermatozoide de llama en semen descongelado.

Curva	PIEZA INTERMEDIA (P.I)				
	Anchura (µm)	Área de P.I. (µm ²)	Distancia de Inserción (µm)	Ángulo de Inserción (°)	
1	Media	1.15 a	2.66 a	0.20 a	6.84 a
	± DS	0.05	0.11	0.03	0.57
2	Media	1.14 a	2.66 a	0.20 a	6.62 a
	± DS	0.06	0.26	0.03	0.58
3	Media	1.13 a	2.75 a	0.20 a	7.26 a
	± DS	0.07	0.23	0.03	1.04

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

El cuadro 45 nos muestra que no hay diferencias significativas para las tres curvas de congelación rápida sobre las variables de la morfometría de la pieza intermedia del espermatozoide.

Así mismo no hay reportes para estas variables en semen de llama al descongelado colectados por EE. Se halló un reporte en alpacas en el cual Ciprian (2019) reporta datos superiores para anchura, área de P.I y Ang. de inserción con respecto a las medias obtenidas en las tres curvas de congelación rápida de semen; pero reporta la media de Dist. Inserción igual a la que se obtuvo en la evaluación de las medias de las curvas de congelación. Estas diferencias se deberían a la diferencia de especie animal.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. En semen fresco, el volumen promedio obtenido fue 1.42 ml, con un ph de 7.01, una filancia de 1.15 cm y como color predominante el blanco lechoso claro con un 56.3%. La concentración fue de 122.44×10^6 / ml, con 64.24% de vitalidad espermática, con 92.31 % para integridad acrosomal y 88.86% de funcionalidad de membrana espermática, y una motilidad total de 51.42 %.
2. Al refrigerado los eyaculados tuvieron una vitalidad espermática de 50.63%, con 83.42 % de integridad acrosomal, 83.17% de funcionalidad de membrana espermática y motilidad total promedio de 68.70 %. Se determino diferencias significativas ($p < 0.05$) entre animales para la integridad acrosomal espermática.
3. Al descongelado se halló diferencias significativas ($p < 0.05$) para las características microscópicas del semen como la integridad acrosomal, funcionalidad de la membrana espermática e Índice de oscilación (WOB) las cuales se conservaron mejor con las curvas de congelación rápida 1 y 2. Así mismo la velocidad curvilínea (VCL), velocidad media (VAP) se vieron disminuidas con la curva de congelación rápida 1. La frecuencia de batida de cabeza (BCF) se conservó mejor en la curva 1 y 3. Sin embargo, las características microscópicas del semen como vitalidad, motilidad total, velocidad rectilínea (VSL), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y las variables morfométricas se conservaron similares sin diferencias significativas ($p > 0.05$) para las tres curvas de congelación rápida empleadas.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

1. Realizar mas estudios diseñando y evaluando curvas de congelación rápida de semen en un equipo de congelación automática de semen para camélidos sudamericanos entre 10 y 15 minutos, que mejore los resultados de las características microscopicas del semen de llama al descongelado.
2. Determinar el índice de fragmentación de ADN del espermatozoide de llama, en muestras congeladas por curvas de congelación rapida entre 10 y 15 minutos, empleando un equipo de congelación automática de semen.
3. Evaluar el efecto de congelación con curvas rápidas de 10 a 15 minutos, sobre las características microscópicas de semen colectado por el método de colecta como vagina artificial, haciendo uso de un equipo de congelación automática de semen.
4. Se recomienda realizar la evaluación de la aplicación del semen congelado de llama por curvas rápidas de congelación de semen utilizando un equipo de congelación automática de semen en la inseminación artificial en llamas.
5. Evaluar el efecto de congelación con curvas rápidas de 10 y 15 minutos sobre las características microscópicas del semen de alpacas; utilizando un equipo de congelación automática de semen.

CAPITULO VII

REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS

- Adams, G. P., Ratto, M. H., Collins, C. W., & Bergfelt, D. R. (2009). Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology*, 71(1), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.005>
- Alarcón, B., García, V., & 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=S160991172012000100007&lng=es&tlng=es.
- Aller, JF., Rebuffi, G., Cancino, A.K & 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.
- Amirat, L., Anton, M., Tainturier, D., Chatagnon, G., Battut, I., & Courtens, J. L. (2005). Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, 129(4), 535–543. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00011>
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C., Lozano, J. M., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300. <https://doi.org/10.18597/rcog.468>
- Barrera, M., Villegas, J., Sánchez, R. y Risopatrón, J. (2008). Efecto de la refrigeración sobre parámetros funcionales en espermatozoides de canino. XV Congreso Nacional de Medicina Veterinaria. Pucón Chile.

- Boiso I. (2001). Principios básicos de criobiología. Revista iberoamericana de fertilidad 18 (4). 1º Congreso ASEBIR Vol. 18 - nº 4
- 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)
- Bwanga C. O., D. E. Braganea M. M., Einarson S., Rogriguez - Martinez H. (1990). Cryopreservation of Boar semen in mini and maxi -straws. *J Vet Med*. 37: 651- 58.
- Cabrera, V., Próspero, & Pantoja, A. (2012). VIABILIDAD ESPERMÁTICA E INTEGRIDAD DEL ACROSOMA EN SEMEN CONGELADO DE TOROS NACIONALES. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(2), 192-200. Recuperado en 17 de diciembre de 2021, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000200009&lng=es&tlng=es.
- Carballo, D. M. (2009). Comparación de los diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo.
- 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 glama spermatozoa. *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., Pigretti, C., Bertuzzi, M., & Fumuso, F. (2018). Test hipoosmotico combinado a la tinción de coomassie blue en espermatozoides de llama. *spermova*, 8(2), 129–132. <https://doi.org/10.18548/aspe/0006.10>.
- Carretero, M.I., Giuliano, S.M., Casaretto, C.I., Gambarotta, M.C., & Neild, D.M. (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *InVet*, 11 (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>
- Casaretto, C., Martínez Sarrasague, M., Giuliano, S., Rubin De Celis, E., Gambarotta, M., Carretero, I., & Miragaya, M. (2011). Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia*, 44, 335–341. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01186.x>
- Cayo, S. (2013). *Inseminación artificial de alpacas (Lama pacos) con semen fresco, refrigerado y congelado colectado por el método de electroeyaculación* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Ccoiso, R. (2019). *Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas (Lama glama)* (Tesis Pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Choez, A., Ruiz, G., Sandoval, M., Evangelista, V., & Santiani, A. (2017). Determinación de la concentración óptima de tres crioprotectores para la criopreservación de

- espermatozoides epididimarios de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(3), 619-628. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13367>
- 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
- Ciereszco, A., Dabrowski, K., Lin, F., Christ, S.A., Toth, G.P. (1999). Effects of extenders and time storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved. *Trans Amer Fish Soc.* 128: 542-48.
- Ciprian, R.(2019). Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca (*vicugna pacos*) (Tesis Pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Cruz, P.E., Medina, V.M., & Velasco., Y.M. (2006). Protocolo para la crioconservación de semen de yamú: *Brycon amazonicus* Spix & Agassiz 1829. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(2), 146-151. Retrieved December 28, 2021, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000200005&lng=en&tlng=es.
- 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, H., Gallegos, M., 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>

- 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.
- Escobar, C. J. (2011). Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción.
- Fernández Baca, S., & Calderón, W. (1966). *Methods of collection of semen in the alpaca*. Revista de la FMV, UNMSM 13, 18 – 20.
- Ferrante, A., Caldevilla, M., & Miragaya, M. (2017). Combinación de la tinción de Azul de Coomassie con la prueba hipoosmótica para evaluar espermatozoides equinos y porcinos. V Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. *InVet*,; 19(1): 66.
- Flores, N. H., Giuliano, S. M., Fumuso, F. G., Miragaya, M. H., Cucho, 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>
- Franco, E. (2015). *Criopreservación de semen de alpaca (Lama pacos) en pellets* (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Fumuso, F. G., Bertuzzi, M. L., Velásquez, 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., 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 Theriogenology, Cátedra de Física Biológica, 3Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. 4CONICET, Argentina.
- 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>
- 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.
- Garner, D.L., (1997). Ancillary tests of bull semen quality. *Bull Infertility. Veterinary clinics of north america: Food Animal Practice*. Vol. 13(2), 313-330.
- 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., Bisiau, C., Carretero, M.I., Arraztoa, C.C., & Neild, D. (2012). Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. *Preliminary results. Invet;* 14(1): 279.
- 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., 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., 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., 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>
- González, R. (2000). Contratación seminal. Edit. Redondo BBAA-Argentina; pp:56-60.
- Gonzalez, R.A. (2004). Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotectores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membrana dos espermatozoides bovino. *Tesis doctoral*, Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, Brasil.
- Hafez, E. & Hafez, B. (2002). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. México D.F., México: Editorial McGraw-Hill Interamericana. 7 ed., 519 p.
- Hafez, E. (1989). Reproducción e inseminación Artificial en animales. 5° Edición-Nueva Editorial Interamericana-México.
- Holt, W. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00239-3) <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x>
- Huanca T., Mamani R. H., Naveros M. L., Pacheco J. I, Condori N. (2011). Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos*). *SPERMOVA* (2011); 1(1): 98-100.

- Huanca, W., Cordero, A., Huanca, T. & Adams, G. (2007). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domesticos: avances y perspectivas. *Arch. Latin. Prod. Anim.* 15(1): 195-201 <https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/53086/1/la07052.pdf>
- INEI. (2012). IV Censo Nacional Agropecuario
- Kershaw-Young, C. M., y Maxwell, W. M. (2012b). Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species. *Reprod. Dom. Anim.* 47(4): 369-375.
- Kershaw-Young, C., Stuart, C., Evans, G., & Maxwell, W. (2013). The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Animal Reproduction Science*, 138(3–4), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.005>
- Kumar, S., Millar, J., & Watson, P. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 46(3), 246–253. [https://doi.org/10.1016/s0011-2240\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/s0011-2240(03)00040-3)
- 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.
- Loomis, P. R. (2006). Advanced Methods for Handling and Preparation of Stallion Semen. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 22(3), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2006.07.002>
- Martí, J., Aparicio, I., & García-Herreros, M. (2011). Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology*, 75(3), 473–481. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.015>

- Martínez, A. (2004). Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 209–224. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.024>
- Maxi, E. (2019). Efecto protector de la yema de huevo de tres diferentes especies de aves durante la criopreservación del semen de Alpaca (*vicugna pacos*) (Tesis pregrado) UNSAAC, Cusco, Perú.
- Mazur, P. (1970). Cryobiology: The Freezing of Biological Systems. *Science*, 168(3934), 939–949. <https://doi.org/10.1126/science.168.3934.939>
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 247(3), C125-C142. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.c125>
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327–344. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00674-4)
- Medina, V.M; Velasco, Y.M, & Cruz , Pablo E. (2005). Aspectos generales de la crioconservación espermática en peces teleósteos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1), 34-48. Retrieved December 17, 2021, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902005000100005&lng=en&tlng=es.
- Mogrovejo D. (1952). Estudio del semen de la alpaca (Tesis de pregrado). UNMSM. Lima, Peru.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695–1706. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00682-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00682-9)
- Ordóñez, C., Ampuero E., Cucho H., Chalco G. (2012). Caracterización Morfométrica de los Espermatozoides de Alpaca Usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). *Spermova* 2012; 2(1): 67 – 68.

- 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.
- Puma, E. (2014). Comparativo de dos métodos de determinación de la condición de un pastizal tipo pajonal de pampa en el CICAS LA RAYA-FAZ-UNSAAC (Tesis de Pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Quispe, C.H., Delgado, P.A. (2012). Desarrollo de tres protocolos de colección de semen de llama (*Lama glama*). En: Resumen VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Arica. Pg. 157.
- Quispe, D. (2015). Evaluación reproductiva del plantel de reproductores del banco de germoplasma de alpacas de color del CICAS - La Raya (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Quispe, W. (2018). Comparación del efecto de dos curvas de congelación en semen de alpaca (*Vicugna pacos*) colectado por vagina artificial y post copula (Tesis de Pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Rasul, Z., Ahmed, N., & Anzar, M. (2007). Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glycerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology*, 68(5), 813–819. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.014>
- Rodriguez, M. 2013. Índice de fragmentación del ADN espermático y test de host en semen de llamas (*Lama glama*) utilizando el integrated sperm analysis system (ISAS) (Tesis de Pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- 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)
- Salisbury, G. & Vandermark, L. (1982). Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los bóvidos. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza. España.

- Santiani, A. (2015). *Uso de dos análogos de superóxido dismutasa para prevenir la desestabilización espermática prematura durante la criopreservación y vitrificación en espermatozoides de alpaca* | Repositorio CONCYTEC. <http://hdl.handle.net/20.500.12390/348>.
<http://repositorio.concytec.gob.pe/handle/20.500.12390/348>
- 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.
- Silva, A.R. (2007). Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31 (Suppl.1), 119-127.
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., Estesó, 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>
- Soler, C., Sancho, M., García, A., Fuentes, M., Núñez, J., & Cucho, H. (2013). Ejaculate Fractioning Effect on Llama Sperm Head Morphometry as Assessed by the ISAS® CASA system. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(1), 71–78. <https://doi.org/10.1111/rda.12226>
- Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Stornelli MA. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Vet* 25: 28-35.
- Sukhato P., Thongsodseang S., Utha A., Songsasen N. 2001. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Anim Reprod Scie* 67: 69–77.
- Sumar, J. (1991). *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos*. En: FAO, Oficina de la FAO para América Latina y el Caribe.

- 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>
- Töpfer-Petersen E., EkhlasiHundrieser M., Tsoлова M., Leeb T., Kirchhoff C. y Müller P. (2005). Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrología IVITA, CICAS, UNMS, Lima – Perú* 37: 202- 204.
- Troedsson, M., Desvousges, A., Alghamdi, A., Dahms, B., Dow, C., Hayna, J., Valesco, R., Collahan, P., Macpherson, M., Pozor, M., & Buhi, W. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89(1–4), 171–186. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.005>
- Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S., & Santiani, A. (2017). Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 130-140. <https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12947>
- Valdivia M., Canorio N., Carrillo N. y Uipan P. (2005). Effects of cryoprotectants on alpaca's spermatozoa during cooling process. *Biol Reprod* 73: 228.
- Valle, E. M. (2013). "Evaluación de dos técnicas de colección de semen en llamas (*Lama glama*)" en la estación experimental de Choquenaira (Tesis de pregrado) en La Paz, Bolivia.
- Vasconcelos, W.F. (2010). Eficiência da congelação automatizada na viabilidade de sêmen bovino. *Tesis máster*, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brasil.
- Vaughan, J. L., Galloway, D., & Hopkins, D. (2003). Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Australia, RIRDC, Project AAA-1A.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M. y Onclin, K. (2002). Analizadores de semen asistidos por ordenador en la investigación andrológica y la práctica

veterinaria. *Theriogenology*, 57 (1),149-179. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00664-1)

Vivanco, H. (2018). Aplicación de tecnologías reproductivas en el Perú, su impacto en el desarrollo ganadero, retos por enfrentar. *Spermova*, 8(2), 118-128. <https://doi.org/10.18548/aspe/0006.09>

Watson P. F., Critser J. K., Mazur P. 1992. Sperm preservation: fundamental cryobiology and practical implications. In: Templeton AA, Drife JO. (Editors). *Infertility*. Springer, London. 102-114.

Woelders H., Den Besten M. (1993). Cryopreservation of boar semen with small between-boar variation of post-thaw sperm survival. *Cryobiology*. 30: 645.

Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M., & Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54(4), 579–585. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00373-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00373-3)

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. Análisis de varianza para características macroscópicas.

ANVA de volumen espermático en semen fresco de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Llama	3	7.22687500	2.40895833	13.38	0.0011
colecta	3	0.51687500	0.17229167	0.96	0.4539
Error	9	1.62062500	0.18006944		
Total corregido	15	9.36437500			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.826937	29.90984	0.424346	1.418750

ANVA de pH espermático en semen fresco de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	0.03187500	0.01062500	0.73	0.5585
colecta	3	0.04687500	0.01562500	1.08	0.4069
Error	9	0.13062500	0.01451389		
Total corregido	15	0.20937500			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.376119	1.719516	0.120474	7.006250

ANVA de filancia espermático en semen fresco de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	4.61000000	1.53666667	4.82	0.0287
colecta	3	0.86000000	0.28666667	0.90	0.4787
Error	9	2.87000000	0.31888889		
Total corregido	15	8.34000000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.655875	49.10456	0.564702	1.150000

ANEXO 2. Análisis de varianza para características microscópicas en semen fresco.

ANVA de concentración espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	60767.11625	20255.70542	2.98	0.0889
colecta	3	38576.41825	12858.80608	1.89	0.2014
Error	9	61166.2050	6796.2450		
Total corregido	15	160509.7395			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.618925	67.33177	82.43934	122.4375

ANVA de vitalidad espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	73.68405000	24.56135000	4.08	0.0439
colecta	3	14.72675000	4.90891667	0.81	0.5173
Error	9	54.2122000	6.0235778		
Total corregido	15	142.6230000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.619892	3.820513	2.454298	64.24000

ANVA de integridad acrosomal espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	62.03181875	20.67727292	4.55	0.0334
colecta	3	17.78221875	5.92740625	1.30	0.3320
Error	9	40.9178563	4.5464285		
Total corregido	15	120.7318938			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.661085	2.309880	2.132236	92.30938

ANVA de funcionalidad de la membrana plasmática espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	30.58936875	10.19645625	2.93	0.0923
colecta	3	3.30766875	1.10255625	0.32	0.8133
Error	9	31.35985625	3.48442847		
Total corregido	15	65.25689375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.519440	2.100693	1.866662	88.85938

ANVA de motilidad espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	1063.334625	354.444875	2.97	0.0894
colecta	3	408.058325	136.019442	1.14	0.3841
Error	9	1073.434825	119.270536		
Total corregido	15	2544.827775			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.578190	21.23954	10.92111	51.41875

ANVA de espermatozoides móviles progresivos de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	11.29065000	3.76355000	5.30	0.0222
colecta	3	12.69515000	4.23171667	5.96	0.0160
Error	9	6.38650000	0.70961111		
Total corregido	15	30.37230000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.789726	20.91581	0.842384	4.027500

ANVA de espermatozoides móviles no progresivos de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	953.7276250	317.9092083	2.89	0.0949
colecta	3	377.9630750	125.9876917	1.14	0.3827
Error	9	990.893875	110.099319		
Total corregido	15	2322.584575			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.573366	22.14084	10.49282	47.39125

ANVA del área del espermatozoide de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	8.54206875	2.84735625	11.72	0.0018
colecta	3	0.48601875	0.16200625	0.67	0.5932
Error	9	2.18615625	0.24290625		
Total corregido	15	11.21424375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.805055	3.338703	0.492855	14.76188

ANVA del perímetro del espermatozoide de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	3.38495000	1.12831667	8.17	0.0062
colecta	3	0.06485000	0.02161667	0.16	0.9229
Error	9	1.24350000	0.13816667		
Total corregido	15	4.69330000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.735048	2.358178	0.371708	15.76250

ANVA del acrosoma del espermatozoide de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	238.8702500	79.6234167	18.81	0.0003
colecta	3	2.5662000	0.8554000	0.20	0.8924
Error	9	38.1039500	4.2337722		
Total corregido	15	279.5404000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.863691	4.541691	2.057613	45.30500

ANEXO 3. Analisis de varianza de características microscópicas en semen refrigerado.

ANVA de vitalidad espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Llama	3	156.0128500	52.0042833	29.23	<.0001
Colecta	3	10.0281000	3.3427000	1.88	0.2036
Error	9	16.0139500	1.7793278		
Total corregido	15	182.0549000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.912038	2.634763	1.333914	50.62750

ANVA de integridad acrosomal espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Llama	3	273.7330688	91.2443563	7.91	0.0068
Colecta	3	50.8108688	16.9369563	1.47	0.2876
Error	9	103.8570063	11.5396674		
Total corregido	15	428.4009438			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.757571	4.072023	3.397009	83.42313

ANVA de funcionalidad de la membrana plasmática espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	42.77436875	14.25812292	2.58	0.1186
colecta	3	0.79811875	0.26603958	0.05	0.9851
Error	9	49.79125625	5.53236181		
Total corregido	15	93.36374375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.466696	2.828166	2.352097	83.16688

ANVA de motilidad espermática total de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Llama	3	324.0227500	108.0075833	0.48	0.7073
Colecta	3	831.1302000	277.0434000	1.22	0.3580
Error	9	2045.726350	227.302928		
Total corregido	15	3200.879300			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.360886	21.94631	15.07657	68.69750

ANVA de espermatozoides móviles progresivos de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	2.64346875	0.88115625	3.28	0.0727
colecta	3	1.95456875	0.65152292	2.42	0.1330
Error	9	2.42015625	0.26890625		
Total corregido	15	7.01819375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.655160	19.03415	0.518562	2.724375

ANVA de espermatozoides móviles no progresivos de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Llama	3	310.7344687	103.5781562	0.47	0.7121
Colecta	3	804.7906687	268.2635562	1.21	0.3604
Error	9	1993.428006	221.492001		
Total corregido	15	3108.953144			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.358811	22.55859	14.88261	65.97313

ANVA del área del espermatozoide de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Llama	3	6.35892500	2.11964167	15.42	0.0007
Colecta	3	0.36287500	0.12095833	0.88	0.4870
Error	9	1.23677500	0.13741944		
Total corregido	15	7.95857500			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.844598	2.502414	0.370701	14.81375

ANVA del perímetro del espermatozoide de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	2.88846875	0.96282292	12.96	0.0013
colecta	3	0.12096875	0.04032292	0.54	0.6651
Error	9	0.66870625	0.07430069		

Total corregido	15	3.67814375		
R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media	
0.818195	1.754840	0.272582	15.53313	

ANVA del acrosoma del espermatozoide de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	271.2987250	90.4329083	4.52	0.0339
colecta	3	24.6450750	8.2150250	0.41	0.7493
Error	9	180.0277750	20.0030861		
Total corregido	15	475.9715750			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	y Media
0.621768	9.470328	4.472481	47.22625

ANEXO 4. Análisis de varianza de características microscópicas en semen descongelado, congelado con tres curvas rápidas.

ANVA de vitalidad espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	1897.958942	632.652981	39.99	<.0001
colec	3	105.891142	35.297047	2.23	0.1030
curva	2	9.490017	4.745008	0.30	0.7429
llama*curva	6	26.535733	4.422622	0.28	0.9425
Error	33	522.040358	15.819405		
Total corregido	47	2561.916192			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.796231	13.25916	3.977362	29.99708

ANVA de integridad acrosomal espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	3160.757673	1053.585891	92.89	<.0001
colec	3	79.771023	26.590341	2.34	0.0909
curva	2	175.376454	87.688227	7.73	0.0018
llama*curva	6	100.649396	16.774899	1.48	0.2158
Error	33	374.300102	11.342427		
Total corregido	47	3890.854648			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.903800	4.517032	3.367852	74.55896

ANVA de funcionalidad de la membrana plasmática espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	64.18820625	21.39606875	10.93	<.0001
colec	3	14.78610625	4.92870208	2.52	0.0752
curva	2	36.96446250	18.48223125	9.44	0.0006
llama*curva	6	24.04863750	4.00810625	2.05	0.0870
Error	33	64.6174187	1.9581036		
Total corregido	47	204.6048313			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.684184	1.790402	1.399323	78.15688

ANVA de motilidad total espermática de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Llama	3	3457.203375	1152.401125	19.41	<.0001
Colec	3	63.518842	21.172947	0.36	0.7846
curva	2	132.459350	66.229675	1.12	0.3397
llama*curva	6	377.813350	62.968892	1.06	0.4054
Error	33	1958.887808	59.360237		
Total corregido	47	5989.882725			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.672967	27.51751	7.704559	27.99875

ANVA de espermatozoides móviles progresivos de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Llama	3	2.73895000	0.91298333	1.56	0.2166
colec	3	0.66046667	0.22015556	0.38	0.7701
curva	2	21.10701667	10.55350833	18.08	<.0001
llama*curva	6	5.33015000	0.88835833	1.52	0.2018
Error	33	19.26448333	0.58377222		
Total corregido	47	49.10106667			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.607657	59.15225	0.764050	1.291667

ANVA de espermatozoides móviles no progresivos de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	3308.983242	1102.994414	19.58	<.0001
colec	3	66.625675	22.208558	0.39	0.7579
curva	2	48.962317	24.481158	0.43	0.6512
llama*curva	6	466.065233	77.677539	1.38	0.2521
Error	33	1858.804925	56.327422		
Total corregido	47	5749.441392			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.676698	28.10176	7.505160	26.70708

ANVA del área del espermatozoide de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	20.00582292	6.66860764	82.17	<.0001
colec	3	0.26627292	0.08875764	1.09	0.3655
curva	2	0.06721667	0.03360833	0.41	0.6643
llama*curva	6	1.26333333	0.21055556	2.59	0.0359
Error	33	2.67805208	0.08115309		
Total corregido	47	24.28069792			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.889704	1.929195	0.284874	14.76646

ANVA del perímetro del espermatozoide de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	5.47636667	1.82545556	18.85	<.0001
colec	3	1.00125000	0.33375000	3.45	0.0277

curva	2	0.02101250	0.01050625	0.11	0.8975
llama*curva	6	0.50782083	0.08463681	0.87	0.5245
Error	33	3.19625000	0.09685606		
Total corregido	47	10.20270000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.686725	1.994023	0.311217	15.60750

ANVA del porcentaje de acrosoma del espermatozoide de llamas colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
llama	3	3160.757673	1053.585891	92.89	<.0001
colec	3	79.771023	26.590341	2.34	0.0909
curva	2	175.376454	87.688227	7.73	0.0018
llama*curva	6	100.649396	16.774899	1.48	0.2158
Error	33	374.300102		11.342427	
Total corregido	47	3890.854648			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.903800	4.517032	3.367852	74.55896