

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

SEDE CANCHIS



EFFECTO PROTECTOR DE LA YEMA DE HUEVO DE TRES DIFERENTES
ESPECIES DE AVES DURANTE LA CRIOPRESERVACION DEL SEMEN DE
ALPACA (*Vicugna pacos*)

Tesis presentada por el Bachiller en Medicina
Veterinaria, EDWAR MAXI ALCCA, para optar
al Título Profesional de MEDICO
VETERINARIO.

ASESORES:

Dr. ENRIQUE AMPUERO CASQUINO

Dr. WILBER GARCIA VERA

M.Sc. AYDEE MEZA CHATATA

K'AYRA – CUSCO

2019

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres:

LEONARDO Y JUANA

Con mucho cariño y Amor, a quienes debo la vida y un eterno reconocimiento; por sus consejos y apoyo moral en todo momento de mi vida académica, permitiéndome lograr mis metas y concluir mis estudios universitarios

A mi esposa e hija:

Sonia y Nicole

Por ser parte de mi vida, por estar ahí siempre en los momentos más necesitados, por apoyarme en los momentos difíciles y por esos buenos momentos que siempre hemos compartido.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, y un reconocimiento a todos y cada uno de los docentes de la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria sede Canchis, quienes contribuyeron con sus conocimientos y enseñanzas en mi formación profesional.
- A mis asesores de tesis: Dr. Enrique Ampuero Casquino, Dr. Wilber García Vera y Msc. Aydee Meza Chatata, por sus asesoramientos y orientaciones en proceso experimental del presente trabajo de investigación quien, con su conocimiento, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mi formarme como persona profesional e investigador.
- Mis sinceros sentimientos de gratitud al “CICAS La Raya” y al director Msc. Hernán Cucho Dolmos por su apoyo, paciencia incondicional y facilidades brindadas durante la ejecución de mi tesis.
- A los distinguidos miembros del jurado por su valioso tiempo y sus sabios consejos.
- Al personal técnico y administrativo del centro de investigación de camélidos sudamericanos (CICAS – La Raya) por el apoyo brindado durante la realización del trabajo de investigación, en especial a los técnicos. Ladislao; Teófilo, Hipólito, Justo Puma, Pedro Puma, Víctor Condori, Dionicio Pinto, Benito Jara, Julio Barrios, Eduardo Sambrano, Benito Núñez, Wilber Parqui, Dambler Núñez, Nicolas Morales, Efraín Aroni, Francisco, José Navarro, que me brindaron su apoyo y su amistad.
- Al personal técnico y administrativo del Ivita-UNMSM-Marangani, en especial al Dr. Danilo Pezo Carreón y a los Técnicos Jacinto, Julio, Antonio, Alfredo, Señorita Maribel y al Señor Santiago, que me brindaron su apoyo y su amistad.
- A los compañeros que me apoyaron: Ruth, Rufina, Sheyla, Mónica, Ada, Ivan, Mitzi, José; quienes me acompañaron durante los arduos y agradables momentos en el centro de investigación en camélidos sudamericanos (CICAS) – La Raya – UNSAAC.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE TABLAS.....	vii
INDICE DE FLUJOGRAMA	viii
INDICE DE FIGURA.....	viii
INDICE DE GRAFICOS	ix
GLOSARIO.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCION.....	1
IDENTIFICACION DE PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACION.....	3
1. Formulación de problema	3
2. Problema general	3
3. Problema específico	3
CAPITULO I.....	5
1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION	5
1.1. Objetivo General	5
1.2. Objetivo Específico.....	5
1.3. Justificación de la Investigación	5
CAPITULO II.....	7
REVISION BIBLIOGRAFICA	7
2.1. Antecedentes.....	7
2.2. Anatomía reproductiva y fisiología de la alpaca macho.....	9
2.3. Colección de semen.....	10
2.4. Características bioquímicas del plasma seminal.....	14
2.5. Característica macroscópica del semen.....	15
2.5.1.Volumen	15
2.5.2.Color	16
2.6. Características microscópicas del semen	16
2.6.1.Motilidad espermática.....	16
2.6.2.Concentración espermática	17
2.6.3.Vitalidad Espermática	18
2.6.4.Morfología espermática	19
2.6.5.Test Hipo osmótico (HOST) o Endosmosis	21
2.6.6.Integridad de la membrana Acrosomal	22
2.7. Criopreservación del semen.....	24
2.7.1.Diluyente del semen	25

2.7.2.Fase de enfriamiento	31
2.7.3.Fase de congelación.....	31
2.7.4.Fase de descongelamiento.....	33
2.7.5.Incubación del semen descongelado.....	34
CAPITULO III.....	35
MATERIALES Y METODOS.....	35
3.1. Ámbito de estudio	35
3.2. Disponibilidad alimenticia	35
3.3. Materiales y equipos.	36
3.3.1.De los animales	36
3.3.2.Materiales para la colección del semen.....	36
3.3.3.Materiales de laboratorio	36
3.3.4.Reactivos e insumos.....	36
3.3.5.Equipos de laboratorio.....	37
3.3.6.De laboratorio	37
3.4. Aves para obtención de yemas de huevo	38
3.5. Preparación del dilutor para la criopreservación	39
3.6. Colección del semen.....	40
3.7. Evaluación de semen.....	40
3.7.1.Pre selección de eyaculados frescos.....	40
3.7.2.Evaluación microscópica del semen mezclado (<i>pool</i>)	42
3.8. Criopreservación de semen	45
3.8.1.Refrigeración y congelación de semen.....	45
3.8.2.Descongelación	46
3.8.3.Incubación del semen.....	47
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
CAPITULO IV	52
RESULTADOS Y DISCUSIONES	52
4.1. Evaluación macroscópica y microscópica del semen fresco.....	52
4.1.1.Volumen	52
4.1.2.Color	53
4.1.3.Motilidad subjetiva	53
4.1.4.Evaluaciones microscópicas del semen seleccionado (<i>pool</i>) en la etapa de fresco	54
4.2. Motilidad total en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas en los tres tratamientos.....	56
4.3. Vitalidad espermática en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas en los tres tratamientos.....	59

4.4. Test hipo osmótico (Host) en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas en los tres tratamientos.....	61
4.5. Integridad de la membrana acrosomal en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas en los tres tratamientos	64
CAPITULO V	67
CONCLUSION	67
RECOMENDACIONES.....	68
CAPITULO VI	69
BIBLIOGRAFIA.....	69

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño y peso testicular en relación a la edad y peso corporal en alpacas.....	10
Tabla 2. Métodos de colección de semen ensayados en alpacas.	14
Tabla 3. Componentes bioquímicos del plasma seminal de la alpaca.....	15
Tabla 4. Volumen de eyaculado en alpacas por método de colección.	16
Tabla 5. Color del eyaculado de alpaca por método de colección.	16
Tabla 6. Motilidad espermática de alpacas por métodos de colección.	17
Tabla 7. Concentración espermática por método de colección en alpacas.	18
Tabla 8. Vitalidad espermática en alpacas por método de colección.....	19
Tabla 9. Espermatozoides normales en alpaca por método de colección.	21
Tabla 10. Test hipo osmótico (Host) en alpaca por método de colección.....	22
Tabla 11. Integridad del acrosoma espermático de la alpaca según método de colección.	24
Tabla 12. Composición de la yema de huevo de gallina, codorniz y pata.....	30
Tabla 13. Contenido de fosfolípidos de la yema de gallina, codorniz y pata....	30
Tabla 14. Composición de ácidos grasos de la yema de huevo de gallina, codorniz y pata.	30
Tabla 15. Componentes del dilutor A y B para cada tratamiento.	39
Tabla 16. Calificación subjetiva de la motilidad espermática de la alpaca.....	41
Tabla 17. Volumen de semen fresco por alpaca.....	52
Tabla 18. Porcentaje del color de eyaculado de alpaca por el método post copula.....	53
Tabla 19. Motilidad subjetiva de cada alpaca colectado por el método post copula.....	53
Tabla 20. Promedio de las variables microscópicas del pool en fresco.	54
Tabla 21. Efecto de los tratamientos (YHG, YHC y YHP) sobre la motilidad total en las etapas de refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas.	56
Tabla 22. Efecto de los tratamientos (YHG, YHC y YHP) sobre la vitalidad espermática en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas.....	59
Tabla 23. Efecto de los tratamientos (YHG, YHC y YHP) sobre el test hipo osmótico (Host) en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas.	61

Tabla 24. Efecto de los tratamientos (YHG, YHC y YHP) sobre la Integridad del acrosoma del espermatozoide en refrigerado, descongelado, Incubado (1.5 y 3) horas.	64
---	----

INDICE DE FLUJOGRAMA

Flujograma 1. Colección, pre seleccion del semen de alpaca.	48
Flujograma 2. Dilucion de la fraccion A y B para la congelacion de semen de alpaca.....	49
Flujograma 3. Descongelacion e incubacion por 1.5 y 3 horas del semen de alpaca.....	50

INDICE DE FIGURA

Figura 1. Vagina artificial modificada para la colección de semen de alpacas (Bravo et al., 1997).....	13
Figura 2. Representacion esquematica de tipicos cambios morfologicos en espermatozoides sometidos a estrés hipo osmotico.	22
Figura 3. Integridad acrosomal.	23
Figura 4. Centro de investigacion de camelidos sudamericanos (CICAS) “La Raya”.....	35
Figura 5. Laboratorio de Reproduccion.	38
Figura 6. Yema de huevo de Gallina, Codorniz y Pata.....	38
Figura 7. Preparacion del dilutor fraccion A y B para cada tratamiento.....	39
Figura 8. Colección metodo post copula y almacenado del semen de alpaca a temperatura corporal.	40
Figura 9. Pre selección de eyaculados y obtencion del pool (Mezcla).	42
Figura 10. Evaluacion en el sistema CASA.	43
Figura 11. Dilutor fraccion A y B para cada tratamiento.	46

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Efecto del proceso de criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas sobre la Motilidad total de los espermatozoides.	58
Gráfico 2. Efecto del proceso de criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas sobre la Vitalidad de los espermatozoides.	60
Gráfico 3. Efecto del proceso de criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas sobre el Test hipo osmótico de los espermatozoides.	62
Gráfico 4. Efecto del proceso de criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas sobre la Integridad acrosomal de los espermatozoides.	66

GLOSARIO

ADN:	Acido desoxirribonucleico
ANOVA:	Análisis de varianza
ATP:	Adenosín trifosfato
CICAS:	Centro de investigación en camélidos sudamericanos
CLC:	Colesterol
DMF:	Dimetil formalmida
GAG:	Glicosaminoglicanos
IA:	Inseminación artificial
ISAS:	Sistema integrado de análisis de semen
MUFA:	Ácido graso monoinsaturado
PUFA:	Ácido graso poliinsaturado
PE:	Fosfatidil etanolamina
PC:	Fosfatidil colina
PC:	Post copula
SFA:	Ácido graso saturado
T1:	Tratamiento 1
T2:	Tratamiento 2
T3:	Tratamiento 3
YH:	Yema de huevo
YHG:	Yema de huevo gallina
YHC:	Yema de huevo codorniz
YHP:	Yema de huevo pata

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la calidad del semen de alpaca crio preservado e incubado por 1.5 y 3 horas en yemas de huevo de gallina (YHG), codorniz (YHC) y pata (YHP), la colección de semen se realizó en 8 alpacas y por método de post copula, se pre selecciono los eyaculados mayor a 1 ml de volumen, de color rojo claro y motilidad subjetiva $\geq 60\%$, los eyaculados seleccionados fueron mezclados en un tubo falcón (Pool), para la evaluación se consideró motilidad total, vitalidad espermática, test hipo osmótico e integridad de la membrana acrosomal, en las etapas de fresco, refrigerado, descongelado, incubado 1.5 y 3 horas. El pool fue dividido en tres alícuotas (03 tratamientos), se utilizó un mismo dilutor A Tris, ácido cítrico, fructosa, tilosina, gentamicina, lincomicina, dilutor B tris, ácido cítrico, fructosa, glicerol 5%, tilosina, gentamicina, lincomicina, para cada uno de estos dos dilutores se adiciono el 20% del dilutor YHG, YHC y YHP; el dilutor A se utilizó durante la etapa de refrigeración diluyéndose a una temperatura de 26°C disminuyendo hasta los 5°C en dos horas. Para el equilibrado y empajuelado se agregó el dilutor B a las alícuotas a una temperatura de 5°C por 20 minutos, la congelación se realizó en forma horizontal sobre vapores de nitrógeno líquido; así mismo, el descongelado de las pajuelas se realizó a 37 °C x 60 segundos. luego todas las muestras se incubaron en baño maría a una temperatura de 37°C por 1.5 y 3 horas. Los parámetros microscópicos fueron analizados en un diseño completamente al azar. No encontrándose diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre la YHC y YHG, los mismos con diferencia significativa ($P \leq 0.05$) comparados con la YHP en la motilidad total e integridad acrosomal. Por otra parte, en la disminución de los parámetros de vitalidad y test hipo osmótico durante todo el proceso de crio preservación e incubación no se encontraron diferencia significativa ($P \geq 0.05$). En conclusión, la yema de huevo de gallina y codorniz tuvieron mejores resultados en los parámetros de vitalidad e integridad acrosomal durante la crio preservación de los espermatozoides de alpaca en comparación a la yema de huevo de pata.

Palabras claves: criopreservación, incubación, yema de huevo, alpaca.

INTRODUCCION

El 87% de la población mundial de alpacas se encuentra en el Perú y la actividad de crianza es un medio de vida para un aproximado de 120,000 familias. Cusco, es la segunda región productora de alpacas a nivel nacional (INEI), la crianza de este camélido es fundamental para la economía de la población dedicada a esta actividad.

En la crianza de alpacas no ha sido desarrollada la biotecnología reproductiva de inseminación artificial con semen criopreservado debido a la diferente fisiología reproductiva comparado con otras especies domesticas (Bustinza, 2001); del mismo modo, a la dificultad para la obtención de semen (Banda *et al.*, 2010); así mismo, al daño producido al espermatozoide durante la congelación que causan reducción de la calidad del semen (Watson, 2000). Por ello actualmente se viene investigando diferentes métodos de obtención de semen, protocolos de criopreservación y técnicas de evaluación para conocer el daño producido durante el proceso de criopreservación y mejorar la tecnología.

En los últimos reportes de criopreservación de semen de alpaca se han obtenido muestras de semen con motilidad al descongelado entre 8 – 36% con dilutores que incluyen tris, glicerol, yema de huevo de gallina (Ciprian, 2018; Choez *et al.*, 2017; Ccalta, 2017; Quispe, 2015). La yema de huevo tiene la capacidad de reducir los daños durante la congelación debido a la presencia de ácidos grasos, colesterol, fosfolípidos que tienen la función de interactuar con la membrana plasmática formando una capa protectora (Lamia *et al.*, 2005). Es así que para el mismo fin se ha comparado la yema de huevo de codorniz, frente a la yema de huevo de gallina en semen de alpaca obteniendo mejores resultados con la yema de huevo de gallina (Chuctaya, 2012), otro estudio en equinos se ha

comparado la adición de la yema de huevo de pata frente a la yema de huevo de gallina al dilutor en la criopreservación y longevidad espermática, obteniendo mejores resultados en el dilutor que contenía yema de huevo de pata, esto se atribuía a que los niveles más altos de proteínas, lípidos y el colesterol están presentes en la yema de huevo de pata (Clulow *et al.*, 2006).

Es por ello que en el presente estudio se comparó yemas de huevo de diferentes aves domésticas en la criopreservación de los espermatozoides de alpaca.

IDENTIFICACION DE PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACION

1. Formulación de problema

La inseminación artificial con semen descongelado es una biotecnología reproductiva que acelera el progreso genético en especies domesticas; sin embargo, en camélidos sudamericanos como la alpaca esta biotecnología no está siendo aplicable debido a la dificultad para conseguir muestras de semen fresco y al poco conocimiento del proceso fisiológico que ocurre durante la criopreservación de los espermatozoides, obteniéndose al descongelado espermatozoide de mala calidad (Banda *et al.*, 2010).

El principal obstáculo para el desarrollo de la criopreservación es el daño producido por el descenso de la temperatura durante la congelación en el cual se pierde aproximadamente el 50% de la población inicial de espermatozoides viables debido a los daños físicos, químicos y mecánicos (Watson, 1995). Para contrarrestar estos daños en los espermatozoides, se está utilizando como crioprotector no permeable la yema de huevo de gallina casi en todos los protocolos de criopreservación y como resultado se está obteniendo bajos porcentajes de viabilidad al descongelado, por este motivo en el presente estudio se utilizará yemas de huevo de otras especies.

2. Problema general

- ¿Cuáles serán las calidades del semen de alpaca criopreservado e incubado en yemas de huevo de gallina, codorniz y pata?

3. Problema específico

- ¿Cuáles serán las características del semen fresco (volumen, color, motilidad subjetiva) y pre seleccionado *pool* (concentración espermática, morfología) en fresco?

- ¿Cuáles serán las características microscópicas del semen pre seleccionado *pool* (motilidad total, vitalidad, test hipo osmótico e Integridad de la membrana acrosomal) en fresco, refrigerado, descongelado e incubado (1.5 y 3) horas de huevo de gallina codorniz y pata?
- ¿Cuáles serán los efectos de la criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas en las características microscópicas del semen preseleccionado *pool* (motilidad total, vitalidad, test hipo osmótico e Integridad de la membrana acrosomal)?

CAPITULO I

1. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

1.1. Objetivo General

- Evaluar la calidad del semen de alpaca criopreservado e incubado en yemas de huevo de gallina, codorniz y pata.

1.2. Objetivo Especifico

- Evaluar las características del semen fresco (volumen, color, motilidad subjetiva) y pre seleccionado *pool* (concentración espermática, morfología).
- Evaluar las características microscópicas del semen pre seleccionado *pool* (motilidad total, vitalidad, test hipo osmótico e Integridad de la membrana Acrosomal) en fresco, refrigerado, descongelado e incubado 1.5 y 3 horas usando yemas de huevo de gallina, codorniz y pata.
- Comparar el efecto de la criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas en las características microscópicas del semen preseleccionado *pool* (motilidad total, vitalidad, test hipo osmótico e Integridad de la membrana acrosomal).

1.3. Justificación de la Investigación

La criopreservación de semen es una técnica que permite detener sus reacciones biológicas de los espermatozoides después de la eyaculación por periodos de tiempo indefinidos mediante el mantenimiento de estas células en temperaturas muy bajas -196°C en nitrógeno líquido (Santiani *et al.*, 2012). La utilización del semen congelado para la inseminación artificial ha contribuido al progreso genético en diversas especies domesticas (Stornelli *et al.*, 2005), a

excepción de las alpacas, debido a factores como el largo periodo de apareamiento y las características propias del semen bajo volumen, baja concentración y plasma seminal viscoso (Morton *et al.*, 2006); así mismo, a la falta de información para obtener espermatozoides de buena calidad luego del proceso de criopreservación (Santiani *et al.*, 2012).

El daño producido durante la congelación podría ser reducido parcialmente utilizando crioprotectores no permeables como las yemas de huevos de diferentes aves que son ricos en lípidos, proteína y otros componentes que directa o indirecta favorecen la criopreservación de los espermatozoides de las diferentes especies. Es así, el contenido total de lípidos y proteína presentes en las yemas de huevo de gallina, codorniz y pata son similares, y con mayor porcentaje de colesterol en la yema de huevo de pata en comparación con las otras yemas, por otra parte, el oleato de metilo [18:1 (n-9)]; palmitato de metilo (16:0) y metil linoleato (18:2) representan el 86; 83 y 83% de ácidos grasos totales en gallina, codorniz y pata respectivamente, así mismo, la yema de huevo de pata tiene más concentración de fosfatidil inositol (PI) en comparación a las demás yemas; del mismo modo la yema de huevo de codorniz tiene más concentración de fosfatidil serina en comparación a la yema de huevo de gallina y pata (Bathgate *et al.*, 2006).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) durante la congelación descongelación son desintegradas en colesterol, fosfolípidos, triglicéridos y ácidos grasos; los cuales vendría a inter actuar con la bicapa lipídica para formar una capa protectora en la superficie de las membranas espermáticas (Lamia *et al.*, 2005). Reduciendo el daño producido durante la congelación.

CAPITULO II

REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Antecedentes

alrededor del 50% de los espermatozoides se mueren a causa de lesiones criogénica durante el proceso de criopreservación y descongelación del semen. Estas lesiones pueden ser minimizados mediante el uso de diferentes agentes crioprotectores de los cuales, la yema de huevo (YH) es la más antigua e irremplazable en la preparación de dilutores para varias especies, por la función protectora durante el descenso de temperatura (choque térmico) en la criopreservación. Todo esto, debido a la presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Es así, Chuctaya (2012) comparo cinco dilutores: T1 (suero de albumina); T2 (Tris buffer yema de huevo de codorniz); T3 (Tris buffer yema de huevo gallina); T4 (Tris buffer yema de huevo sintética); T5 (sales de tyroides) en la criopreservación del semen de alpaca, colectando semen por el método de post copula obteniéndose mejor porcentaje de motilidad al descongelado en la yema de huevo de gallina (T3). De la misma forma, al comparar la yema de huevo de codorniz con la yema de huevo gallina a una concentración de 10%, durante la criopreservación de espermatozoides de burro, se demostró que la yema de huevo de codorniz mejora el porcentaje de motilidad comparado a la yema de huevo de gallina (Trimeche *et al.*, 1997).

De igual forma, se ha comparado la yema de huevo de pata con la yema de huevo de gallina en la criopreservación y longevidad del espermatozoide del equino, el estudio encontró que el dilutor modificado que incluía yema de huevo de pata es beneficioso para la criopreservación y longevidad de espermatozoide de equino,

esto se atribuye a los más altos porcentajes de proteína, lípidos y el colesterol presente en la yema de huevo de pata (Clulow *et al.*, 2006).

Por otra parte, se comparó el efecto de la yema de cinco especies de aves (gallina doméstica, pata doméstica, ganso doméstico, codorniz japonesa y paloma doméstica) en la criopreservación de semen de toro, se demostró que la yema de huevo de paloma proporciono mejor efecto crioprotector en la criopreservación a una concentración de 20% (Lei Sua *et al.*, 2008).

En otro estudio se reemplazó la yema de huevo de gallina (YHG) con yema de huevo de codorniz (YHC) y pata (YHP); no solamente se hizo el estudio comparando al descongelado sino también se examinó la composición química de cada yema de huevo en el cual indica que los componente básicos de las YH eran similares; pero la composición de ácidos grasos y fosfolípidos eran diferentes, la YHP tiene más ácidos grasos monoinsaturados que la YHG y YHC; la YHP tiene más cantidad de fosfatidilinositol que la YHG y YHC; la YHC tiene más fosfatidilserina en comparación a la YHG y YHP; aunque este estudio encontró diferencias entre las diferentes composiciones de los tipos de YH, del cual demostró que la sustitución de YHG con YHC y YHP no ha mejorado la motilidad después de la descongelación; en contraste a los resultados mencionados anteriormente, ha habido varios reportes que muestran diferencias cuando se usa yema de huevo de gallina en comparación a la yema de huevo de otras especies. La posible explicación para los resultados diferentes puede ser la dieta, manejo de las aves y razas (Bathgate *et al.*, 2006).

Del mismo modo, se comparó el efecto de la yema de huevo de gallina y pata a una concentración de 20%, en la criopreservación del semen de búfalo Nili-Ravi, este estudio encontró que la yema de huevo de pata mejoro

significativamente la motilidad al descongelado y redujo los traumas y daños en la cola del espermatozoide (Jamil-ur-Rahman, 2011).

2.2. Anatomía reproductiva y fisiología de la alpaca macho

Los camélidos presentan un pene fibro elástico con una flexura sigmoidea pre-escrotal que permite la retracción del pene en el prepucio en un estado de no erección (Smith, 1999). En las alpacas el pene erecto tiene una longitud de 35 - 40 cm (Brown, 2000), la estructura interna consta de tres cuerpos cavernosos que están rodeados por fibras gruesas de la túnica albugínea (5-7 mm de espesor en camellos (Elwishy, 1988). En su extremo terminal, presenta una proyección cartilaginosa con forma de gancho curvado y tiene un pequeño proceso uretral de aproximadamente 1 cm de longitud en alpacas (Sumar, 1983). La punta cartilaginosa puede ser una adaptación para facilitar la penetración a través del cérvix durante la copula (Smith, 1999).

Los dos testículos se mantienen en un escroto no pendular situado por debajo del ano. El escroto, que es de naturaleza similar a la protuberancia sub-anal encontrado en cerdos, roedores y carnívoros citado por (Brown, 2000), mantiene los testículos (y los espermatozoides contenidos) a una temperatura ligeramente más baja que la temperatura del cuerpo. El peso promedio de los testículos completamente desarrollados es de aproximadamente 15 g. Sin embargo, el tamaño y peso testicular de los animales varía considerablemente en relación a su edad y peso corporal (Ver Cuadro 1). Los conductos eferentes se extienden desde el testículo dentro de la cabeza del epidídimo (Bravo, 1995). El epidídimo es pequeño y estrechamente adherido al testículo (Smith, 1999), el cual consta de una cabeza, cuerpo y cola. La cabeza y el cuerpo son sitios de maduración espermática, mientras que la cola está asociada con el

almacenamiento de los espermatozoides (Elwishy, 1988). Los conductos deferentes, son tubos musculares por los que se excretan los espermatozoides al exterior, el cual se origina en la cola del epidídimo. La longitud total del conducto deferente es de unos 40 cm. En la parte final de su trayecto, cerca de la vejiga, el conducto deferente se dilata, pero no forma la ampolla característica del conducto deferente como en otras especies (Sumar, 1996). La próstata es en forma de H y se encuentra en el cuello de la vejiga y las glándulas bulbo uretrales, que son de forma ovalada, se encuentran a ambos lados de la uretra a la salida pélvica. No existen vesículas seminales en los camélidos sudamericanos (Smith, 1999).

Tabla 1. Tamaño y peso testicular en relación a la edad y peso corporal en alpacas.

Edad (Años)	Dimensiones Testiculares (cm)	Peso testicular (gr)	Peso corporal (Kg)
1	2.5 x 1.5	2.9	36.6
2	3.4 x 2.3	13.9	43.9
3	3.7 x 2.4	13.8	52

Fuente: Morton *et al.*, 2008.

2.3. Colección de semen

Los reportes sobre métodos de colección son diversos, desde el primer reporte de (Mogrovejo, 1952) quien colecto semen de alpacas, utilizando una **funda de látex** colocada intravaginal mente antes de la cópula, después de la monta se retiraba la funda que servía de recipiente de semen. Con esta técnica se logró coleccionar semen, pero presentaba algunos inconvenientes ya que se interfería con la cópula normal y alargaba el tiempo de monta más allá de los valores normales. También, la colocación de la funda dentro del tracto genital y su fijación ofrecía serias dificultades y con frecuencia provocaban lesiones que inhabilitaban a la hembra para su uso posterior. San Martín (1961) utiliza un

método el cual se usa trozos de **esponja** que se introducen en la parte anterior de la vagina y que absorben el semen y otros fluidos vaginales, sirviendo como contenedores. El inconveniente de este método es que el semen que logra obtener es muy contaminado y está mezclado con los fluidos del tracto genital femenino, lo cual hace que se diluya el semen y lo contamine con bacterias, dificultando así su evaluación, por lo que no se recomienda su uso para fines de inseminación artificial. Por lo tanto, estos dos métodos interfieren con la normal eyaculación y dan como resultado un tiempo menor de cópula, movimientos continuos del macho, formación de espuma y daño al espermatozoide (Sumar, 1983; Johnson, 1989; Bravo, 1995) y en consecuencia ya no se utilizan más (Bravo *et al.*, 2012).

Otro tipo de colección fue por medio de una **fístula en la uretra peneana**, pero tenía como desventajas los cuidados post operatorios y la discapacidad del macho (Von Kubineck, 1974).

En 1966, Fernández-Baca y Calderón reportaron el uso del electro **eyaculación** para la colección de semen de alpacas, utilizando un equipo de fabricación nacional, con una intensidad máxima de 40 voltios, se obtuvieron muestras de semen con la ventaja de realizar la colección sin la necesidad de tener hembras en celo, acortar el tiempo de colección y realizarla a lo largo de todo el año. Los resultados de electro eyaculación muestran gran variabilidad entre animales y aun entre el mismo animal, además de obtenerse semen muy diluido con las secreciones de las glándulas anexas, semen contaminado y baja concentración espermática (Pacheco, 2008). Otras desventajas incluyen el requerimiento de una sedación profunda del animal o anestesia general, contaminación del semen por la orina, incapacidad para evaluar libido,

concentración espermática variable y el bienestar animal (Sumar, 1983; Johnson, 1989; McEvoy *et al.*, 1994; Bravo, 1995; Giuliano *et al.*, 2002).

Posteriormente se reporta el uso de una **vagina artificial** adaptada de ovinos (figura 1), que, si bien mejora la técnica de colección, aún presenta dificultades para mantener una temperatura adecuada durante el tiempo de la cópula (Sumar y Leyva, 1981; Zirena, 2014). Bravo *et al.*, 1997 describieron el uso de una frazadilla eléctrica cubriendo la vagina artificial, lo que permite algunas mejoras en la técnica de colección, facilitando el mantenimiento de la temperatura. Igualmente, el uso de un maniquí (Zirena, 2014; Sumar y Leyva, 1981; Garnica *et al.*, 1993) o la colección con hembra receptiva (Zirena, 2014; Huanca y Gauly, 2001) son alternativas para la colección de una muestra de semen fisiológicamente normal; sin embargo, se requiere un entrenamiento de los animales y no siempre todos los machos llegan a aceptar el maniquí; mientras que el uso de hembra receptiva genera incomodidades en el operador. Las ventajas de la vagina artificial para la colección de semen incluyen la confiabilidad y no requerir anestesia como en el caso del electro eyaculación. Otros estudios reportan que la colección de semen con vagina artificial con el apoyo de una hembra receptiva permite obtener mejores características de volumen, motilidad, concentración y porcentaje de espermatozoides vivos (Zirena, 2014; Dávalos y Olazabal, 2002). Así mismo reportan el uso de una estructura similar al cérvix en la vagina artificial mejora la duración de la cópula y baja la incidencia de anomalías en la pieza intermedia y cola del espermatozoide. También, la presencia de hembras durante la colección no presenta ningún efecto en el largo de la cópula o en la calidad del semen (Morton *et al.*, 2006).

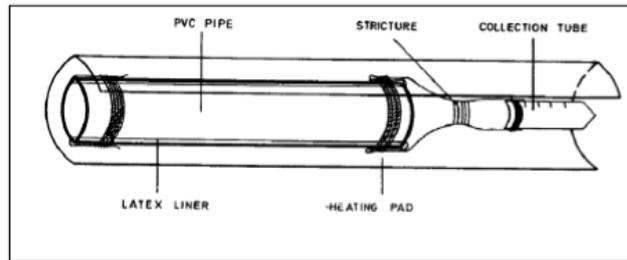


Figura 1. Vagina artificial modificada para la colección de semen de alpacas (Bravo *et al.*, 1997).

Una práctica fácil y no invasiva es la colección por **aspiración vaginal o post cópula**. Esta técnica fue desarrollada por (Zirena, 2014; Neely y Bravo, 1998), en el cual indica que no necesita el entrenamiento de un macho a la vagina artificial, no altera la conducta sexual del macho y no requiere de un maniquí en posición copulatoria, ni de una vagina artificial con todo su accesorio, solo requiere de una hembra receptiva al macho y el proctoscopio.

Las muestras de semen son colectadas con la ayuda del proctoscopio desde el fondo de la vagina después de la copula (Zirena, 2014; Alarcón *et al.*, 2012); ya que el macho eyacula al llevar el pene por la vagina, útero y cuerno lacerando el endometrio uterino provocando sangrado (Zirena, 2014; Vélez, 1997). La presencia de sangre en la muestra de semen por este método podría ser de preocupación para una persona experimentada en evaluación de semen de otras especies de granja, pero se debe entender que es parte de la fisiología normal de la alpaca (Alarcón *et al.*, 2012).

Tabla 2. Métodos de colección de semen ensayados en alpacas.

Método	Ventajas	Desventajas	Referencia
Electro eyacuación	No requiere hembras en celo	El semen se contamina con la orina, se tiene que sedar al macho.	Fernández Baca y Calderón, 1966
Vagina Artificial con Frazadilla Termo-eléctrica y maniquí	No se interrumpe la monta Mantiene la temperatura constante, durante la cópula, La colección de semen es factible y reproducible.	Los machos deben ser entrenados, Requiere fuente de energía eléctrica.	Bravo <i>et al.</i> , 1997
Desviación de conductos Deferentes	No requiere hembra, Corto tiempo de colección. Se colecta solo espermatozoides	Realización de la operación, Taponamiento de la salida del conducto deferente.	Paricahua, 2001
Aspiración post cópula de semen de la vagina	Procedimiento fácil, simple y económico, Se obtiene un eyaculado normal. No requiere ambiente especial.	Requiere constantemente hembras en celo o dispuesto a la cópula.	Neely y Bravo, 1998

Fuente: Varios autores.

2.4. Características bioquímicas del plasma seminal

El plasma seminal de las alpacas está compuesto por las secreciones de las glándulas anexas, las que son vertidas hacia la uretra durante la eyacuación, el cual se mezcla con los espermatozoides (Zirena, 2014; Sumar, 2002). Dichas secreciones contienen diversos componentes bioquímicos que regulan diferentes funciones espermáticas (Zirena, 2014; Barrios *et al.*, 2000), se postula que los glicosaminoglicanos (GAG), puede ser la causa de la viscosidad, debido a que son abundantes en el plasma seminal. Sin embargo, las enzimas GAG no reducen la viscosidad, mientras que las proteasas hacen, lo que indica que las proteínas son responsables de la viscosidad observada en el plasma seminal del camélido. Se ha demostrado que la 5B mucina es la proteína principal responsable de la viscosidad del plasma seminal de alpaca (Kershaw Young y Maxwell, 2011).

Es de suma importancia el plasma seminal ya que el apareamiento natural actúa como portador y protector de los espermatozoides y el mantenimiento de la motilidad y vitalidad espermática (Zirena, 2014; Hafez, 2002). Las cuales tendrían efectos positivos, como el aumento de resistencia de los espermatozoides al shock de frío (Zirena, 2014; Barrios *et al.*, 2000).

Tabla 3. Componentes bioquímicos del plasma seminal de la alpaca.

Características bioquímicas	Fresco	Descongelado
Glucosa (mg/dL)	8,22 ± 0,77	8,53 ± 1,22
Colesterol (mg/dL)	79,79 ± 5,64	81,74 ± 3,79
Triglicéridos (mg/dL)	44,12 ± 7,38	27,31 ± 4,65
HDL colesterol (mg/dL)	4,73 ± 0,30	4,96 ± 0,36
Proteína total (g/dL)	2,36 ± 0,15	2,29 ± 0,23
Albumina (g/dL)	0,97 ± 0,33	0,81 ± 0,06
Calcio (mg/dL)	11,77 ± 1,74	11,44 ± 0,55
ALT (U/L)	17,92 ± 9,09	17,33 ± 16,57
Fosfatasa alcalina (U/L)	288,76 ± 279,59	279,86 ± 200,76
γ-GT (U/L)	89,62 ± 39,09	114,69 ± 38,38

Fuente: Diaz *et al.*, 2014.

2.5. Característica macroscópica del semen

2.5.1. Volumen

El volumen de semen varía, según el estado fisiológico del macho, la edad, el tamaño, el número y tipo de colecciones, los factores higiénicos y alimentarios, se considera que la excitación sexual, tamaño de los testículos y periodos del año influyen en la cantidad de volúmenes; así este disminuye después de colecciones muy frecuentes.

Tabla 4. Volumen de eyaculado en alpacas por método de colección.

Método de colección	Volumen (ml)	Referencia
Post copula	2.63 ± 2.02	Quispe, 2015
Post copula	2.14 ± 1.72	Ríos, 2013
Post copula	2.5 ± 0.93	Huillcahuaman, 2012
Post copula	3.6 ± 1.3	Alarcón <i>et al.</i> , 2012
Post copula	1.77 ± 1.29	Narváez, 2008

Fuente: Varios autores.

2.5.2. Color

Existe variabilidad en el color de semen el que depende de la concentración espermática y del método de colección.

En 1982, Derivaux indica que en la mayoría de las especies animales el semen tiene una coloración blanquecina y su capacidad se halla en función a la concentración espermática. Los espermatozoides de escasa concentración son claros de aspecto acuoso y ligeramente amarillento.

Tabla 5. Color del eyaculado de alpaca por método de colección.

Método de colección	Color	Referencia
post copula	rojo claro 40% rojo oscuro 33%	Quispe, 2015
post copula	rojo claro 80% rojo oscuro 10%	Alarcón <i>et al.</i> , 2012

Fuente: Varios autores.

2.6. Características microscópicas del semen

2.6.1. Motilidad espermática

El movimiento espermático es un atributo de la calidad porque determina la eficacia de la migración a través del tracto genital de la hembra. Esta evaluación es generalmente subjetiva, llevando a una alta variabilidad entre los observadores (30 a 60%). Sin embargo, se han desarrollado nuevos sistemas de valoración seminal a través de procesadores de imágenes asistidos computacionalmente

conocidos como Análisis Espermático Asistido Computacionalmente “CASA” (por sus siglas en inglés) que, a más de evaluar la motilidad espermática, permite evaluar significativamente otros parámetros como morfología y velocidad espermática (Vera, 2009).

En alpacas debido a la alta viscosidad del plasma seminal, no hay “motilidad masal” (no hay remolinos) y la motilidad progresiva individual es muy lenta comparado al ovino y bovino (Hafez, 2002).

Las muestras con motilidad inicial mayor a 60% logran mejores porcentajes de motilidad post - descongelamiento, en comparación con las muestras que inician con motilidades menores a 60% (Choez *et al.*, 2013). Por ello se recomienda usar solamente eyaculados con motilidad igual o mayor a 60% o mínima del 50%, para realizar la criopreservación de semen de alpacas (Bustanza, 2001).

Tabla 6. Motilidad espermática de alpacas por métodos de colección.

Método de colección	Motilidad Espermática %			Referencia
	Fresco	Refrigerado	Descongelado	
Post copula	13,26	12,28	8,28	Ccalta, 2017
Post copula	61.7	48,9		García <i>et al.</i> , 2017
Post copula	42.42		16.9	Quispe, 2015
Post copula	73.5			Alarcón <i>et al.</i> , 2012
Post copula	64.62		30.00	Huillcahuaman, 2012
Post copula	67.78		22.78	Escobar, 2011

Fuente: Varios autores.

2.6.2. Concentración espermática

Es importante la determinación precisa del número de espermatozoides y nos expresa el número de células espermáticas por ml, dado que es una característica muy variable la cantidad de espermatozoides, para determinar específicamente el número de hembras que pueden ser inseminadas.

La concentración de espermatozoides depende de la secreción de testosterona por las células de Leydig, así mismo la concentración aumenta con la edad y tamaño del animal igualmente modificado por factores como la alimentación, edad, salud, tamaño testicular, etc. (Hafez, 2002).

En consecuencia, los camélidos producen menos espermatozoides al día en comparación con los carneros y toros. Por consiguiente, el semen tiene una baja concentración de 30 -150 x10⁶ spz/ml en alpacas y 80-300 x10⁶ spz/ml en camellos a pesar del bajo volumen de plasma seminal (Deen *et al.*, 2003; Wani *et al.*, 2008).

Tabla 7. Concentración espermática por método de colección en alpacas.

Método de Colección	Concentración x 10⁶ spz/ml	Referencia
Post copula	215.32±110.09	Ccalta, 2017
Post copula	76.2±15.2	García <i>et al.</i> , 2017
Post copula	125.25±49.37	Quispe, 2015
Post copula	238±253.69	Ríos, 2013
Post copula	75.2±20.3	Alarcón <i>et al.</i> , 2012
Post copula	46.15±12.10	Huillcahuaman, 2012

Fuente: Varios autores.

2.6.3. Vitalidad Espermática

Actualmente, existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descritos numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática como por ejemplo la eosina-nigrosina (Bamba, 1988) y azul de Tripán (Suttiyotin y Thwaites, 1992), de tal manera que, si el espermatozoide está vivo, la membrana celular actúa como barrera impermeable impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse (Cabrera y Pantoja, 2012).

Tabla 8. Vitalidad espermática en alpacas por método de colección.

Método de colección	Vitalidad Espermática (%)			Referencia
	Fresco	Refrigerado	Descongelado	
Post copula	75.3±7.2			Alarcón <i>et al.</i> , 2012
Post copula	47.89	37.75	17.37	Ccalta, 2017
Post copula	71.6±2.2	58.3		García <i>et al.</i> , 2017

Fuente: Varios autores.

2.6.4. Morfología espermática

El espermatozoide es una célula conformada por una cabeza espermática y una cola o flagelo, y ambos están rodeados por una membrana espermática o plasmolema (Sutovsky y Manandhar, 2006).

De adentro hacia afuera, la cabeza espermática está compuesta por un núcleo en donde el ácido desoxirribonucleico (ADN) ha sido parcialmente reemplazado durante la espermiogénesis por protaminas que ayudan a la hipercondensación del núcleo espermático en una forma compacta e hidrodinámica que permite la motilidad espermática y la penetración espermática a través de las capas del óvulo (Sutovsky y Manandhar, 2006). Los núcleos de los espermatozoides de la mayor parte de las especies contienen sólo protaminas, mientras que en otras especies contienen cantidades variables de histonas más grandes, ricas en arginina (Hafez, 2002). El extremo anterior del núcleo está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo a manera de casquete, que contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas, que participan en el proceso de fecundación (Hafez, 2002).

La cola espermática provee la fuerza motil al espermatozoide. Está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. El cuello o

segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en el extremo posterior del núcleo. La placa basal del cuello es continua en sentido posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola. La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda su longitud de la cola, comprende el axonema. El axonema, como tal, se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. En el segmento medio, esta disposición 9 + 2 de los microtúbulos está rodeada por nueve fibras gruesas o densas que al parecer están relacionadas con los nueve dobletes del axonema. El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial, dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de la cola, es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática (Hafez, 2002).

El segmento principal, que se extiende casi hasta la punta de la cola, está formado por el axonema al centro y sus fibras gruesas asociadas (Hafez, 2002). Además, esta sección está rodeada por una vaina fibrosa que provee soporte al axonema (Sutovsky y Manandhar, 2006). El segmento caudal o terminal contiene solo el axonema central cubierto por la membrana espermática (Hafez, 2002). El axonema es que le da motilidad al espermatozoide. Los pares externos de microtúbulos del patrón 9 + 2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes.

Los espermatozoides maduros de camélidos sudamericanos muestran las mismas características anatómicas con otros mamíferos. La gota citoplasmática,

que suele desprenderse de los espermatozoides tras la eyaculación, está compuesta de citoplasma residual.

La longitud de los espermatozoides de los camélidos es menor que los de toro, búfalo, carnero, asno y garañón (Tibary y Anouassi, 1997). En la alpaca, las dimensiones de la cabeza es 6.1 +- 0.6 µm de largo y 3.6 +- 0.3 µm de ancho (Buendía *et al.*, 2002).

Tabla 9. Espermatozoides normales en alpaca por método de colección.

Método de colección	Normales (%)	Referencia
post copula	70	Escobar, 2011
post copula	63,22	Paucar, 2011
post copula	73	Sánchez, 2010

Fuente: Varios autores.

2.6.5. Test Hipo osmótico (HOST) o Endosmosis

La prueba de endosmosis (HOST) consiste en colocar a los espermatozoides a un medio de presión hipo osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa la entrada de agua hacia el interior de la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo (Pérez *et al.*, 1999). Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física funcionalmente dañada no experimentaran cambios en la forma del flagelo. Se considera endosmosis positiva cuando se aprecia como el flagelo del espermatozoide, en un medio hipo osmótico, toma forma helicoidal y asciende dentro de la misma membrana celular. Esto se debe a un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata

de vencer difundiendo agua al compartimiento intracelular y, como consecuencia, la célula aumenta su volumen (Vásquez *et al.*, 2012).

Se consideraron espermatozoides con membrana funcional (HOST+) los que reaccionaron al estrés hipo osmótico mediante la hinchazón de la parte distal de la cola espermática, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados (HOST-). Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides con membrana funcional (HOST+) (Banda *et al.*, 2010).

Tabla 10. Test hipo osmótico (Host) en alpaca por método de colección.

Método de colección	HOST (%)			Referencia
	Fresco	Refrigerado	Descongelado	
Post copula	46,89	28,65	13,46	Ccalta, 2017
Post copula	52	39,8		García <i>et al.</i> , 2017
Vagina artificial		61,09	46,49	Ciprian, 2018
Vagina artificial	43,13	38,5	22,82	Zirena, 2014

Fuente: Varios autores.

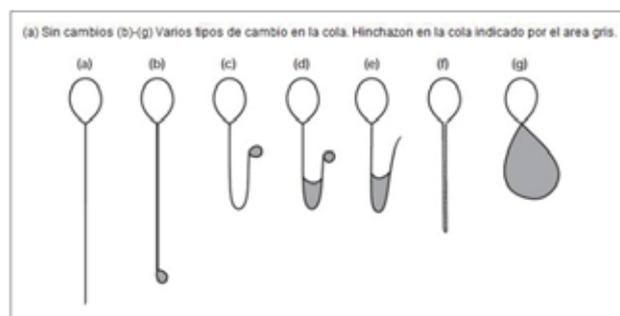


Figura 2. Representación esquemática de típicos cambios morfológicos en espermatozoides sometidos a estrés hipo osmótico.

Fuente: Jeyendran *et al.*, 1984.

2.6.6. Integridad de la membrana Acrosomal

El acrosoma es un delgado saco membranoso de doble capa que cubre el extremo anterior del núcleo del espermatozoide. Contiene acrosina, hialuronidasa, y otras enzimas hidrolíticas (Hafez, 2002). La acrosina,

responsable de la digestión del cumulus oophorus y de la zona pelúcida (Polakoski y McRorie, 1973; Aguas y Pinto, 1985). La evaluación de este componente espermático resulta esencial al considerar que participa del proceso de fecundación del ovocito. Esta valoración toma mayor relevancia en espermatozoides criopreservados cuya mayor permeabilidad al calcio, inducida por las bajas temperaturas, posibilitan reacciones capacitantes anticipadas que menguarían el potencial fecundante del espermatozoide.

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación. En el acrosoma se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la zona acrosomal con su borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas, los mismos que tienden a romperse en el proceso de refrigeración, congelación y descongelamiento (Cabrera y Pantoja, 2012). Muestras seminales con alta proporción de alteraciones acrosomales suelen tener una fertilidad baja (Peña y Linde-Forsberg, 2000).

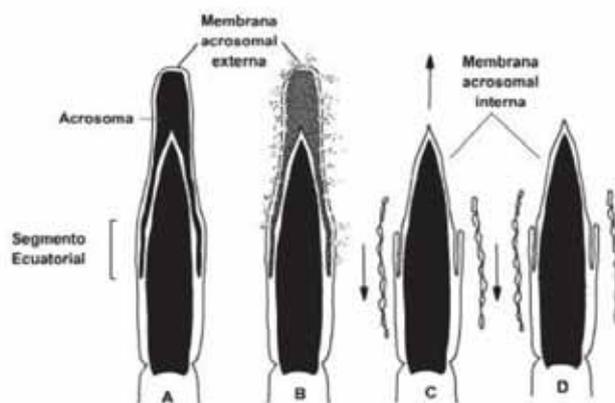


Figura 3. Integridad acrosomal.

A: Espermatozoide con el acrosoma intacto, B – C: vesícula de membranas y liberación de contenido acrosomal y D: la membrana acrosomal interna queda como única envoltura de la región anterior de la cabeza del espermatozoide. Fuente (Guyton y Hall, 2000).

Tabla 11. Integridad del acrosoma espermático de la alpaca según método de colección.

Método de colecta	Integridad Acrosomal (%)			Referencia
	Fresco	Refrigerado	Post-descongelado	
			0 horas 3 horas	
post copula	76.92±2.41	52.65	44.97	Ccalta, 2017
vagina artificial		76,44	67,9	Ciprian, 2018
vagina artificial	78,3		19	Santiani <i>et al.</i> , 2005

Fuente: Varios autores.

2.7. Criopreservación del semen

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones (Ávila *et al.*, 2006).

La criopreservación del semen contribuye a la expansión de técnicas reproductivas, como la inseminación artificial (AI) y la fertilización in vitro (Mederiros *et al.*, 2002). La AI con semen congelado es esencial en trabajos de reproducción y selección contribuyendo a incrementar la producción de las especies domésticas. El semen congelado-descongelado asociado a otras biotecnologías reproductivas es usado para la preservación de especies en peligro de extinción y también para solucionar problemas de infertilidad en machos en humanos (Watson, 2000).

Grandes esfuerzos se están realizando en las técnicas de criopreservación con la meta de mejorar la viabilidad espermática. Sin embargo, la criopreservación induce a la formación de cristales de hielo dentro de la célula, estrés osmótico y por refrigeración que causan daños en la célula del

espermatozoide, ruptura citoplasmática o incluso daños en el citoesqueleto o en estructuras relacionadas al genoma (Isachenko *et al.*, 2003).

2.7.1. Diluyente del semen

Las sustancias usadas como crioprotectores en la refrigeración, tienen como fin proteger al semen de los efectos críticos ocurridos en el proceso y al mismo tiempo permitir la supervivencia de los espermatozoides fuera del tracto reproductivo. 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 electrolitos 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).

a) Tris

El Tris es una amina primaria, la cual es utilizada para la preparación de soluciones tampón las cuales a su vez son de vital uso en los ensayos con sistemas biológicos. (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) Glucosa y fructosa

Son sustancias no penetrantes que actúan osmóticamente, lo cual promueve que se presente una deshidratación celular durante la disminución de la temperatura, que impide la formación de grandes cristales de hielo intracelular. Diversos estudios sostienen que estas sustancias disminuyen el efecto de la elevada concentración intracelular de solutos, y por ende son más seguros en congelaciones rápidas (Muiño, 2008). Los azúcares que se hallan en los diluyentes poseen un efecto positivo sobre la viabilidad de los espermatozoides, esto principalmente por su aporte energético a los cuales son capaces de metabolizar glucosa, fructosa y manosa por vía oxidativa y tiene acción crioprotectora, favoreciendo la manutención del equilibrio osmótico (Cortés, 1997). Además, el efecto benéfico de la suplementación de fructosa al dilutor mejora la viabilidad la tasa de supervivencia en espermatozoides. (Baquero *et al.*, 2004).

d) Antibióticos

Con la finalidad de restringir el desarrollo de microorganismos se utiliza antibióticos como la tylosina, gentamicina y lincomicina (Ávila, 2009).

e) Glicerol

Esta sustancia ocupa simultáneamente la membrana y los compartimientos extra e intracelulares (Zirena, 2014; Mazur, 1984). Su función a nivel extracelular consiste en aumentar el volumen del medio extracelular y la proporción de agua en estado de no-congelación, haciendo disminuir las concentraciones de los electrolitos y, por tanto, minimizando el estrés osmótico

(Mazur, 1984). 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 (Zirena, 2014; Rasul *et al.*, 2007), lo que evita el colapso de las células por una deshidratación excesiva (Medeiros *et al.*, 2002) y previniendo también la fractura de las soluciones de enfriamiento al reducir la expansión del volumen total de hielo durante la solidificación del agua (Rasul *et al.*, 2007).

f) Funciones que cumple la yema de Huevo en la criopreservación

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); así como mejorar la fertilidad espermática (Zirena, 2014; Lamia, 2004). Esta acción protectora se atribuye a las proteínas de baja densidad (LDL – low density proteins) (Moussa *et al.*, 2002). Las LDL están compuestas por 87% de lípidos y 12% de proteínas, y presentan una forma esférica con un centro formado por triglicéridos, los cuales están rodeados por una envoltura de proteínas y fosfolípidos (Zirena, 2014; Hu *et al.*, 2010). Se cree que durante la congelación descongelación, las LDL son desbaratadas y los fosfolípidos son liberados en el medio, y vendrían a formar una cubierta protectora en la superficie de las membranas espermáticas (Zirena, 2014; Hu *et al.*, 2010). Por su parte, Moussa *et al.*, (2002); Lamia, (2004) demostraron que las LDL son responsables del proceso de solidificación en la criopreservación, 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.

Asimismo, se sabe de algunos componentes de la yema de huevo que pueden tener un rol antagónico al efecto protector de las LDL. Demianowicz y Strezek (1996) separaron la yema de huevo en dos lipoproteínas: las LDL y las lipoproteínas de alta-densidad (HDL – high density proteins), y observaron que las LDL proveían una mejor protección al semen de cerdo que la yema entera, mientras que las HDL disminuyeron significativamente la motilidad espermática en comparación con la yema entera; y señalaron posteriormente que eso se debía a la presencia de gránulos en las HDL. Esto sugeriría que la yema de huevo puede contener algunos componentes dañinos que pueden reducir notablemente la motilidad espermática (Moussa *et al.*, 2002).

La yema de huevo de codorniz frente a la yema de huevo de gallina fue comparada en semen de burro poitou en una concentración de 0.0, 2.5, 10 y 20%. El estudio encontró que un 10% de concentración de yema de codorniz mejora el porcentaje de motilidad en comparación con un 10% de concentración de yema de huevo de gallina. (Trimeche *et al.* 1997); Después de la comparación de dos tipos de yema, los investigadores encontraron que estos poseen similar composición excepto en la composición de fosfatidilcolina, para la cual el huevo de codorniz posee significativamente más, adicionalmente el huevo de codorniz tiene menos fosfatidiletanolamina y una baja relación de ácidos grasos polinsaturados con respecto a los ácidos grasos saturados (Silva y Verstegen, 1995).

Un estudio idéntico fue hecho con yema de huevo de pato sobre semen de Búfalo Nili-Ravi. Este estudio encontró una significativa diferencia en los dos conservantes, yema de huevo de gallina y de pato, a una concentración del 20%. El conservante de pato mejoró significativamente la motilidad después del descongelamiento y redujo los traumas y daños en la cola del espermatozoide (Jamil-ur-Rahman, 2011).

Un estudio más completo se hizo reemplazando la yema de huevo de gallina con yema de huevo de codorniz y pata; no solamente se hizo el estudio comparando el post-congelamiento sino también se examinó la composición química de cada yema de huevo en el cual indica que los componentes básicos de las YH eran similares ; pero la composición de ácidos grasos y la clase de fosfolípidos era diferente, la YHP tenía más ácidos grasos monoinsaturados que la YHG y YHC, la YHP tenía más cantidad de fosfatidilinositol que la YHG y YHC, la YHC tenía más fosfatidilserina en comparación a la YHG y YHP; aunque este estudio encontró diferencias entre las diferentes composiciones de los tipos de YH, del cual demostró que la sustitución de YHG con YHC y YHP no ha mejorado la motilidad después de la descongelación; en contraste a los resultados mencionados anteriormente, ha habido varios reportes que muestran diferencias cuando se usa yema de huevo de gallina en comparación a la yema de huevo de otras especies. La posible explicación para los resultados diferentes puede ser la dieta del animal productor de la yema lo cual produce más o menos la concentración de lípidos (Bathgate *et al.*, 2006).

Tabla 12. Composición de la yema de huevo de gallina, codorniz y pata.

Tipo de Yema	Agua (gr)	Proteína (mg)	Grasa Total (mg)	Colesterol (mg)
Gallina	0.54±0.06	0.17±0.02	0.29±0.01	22.9±0.02
Codorniz	0.48±0.00	0.22±0.00	0.31±0.01	9.4±0.01
Pata	0.45±0.00	0.20±0.03	0.35±0.01	10.6±0.01

Fuente: Bathgate *et al.*, 2006.**Tabla 13.** Contenido de fosfolípidos de la yema de gallina, codorniz y pata.

Tipo de Fosfolípido (%)	Tipo de Yema		
	Gallina	Codorniz	Pata
Ácido Fosfatídico	13.0 ± 0.3	14.4 ± 0.1	13.3 ± 0.5
Fosfatidiletanolamina (PE)	15.5 ± 1.6	12.5 ± 0.5	12.8 ± 0.4
Fosfatidilinositol	13.4 ± 0.7	12.2 ± 0.0	22.3 ± 0.2
Fosfatidilserina	22.7 ± 0.3	25.0 ± 0.2	21.2 ± 0.4
Fosfatidilcolina (PC)	15.6 ± 0.1	19.6 ± 0.5	14.7 ± 0.1
Lysophosphotidylcholine	19.9 ± 0.9	15.6 ± 0.5	15.6 ± 0.5

Fuente: Bathgate *et al.*, 2006.**Tabla 14.** Composición de ácidos grasos de la yema de huevo de gallina, codorniz y pata.

Ácido graso	% de Lípidos Totales de la Yema			
	Gallina	Codorniz	Pata	
Los ácidos grasos saturados (SFA)	(14:0)	0	0	0.7 ± 0.0
	(16:0)	22.6 ± 0.0	24.8 ± 0.3	24.2 ± 0.0
	(18:0)	9.4 ± 0.0	11.1 ± 0.1	6.9 ± 0.0
	(24:0)	0	0	0.8 ± 0.1
	SFA total	32.0 ± 0.0	35.9 ± 0.4	32.7 ± 0.1
Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA)	(16:1)	2.4 ± 0.0	2.9 ± 0.0	2.0 ± 0.0
	18:1 (n-9)	50.7 ± 0.0	46.8 ± 0.6	46.2 ± 0.0
	(22:1)	0	0.7 ± 0.7	0
	MUFA total	53.1 ± 0.0	50.4 ± 1.3	48.9 ± 0.0
Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)	(18:2)	12.5 ± 0.0	11.6 ± 0.1	12.0 ± 0.0
	(18:3)	0	0	0.9 ± 0.0
	(20:2)	0	0	0.7 ± 0.0
	(20:4)	2.4 ± 0.0	2.1 ± 0.1	3.9 ± 0.0
	(22:6)	0	0	1.6 ± 0.1
PUFA total	14.9 ± 0.0	13.7 ± 0.2	19.1 ± 0.1	

Fuente: Bathgate *et al.*, 2006.

2.7.2. Fase de enfriamiento

La fase de enfriamiento se lleva a cabo en dos partes: en la primera, el semen diluido es enfriado hasta temperaturas de 5°C (Zirena, 2014; Salomón y Maxwell, 2000) en un tiempo aproximado de 0.5 a 3 horas (Zirena, 2014; Aisen *et al.*, 2000), con el propósito de reducir la motilidad espermática (Zirena, 2014; Sandoval *et al.*, 2007); entretanto, en la segunda parte, se mantiene el semen a 5°C por un periodo de 0.5 a 1.5 horas antes de iniciar la congelación, para lograr la estabilización celular (Zirena, 2014; Aisen *et al.*, 2000).

Una vez terminada la fase de enfriamiento, se da un periodo de transición, en el que se adicionan sustancias crioprotectoras al semen diluido (Salomón y Maxwell, 2000), lo que permitiría una mayor estabilización de los espermatozoides en la solución (Ruíz, 2005). Cuando el crioprotector es agregado de forma abrupta se puede observar daño en la membrana plasmática, región acrosomal y configuración de la cola (Zirena, 2014; Ávila *et al.*, 2006), por tal motivo, para disminuir aún más los efectos tóxicos del agente crioprotector, el diluyente es dividido en dos fracciones, en donde la segunda fracción contiene el doble de concentración deseada del crioprotector, para que al ser mezclado con igual volumen del semen diluido en la primera fracción, se obtenga la concentración deseada de dicho agente crioprotector (Zirena, 2014; Sandoval *et al.*, 2007).

2.7.3. Fase de congelación

La siguiente fase es la de congelamiento, la que empieza cuando la temperatura llega a 5°C (Salomón y Maxwell, 2000). En esta fase los espermatozoides son expuestos a un estrés de tipo osmótico y térmico (Watson, 2000). Al llegar la temperatura a -10°C se inicia la formación de hielo del agua

extracelular que ocasiona un incremento progresivo de concentración de solutos; es así que la fracción líquida se vuelve hipertónica, y debido a la diferencia de presiones, el agua intracelular sale de la célula (Medeiros *et al.*, 2002) como medida para mantener el equilibrio osmótico dentro de la solución (Boiso, 2001). Dicho periodo de cristalización se conoce como “rango crítico de temperatura” (Salomón y Maxwell, 1995), y es donde ocurren los principales daños en el espermatozoide (Kumar *et al.*, 2003).

Como método rutinario en muchos laboratorios se utiliza el método simple y rápido de suspender pajuelas o las ampollas en vapores de nitrógeno líquido por un periodo adicional antes de sumergirlas dentro del nitrógeno líquido (Ávila *et al.*, 2006). Se sostiene que manteniendo las pajuelas 8 cm encima de nitrógeno líquido permite reducir la temperatura dentro de las pajuelas a -150°C en 15 minutos (Sandoval *et al.*, 2007). Este método no requiere equipos especializados y, si bien tiene ciertos problemas, que incluyen tasas de enfriamiento no uniformes entre alícuotas del mismo eyaculado y dificultades en mantener reproducibles las condiciones de congelación; puede dar lugar a buenas tasas de supervivencia (Ávila *et al.*, 2006).

a. Daños producidos durante la criopreservación

El semen de mamífero es sensible al enfriamiento rápido (choque de frío), manifestándose por el número de espermatozoides muertos, alteración de la distribución de lípidos de membrana y aumento del calcio intracelular, con posible fusión de membranas, específicamente existe una restricción de los movimientos laterales de los fosfolípidos (membrana plasmática) ocurre cuando la temperatura es menor a 5°C sucede en la transición de la fase líquida a gel (Apaza, 2017). Las proteínas integrales son agrupadas irreversiblemente por la separación de los

lípidos por lo tanto los lípidos de la membrana son reestructurados y algunas moléculas de colesterol son liberados; como resultado de esta ruptura de interacciones entre los lípidos y las proteínas tales como los canales iónicos que cambian y/o pierden su función, desestabilizando y ocasionando una pérdida selectiva de la permeabilidad de este modo incrementa el influjo de iones como el Ca^{2+} y Bicarbonato del espacio extracelular dándose un fenómeno parecido a la crio-capacitación también se observa la fusión entre la membrana plasmática y la capa externa de la membrana acrosomal (Apaza, 2017). Así mismo, los elementos del citoesqueleto son sensibles a la temperatura.

Se ha postulado que la despolimerización de los filamentos de actina del citoesqueleto es un prerequisite para la aproximación de la membrana plasmática a la membrana acrosomal externa en el camino hacia la exocitosis acrosomal (Yeste, 2016).

Durante la congelación la membrana del espermatozoide sufre una amplia variedad de daños. La causa principal de estos cambios es debida a alteraciones térmicas, mecánicas y químicas, asociados a la acción previa de los criopreservantes; cambios volumétricos, en parte dependientes del balance $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ ligado al aporte de ATP intracelular, indicando que podría estar implícito un fracaso metabólico, y en parte dependiente de variaciones osmóticas puntuales (Fernández *et al.*, 2000).

2.7.4. Fase de descongelamiento

la fase de descongelamiento se realiza usualmente al sumergir las pajuelas de semen en agua en baño maría entre 37°C a 50°C por un periodo de tiempo que varía entre algunos segundos hasta 5 minutos (Aisen *et al.*, 2000). Se opta por la descongelación rápida ya que los espermatozoides tienen que volver a

pasar por el “rango crítico de temperatura” para evitar así la recristalización de cualquier cristal de hielo intracelular presente en el espermatozoide (Salomón y Maxwell, 2000).

2.7.5. Incubación del semen descongelado

En el caso de criopreservación, este ensayo es de vital importancia ya que permite evaluar a través del tiempo su calidad en cuanto a la motilidad total, vitalidad espermática, test hipo osmótico (Host), integridad de la membrana acrosomal, para estimar la capacidad del espermatozoide de sobrevivir en el tracto reproductivo de la hembra y mantener su capacidad fertilizante (Bag *et al.*, 2004), permitiendo de esta forma realizar procesos de inseminación artificial con espermatozoides viables y de movilidad aceptable.

Este proceso en mamíferos es pobremente entendido y ha sido asociado con modificaciones en la fluidez y composición de la membrana plasmática, alteraciones en la composición iónica intra celular y cambios en el metabolismo de oxidación (Marin – Briggiler *et al.*, 2002), lo cual puede estar posiblemente relacionado con proceso de incubación de la célula espermática.

Ha sido demostrado que la temperatura de incubación afecta la difusión de los lípidos de membrana y su peroxidación (Harrison *et al.*, 1996; Ladha, 1997). La alteración de los lípidos y su fluidez de membrana pueden generar cambios en la permeabilidad iónica (especialmente de calcio y bicarbonato) y en la actividad de enzimas de unión a membrana (Marin – Briggiler *et al.*, 2002). Dado que la movilidad espermática es el resultado que la temperatura afecte este equilibrio.

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. **Ámbito de estudio**

El presente estudio se realizó en la época de empadre durante los meses de enero a abril del 2018, se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos “CICAS – La Raya” 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, con las siguientes coordenadas:

- Ubicación UTM 19 L0279482m E 8398851m S
- Latitud Sur. 14° 28.448’
- Longitud Oeste. 071° 02.753’
- Altitud. 4 133 m.s.n.m.

Fuente: GPS Garmin© Oregon 300



Figura 4. Centro de investigacion de camelidos sudamericanos (CICAS) “La Raya”.

3.2. **Disponibilidad alimenticia**

En La Raya existen 8 comunidades vegetales predominantes, que están constituidas por especies de *Stipas*, *Festucas*, *Muhlebergias*, *Calamagrostis*,

Distichias, también existen bofedales donde la vegetación dominante son las distichias, plantagos, juncus y scirpus.

3.3. Materiales y equipos.

3.3.1. De los animales

Se utilizó 8 Alpacas Huacaya Machos, sexualmente maduros de 54 a 66 kg de peso vivo y entre 5 a 8 años de edad con una condición corporal de 3 a 3.5. a los animales se les realizo el examen clínico de los órganos genitales externos: Testículos, pene y prepucio.

3.3.2. Materiales para la colección del semen

- Proctoscopio
- Tubos Falcon graduados de 15 ml.
- Papel toalla
- Libreta de campo
- Soga
- Estuche
- Plumón y lapicero
- Cinta masking
- Registro de colección

3.3.3. Materiales de laboratorio

- Porta objetos
- Cubre objetos
- Tips de 10 y de 100 µl.
- Aceite de inmersión
- Jeringas de 3 y 5 ml.
- Lapicero indeleble.
- Pajuelas de 0.5 ml
- Globets y Porta globets
- Pinza plastificada
- Caja de Tecnopor
- Gradillas
- Cronometro digital tipo reloj
- Corta pajuelas.
- Caja de Tecnopor
- Canastilla de Tecnopor

3.3.4. Reactivos e insumos

- Eosina
- Nigrosina
- Tris
- Fructosa
- Citrato de sodio
- Glicerol
- Yema de huevo de gallina
- Yema de huevo de codorniz
- Yema de huevo de pata
- Alcohol polivinílico.
- Agua bidestilada.
- Nitrógeno líquido
- Gentamicina
- Tylosina
- Lincomicina

3.3.5. Equipos de laboratorio

- Microscopio de contraste de fases, platina térmica (UOP–UB200i) y videocámara (Proiser ISAS 782C).
- Computadora (con programa ISAS® v. 1.2).
- Micropipeta de 10 µl y 100 µl (BOECO Germany SP Series).
- Baño maría (Ovan®).
- Baño seco (HT-50, Minitube)
- Thermocouple (OaktonTemp 10K).
- Vortex Mixer (Labnet International, Inc).
- Balanza digital de precisión (Highland-Adam Equipment, 120g x 0.001g).
- Micro osmómetro
- Termo descongelador.
- Platina térmica (Premiere®).
- Refrigeradora (BOSH).
- Tanque de Nitrógeno 25 kg.

3.3.6. De laboratorio

La pre selección de eyaculados y la evaluación de las características microscópicas como Motilidad total, Vitalidad espermática, Test hipo osmótico (Host), Integridad acrosomal e incubación del semen después de la

descongelación, se evaluaron en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva CICAS “La Raya”, de la Facultad de Ciencias Agraria.



Figura 5. Laboratorio de Reproducción.

3.4. Aves para obtención de yemas de huevo

Para el presente trabajo se utilizaron yemas de huevo de 3 especies de aves: gallina criolla (*Gallus domesticus*), codorniz (*Coturnix coturnix*) y pata (*Anas platyrhynchos*). Las yemas utilizadas fueron obtenidas de huevos, colectados en su mayoría el mismo día de la preparación del dilutor. Para la separación de la clara, se rompió el huevo situando la yema de huevo sobre el papel absorbente, haciendo rodar la yema suavemente sobre el papel hasta quedar libre de clara, luego se atravesó la membrana de la yema con una jeringa y se extrajo la yema propiamente dicha.



Figura 6. Yema de huevo de Gallina, Codorniz y Pata.

3.5. Preparación del dilutor para la criopreservación

Para el presente estudio se utilizaron 3 dilutores (tratamientos):

T1: Tris, yema de huevo de gallina, glicerol 5%.

T2: Tris, yema de huevo de codorniz, glicerol 5%.

T3; Tris, yema de huevo de pata, glicerol 5%.

Para lo cual se procedió a la preparación de los mismos utilizando la composición mostrada en el **Tabla 15**.

Para cada tratamiento se preparó la fracción A que se usó como dilutor inicial y la fracción B que contiene el crioprotector permeable (Glicerol), el cual se agregó en el momento del equilibrado.



Figura 7. Preparación del dilutor fracción A y B para cada tratamiento.

Tabla 15. Componentes del dilutor A y B para cada tratamiento.

Componente	T1		T2		T3	
	A	B	A	B	A	B
Tris (gr)	0.303	0.303	0.303	0.303	0.303	0.303
Ácido cítrico (gr)	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Fructosa (gr)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
YH Gallina (ml)	2	2	0	0	0	0
YH Codorniz (ml)	0	0	2	2	0	0
YH Pata (ml)	0	0	0	0	2	2
Glicerol (ml)	0	1	0	1	0	1
Tilosina (mg)	10	10	10	10	10	10
Gentamicina (mg)	50	50	50	50	50	50
Lincomicina (mg)	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Agua Bidestilada (ml)	10		10		10	

3.6. Colección del semen

La colección de semen fue por el método de post copula el cual se realizó durante el empadre controlado para facilitar el manejo; la colección se realizó una vez por semana, siguiendo la siguiente técnica:

Su procedimiento de la colecta empieza luego de la monta, se sujeta y se limpia la zona perineal con papel toalla. Se inserta un espéculo vaginal y la oz externa del cérvix fue localizado. El semen que se encuentra en la vecindad de la oz externa es colectado con el espéculo y depositado en un tubo graduado y almacenado dentro de un estuche precalentado a temperatura corporal. (García y Alarcón, 2019).



Figura 8. Colección metodo post copula y almacenado del semen de alpaca a temperatura corporal.

3.7. Evaluación de semen

3.7.1. Pre selección de eyaculados frescos

A las muestras de semen colectadas se les midió la temperatura a la cual se colecto y se almacenos a esa misma temperatura. se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas:

a. Volumen

El volumen seminal se midió en tubos falcón estériles y graduado en mililitros (ml), para facilitar la lectura del volumen del semen colectado, en el cual se dio la lectura a través del examen visual.

b. Color

El color seminal se determinó paralelamente al volumen a través de la observación directa, para lo cual los tubos falcón eran transparentes. El color fue clasificado como rojo oscuro, rojo claro, blanco cristalino y blanco lechoso (Alarcón *et al.*, 2012).

c. Evaluación de la Motilidad subjetiva

Se evaluó a cada eyaculado inmediatamente después de la colección, se determinó con la ayuda de un microscopio de contraste de fase a un aumento de 10x. Se colocó 20µl de semen en una lámina portaobjetos temperada a 37°C y luego cubierta con lámina cubreobjetos a la misma temperatura para ello se utilizó una platina temperada, la motilidad se calificó como porcentaje de espermatozoides con movimiento oscilatorio en un campo microscópico según Quispe (1987).

Tabla 16. Calificación subjetiva de la motilidad espermática de la alpaca.

Motilidad	%
Buena	> 60
Regular	40 - 60
Baja	< 40

Una vez concluido la evaluación se tomó como criterio de selección de las muestras para el estudio de la criopreservación lo siguiente, eyaculados que tienen un volumen (≥ 1 ml), que tengan el color de rojo claro o blanco lechoso y que tengan una buena motilidad subjetiva ($\geq 60\%$), los eyaculados con estas

características fueron mezclados para obtener un *pool* de semen (García, 2014; Salinas *et al.*, 2013; Sandoval *et al.*, 2007) y los demás eyaculados con valores diferentes fueron descartados.



Figura 9. Pre selección de eyaculados y obtención del *pool* (Mezcla).

3.7.2. Evaluación microscópica del semen mezclado (*pool*)

Las evaluaciones del semen (*pool*) se realizaron en las etapas de Fresco, Refrigerado, Descongelado, Incubado 1.5 y 3 horas. Las características evaluadas fueron la Motilidad total, Vitalidad espermática, Integridad de la membrana espermática, Integridad del acrosoma.

a. Motilidad Total

Para la evaluación de Motilidad total se calentó una lámina portaobjetos a 37°C (sobre la platina caliente equipada en el microscopio) y con una micropipeta se colocó 10µl de la muestra de semen, y fue extendida con un cubreobjetos, se observó con el lente de 10x. Se realizó la captura de pequeños fotogramas de 25 fotos por segundo en 8 campos diferentes como mínimo evitando sobre todo las aglomeraciones y aglutinaciones, y fueron almacenados. Posteriormente se realizó la corrección de los campos ya que el ISAS reconoce algunas partículas extrañas en movimiento como consecuencia del flujo o no reconoce algunos espermatozoides en movimiento (eliminar o agregar marcas según sea el caso) con la finalidad de obtener un dato más fidedigno.

El porcentaje de motilidad total se ha calculado por la sumatoria del porcentaje de motilidad progresiva y motilidad no progresiva.



Figura 10. Evaluación en el sistema CASA.

b. Concentración espermática

La concentración espermática fue evaluada paralelamente con la evaluación de la motilidad espermática en el módulo de motilidad del ISAS el cual también realiza un análisis de la concentración espermática y lo expresa en millones de espermatozoides por mililitro de semen ($\times 10^6/\text{ml}$).

Se realizó colocando una cantidad de 10 μl de muestra con una micropipeta en una lámina portaobjetos, cubierto con un cubreobjetos y observando en el microscopio con el lente de 10x, se realizó la captura de 8 campos como mínimo en lugares representativos, evitando campos muy aglomerados y dispersos. Posteriormente se realizó la corrección de campos ya que el ISAS reconoce algunas partículas extrañas como espermatozoides o simplemente no los reconoce del todo (eliminar o agregar marcas según sea el caso), esto con la finalidad de obtener un dato más fidedigno.

c. Vitalidad espermática

Para determinar el número de células espermáticas vivas y muertas, se realizó un frotis con colorante Hancock cuya composición es Eosina y Nigrosina.

Se colocó sobre una lámina porta objetos precalentado (37°C) 10µl de semen y 10µl de Hancock, una vez homogenizado se realizó el frotis colocando otra lamina porta objetos en ángulo de 45°, se obtuvo una película fina y se dejó secar a temperatura ambiente, se examinó con microscopio a un aumento de 40x, evaluando 200 células espermáticas por lamina. Los espermatozoides coloreados se consideran muertos y los sin teñir vivos como lo indica (Tribulo, 2009).

d. Test hipo osmótico (Host)

Para la evaluación de la integridad de la membrana espermática se utilizó una solución hipo-osmótica de 50 mOsm/Kg cuya composición es la siguiente Citrato de sodio 0.00245 gr y Fructosa 0.045 gr para 10ml de agua destilada (Ccalta, 2017).

Se tomó la solución hipo osmótica en un tubo de ensayo y se adicionó la muestra de semen (teniendo una dilución de 1 de semen y 10 de solución hipo osmótica) y se incubo por 1 hora 30 minutos a 37°C. Luego homogenizar las soluciones en un bortex por 10 segundos, se colocó sobre un portaobjetos se colocó 10µl de semen y 10µl de la tinción de Hancock. Se realizó el frotis colocando otra lamina porta objetos en ángulo de 45°, se obtuvo una película fina y se dejó secar a temperatura ambiente (García *et al.*, 2017).

La lectura se realizó en un microscopio, contándose 100 espermatozoides en una magnificación de 40x, los espermatozoides con cola enrollada e hinchada se consideraron con reacción positiva.

$$TH = e/Tx100$$

Donde:

TH = Porcentaje de test hipo-osmótico

e = Número total de espermatozoides con cola enrollada

T = Número total de espermatozoides contados

e. Evaluación de la Morfología espermática

Se realizó de la misma manera que para vitalidad, realizando un frotis con el colorante de Hancock, examinando con el microscopio a 100x y evaluando 200 células espermáticas por lámina.

f. Integridad del acrosoma

Para la valoración de la estructura del acrosoma se utilizó la tinción de Hancock (eosina – nigrosina) tal como lo recomienda Bamba (1988), tomando una alícuota de 10µl de semen y sobre una platina temperada 37°C, se mezcló con la misma cantidad de colorante para realizar un frotis donde se evaluó en un microscopio, contándose 200 espermatozoides en una magnificación de 100x observando el porcentaje de espermatozoides con acrosomas íntegros.

La lectura se realizo

$$IA= i/T \times 100$$

Donde:

IA = Porcentaje de espermatozoides con acrosoma integro

i = Número de espermatozoides con acrosoma integro

T = Número total de espermatozoides contados

3.8. Criopreservación de semen

3.8.1. Refrigeración y congelación de semen

Una vez evaluado el *pool* se separo en tres alícuotas una para cada tratamiento se agregó la fracción A, a la temperatura de 26°C en una proporción de 1:1, una vez realizada la dilución en un tubo falcón se colocó en un recipiente que contenía agua a 26°C cubriendo la muestra en su totalidad.

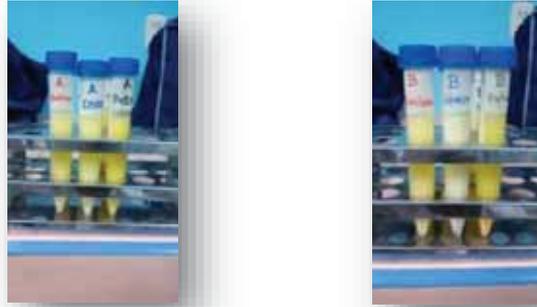


Figura 11. Dilutor fracción A y B para cada tratamiento.

Se colocó en el refrigerador temperado a 5°C en un tiempo de 2 horas. Al terminar el proceso de enfriamiento (5°C) se colocó la fracción B en una proporción 1:1 y se dejó en fase de equilibrio a temperatura de 5°C por un periodo de tiempo de 20 minutos (Apaza, 2017).

Para el proceso de congelación, se llenó las pajuelas plásticas de 0.5 ml obteniéndose 8 pajuelas por tratamiento el sellado de la pajuela se realizó con alcohol polivinílico tal como lo indica (Apaza, 2017).

Luego las pajuelas fueron colocadas horizontalmente en una canastilla y posicionada por encima del nitrógeno líquido (NL) contenido en una caja de Tecopor a una distancia de 3 cm, donde recibieron el vapor del NL por un tiempo de 20 minutos (Apaza, 2017; Zirena, 2014).

Una vez cumplido el tiempo las pajuelas fueron sumergidas rápidamente en el NL lo cual permitió que el vapor del nitrógeno envolviera por completo las pajuelas obteniéndose una congelación uniforme (Evans y Maxwell, 1990). Posteriormente las pajuelas fueron almacenadas en el tanque de nitrógeno líquido (-196°C), donde permanecieron por un tiempo de 7 días (Zirena, 2014).

3.8.2. Descongelación

Después de 7 días, las pajuelas fueron descongeladas para ser evaluadas. Primero se retiró la pajuela del tanque de nitrógeno líquido; luego se

sumergió en baño maría a 37°C durante 60 segundos. Las pajuelas fueron secadas cuidadosamente y el contenido fue vertido en viales (0.5ml), lo que se mantuvieron a 37°C.

3.8.3. Incubación del semen

Después de la descongelación del semen se vio la longevidad del espermatozoide a través del tiempo transcurrido a una temperatura de 37°C por 1.5 y 3 horas y se evaluaron las variables de Motilidad Total, Vitalidad, Integridad de la membrana plasmática, Integridad Acrosomal.



Empadre controlado en CICAS La Raya.



Colección de semen de alpaca inmediatamente después de terminado la copula.

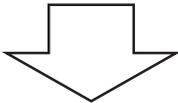
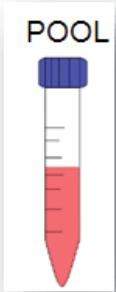


Evaluación del semen fresco (Color, Volumen, Motilidad) y pre selección de eyaculados (volumen \geq 1ml, color rojo claro o blanco lechoso y motilidad \geq 60%).

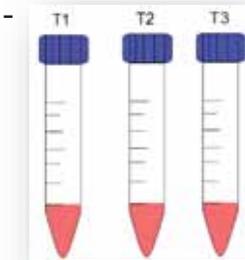


Mezcla de eyaculados pre seleccionados en un tubo falcón (*pool*)
Evaluación en fresco:

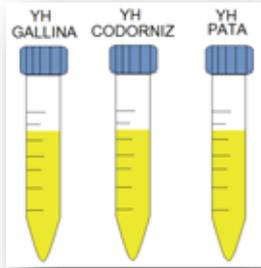
- Motilidad total
- Concentración espermática
- Vitalidad espermática
- HOST
- Integridad Acrosomal
- Morfología espermática



Se separó en 3 alícuotas el *pool* (Mezcla) para cada tratamiento.



Flujograma 1. Colección, pre selección del semen de alpaca.



Se agregó el dilutor A en una proporción de 1:1 a 26°C.

Refrigeración de 26°C a 5°C por 2 horas.

Se agregó el dilutor B en una proporción de 1:1 a 5°C y equilibrio por 20 minutos.



Evaluación de la calidad espermática al Refrigerado.



Rotulado de pajillas y empajillado.

Congelación Horizontal con NL una caja de Tecnopor durante 20 minutos.



Flujograma 2. Dilucion de la fraccion A y B para la congelacion de semen de alpaca.



Se descongelo las pajillas a 37°C por 60 segundos.



Evaluación de la calidad espermática al Descongelado.

Las muestras de semen descongelado se incubaron por un tiempo de 1.5 y 3 horas.



Evaluación de la calidad espermática al Incubado por 1.5 y 3 horas.

Flujograma 3. Descongelacion e incubacion por 1.5 y 3 horas del semen de alpaca.

3.9. ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó la estadística descriptiva de las variables de volumen, color y motilidad subjetiva del semen fresco y concentración espermática, morfología espermática del semen seleccionado *pool*.

La normalidad de las variables microscópicas del semen seleccionado *pool* en fresco, refrigerado, descongelado, incubado 1.5 y 3 horas (Motilidad total, Vitalidad espermática, Test hipo osmótico, Integridad del acrosoma) se analizó utilizando el procedimiento GLM, (ANOVA) de SPSS 23 (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU). se comprobó con el test de Kolmogorv-Smirnov y Levene. Las variables que no cumplieron con los supuestos de igualdad de varianza y distribución normal fueron sometidos a una transformación de arcoseno antes del análisis estadístico.

$$y = (\text{arsen } \sqrt{(p)})$$

Luego fueron analizadas en un Diseño Completamente al Azar Jerárquico o anidado y la comparación de medias se utilizó el test de Duncan. El modelo aditivo lineal aplicado a la investigación es el siguiente:

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

Donde:

i = Tratamientos (3)

j = Etapas de la criopreservación (5)

k = Repetición (6)

Y_{ijk} = Es la observación de la k -ésima repetición de semen dentro del j -ésimo *Pool* en el i -ésimo tratamiento.

μ = Media poblacional

T_i = efecto del i -ésimo Tratamiento.

A_j = efecto de i -ésima Etapa

$C(A)_{i(j)}$ = efecto de la k -ésima Tratamiento dentro del j -ésimo Etapa.

ε_{ijk} = Error experimental

CAPITULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Evaluación macroscópica y microscópica del semen fresco

4.1.1. Volumen

El promedio del volumen semen fresco de alpacas colectadas por el método de post copula, se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 17. Volumen de semen fresco por alpaca.

Macho	N	Media (ml)	±DS (%)	C.V (%)	Max. (ml)	Min. (ml)
1	5	4.74	4.71	99.32	11.00	0.70
2	6	4.08	2.29	56.07	7.00	2.00
3	5	5.50	3.76	68.33	9.50	1.50
4	5	2.74	3.26	118.90	8.50	0.70
5	6	3.33	2.98	89.33	8.50	0.50
6	6	4.08	2.89	70.73	7.50	0.50
7	6	2.17	1.17	53.96	3.50	0.50
8	5	2.40	2.37	98.78	6.50	0.70
Total	44	3.63	2.93	81.93	11.00	0.50

N=animales*colecta

La media del volumen semen fresco de alpacas colectadas por el método de post copula son similares a los reportados por Alarcón *et al.*, (2012); quien obtuvo 3.6 ± 1.3 ml utilizando el mismo método. Otros autores como (Huillcahuaman, 2012 y García *et al.*, 2017) encontró un promedio de 2.5 ± 0.93 ml y 2.9 ± 0.6 ml. con el mismo método de colección de semen. Las diferencias estarían sometidos al efecto animal, condiciones medio ambientales, frecuencia de colecta y manejo de los animales.

4.1.2. Color

El color fue evaluado de acuerdo al criterio del observante, determinando los colores descritos en porcentajes.

Tabla 18. Porcentaje del color de eyaculado de alpaca por el método post copula.

Método de colecta	Color	%	total (%)
PC	Rojo claro	65.91	100
	Rojo oscuro	15.91	
	Blanco lechoso	13.64	
	Blanco cristalino	4.55	

*PC=post copula

Referente a los resultados el color predominante fue rojo claro, similar a lo descrito por (Quispe, 2015 y Alarcón *et al.*, 2012), El color rojizo presente en el semen de alpaca es debido a las laceraciones en el endometrio uterino causado por el macho durante la copula así lo indica (Alarcón *et al.*, 2012).

4.1.3. Motilidad subjetiva

Tabla 19. Motilidad subjetiva de cada alpaca colectado por el método post copula.

Macho	N	Media (%)	±DS (%)	C.V (%)	Max. (%)	Min. (%)
1	5	54.00	11.40	21.11	70.00	40.00
2	6	52.83	15.37	29.09	70.00	30.00
3	5	61.40	12.93	21.07	75.00	40.00
4	5	59.00	8.22	13.93	70.00	50.00
5	6	63.50	14.00	22.04	80.00	40.00
6	6	54.17	13.93	25.72	80.00	40.00
7	6	58.17	7.88	13.56	72.00	50.00
8	5	42.40	19.20	45.29	60.00	10.00
Total	44	55.68	12.87	23.98	80.00	10.00

N=animales*colecta

La media de la motilidad subjetiva de semen fresco en alpacas colectadas por el método post copula, son inferiores a lo reportado por (Alarcón *et al.*, 2012 de $73.5 \pm 7,9\%$ y García *et al.*, 2017 de $61.7 \pm 2.3\%$), en todos los casos anteriores lo realizaron por conteo subjetivo. Las diferencias estarían dadas por la gran

variabilidad en muestras colectadas de semen fresco entre machos (Zirena, 2014), así mismo, al factor de manejo de los animales y condiciones medio ambientales.

4.1.4. Evaluaciones microscópicas del semen seleccionado (*pool*) en la etapa de fresco

Tabla 20. Promedio de las variables microscópicas del pool en fresco.

VARIABLE	N	Promedio	±D. S	C.V (%)	Min	Max
Motilidad total (%)	6	69.10	10.51	15.21	60.32	89.59
Concentración (Spz 10 ⁶ /ml)	6	138.02	37.05	26.84	94.10	182.10
Vitalidad espermática	6	82.82	6.05	7.31	71.67	89.13
Host (%)	6	77.93	5.82	7.47	70.94	86.06
Integridad Acrosomal (%)	6	85.79	5.44	6.34	76.67	91.20
Morfología (Normales %)	6	73.58	8.49	11.54	64.17	84.62

*N=repeticiones

El porcentaje de motilidad total del semen pre seleccionado *pool* en fresco fue (69.10%) es inferior a lo reportado por (Alarcón *et al.*, 2012 de 73.5%) y son superiores a lo reportado por (García *et al.*, 2017 de 61.7%; Quispe, 2015 de 42.42%; Escobar, 2011 de 67.78%) quienes utilizaron el mismo método de colección, y con el método de evaluación de la motilidad subjetiva. La variabilidad obtenida en el presente estudio podría ser debido a que en el experimento se evaluó la motilidad mediante el sistema CASA. Así mismos, superiores a los resultados obtenidos por Torres (2018) 56.07% colectado del conducto deferente; Choez *et al.*, (2017) de 67.85 ± 7.5% en espermatozoides epididimarios y Zirena (2014) de 43.33 ± 24.30% utilizando el método vagina artificial; estas diferencias que se observan se deberían por el método de colección de semen y la pre selección de los eyaculados para el *pool*.

El promedio de la concentración espermática del semen pre seleccionado *pool* en fresco fue de (138,02 x 10⁶ spz/ml) que es superior a lo reportado por (García *et al.*, 2017 de 76.2 x10⁶ spz/ml; Quispe, 2015 de 125.25 x10⁶ spz/ml;

Alarcón *et al.*, 2012 de 75.2×10^6 spz/ml ; Huillcahuaman, 2012 de 46.15×10^6 spz/ml) y menores a lo reportado por (Ccalta, 2017 de 215.32×10^6 spz/ml; Ríos, 2013 de $238,43 \times 10^6$ spz/ml); estas diferencias encontradas se deberían al intervalo de colección, la edad de los animales, época de colección y al método de evaluación. Al evaluar la calidad espermática del semen pre seleccionado *pool* en fresco, la vitalidad espermática de (82.82%) es superior a los reportados (Torres, 2018 de 57.27%; Ugarelli *et al.*, 2017 de $60.43 \pm 13.38\%$; Choez *et al.*, 2017 de $75.8 \pm 8.9\%$; García *et al.*, 2017 de $71.6 \pm 2.2\%$; Huanca, 2015 de $70.16 \pm 14.33\%$; Alarcón *et al.*, 2012 de $75.3 \pm 7.22\%$; Santiani *et al.*, 2005 de 80%) en alpacas; de igual manera, el test hipo osmótico obtenidos en el presente estudio (77.93%) es superior al reportado por (Torres, 2018 de 58.28%; García *et al.*, 2017 de $52.0 \pm 2.4\%$; Huanca, 2015 de $57.68 \pm 8.91\%$; Pacheco *et al.*, 2014 de $53.37 \pm 8.22\%$; Zirena, 2014 de $43.13 \pm 17.59\%$), e inferiores a lo reportado por (Choez *et al.*, 2017) $81.8 \pm 9.4\%$ en espermatozoides recuperados del epidídimo; así mismo, la integridad de la membrana acrosomal de los espermatozoides (85.79%) es inferior a reportado por (Ugarelli *et al.*, 2017 de $93.30 \pm 8.19\%$; Cheuqueman *et al.*, 2013 de 88%; Morton *et al.*, 2010 de 92 %; Morton *et al.*, 2007 de $90.6 \pm 1.5\%$) y superior a los reportados por (Torres, 2018 de 72.65%; Choez *et al.*, 2017 de $75.8 \pm 8.9\%$; Ccalta, 2017 de 76.92; Kershaw-Young y Maxwell, 2011 de 66%); del mismo modo el promedio de espermatozoides /normales (73.58%) es similar a los reportado por (Sánchez, 2010 de 73.00%), y superiores a lo reportado por (Zirena, 2014 de $71.43 \pm 7.89\%$; Escobar, 2011 de $70.00 \pm 3.16\%$; Cuba, 2000 de 66.26%), Las diferencias encontradas en la calidad espermática en fresco se debería, en el presente trabajo de investigación las muestras de semen colectadas fueron seleccionadas para el *pool*, como también a los diferentes métodos de tinción, a la coloración de las

muestras (Giemsa, azul de tripán y diferentes fluorocromos), a los diferentes métodos de obtención del eyaculado, época del año, edad de los machos y las diferentes técnicas de evaluación de los espermatozoides.

4.2. Motilidad total en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas en los tres tratamientos

Tabla 21. Efecto de los tratamientos (YHG, YHC y YHP) sobre la motilidad total en las etapas de refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas.

Momento de observación	Motilidad espermática (%)			Promedio
	YHG	YHC	YHP	
Refrigerado	61.47 ± 2.16 ^a	57.25 ± 1.75 ^a	60.41 ± 2.22 ^a	60.00 ± 5.23
Descongelado	49.01 ± 2.3 ^b	50.16 ± 1.44 ^b	40.91 ± 1.90 ^a	46.69 ± 6.10
Incubado 1.5 horas	39.97 ± 3.60 ^b	40.60 ± 1.95 ^b	29.81 ± 3.22 ^a	36.79 ± 8.59
Incubado 3 horas	24.57 ± 3.85 ^{ab}	28.77 ± 3.62 ^b	17.04 ± 1.82 ^a	23.46 ± 8.9

*Medias ± DS con diferentes letras en la misma fila muestran diferencias estadísticas significativas (YHG: yema de huevo de gallina, YHC: yema de huevo de codorniz, YHP: yema de huevo de pata)

El análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan, en la comparación de los tratamientos durante la etapa del refrigerado no se encontró diferencia significativa ($P \geq 0.05$). Por lo cual se asume que el efecto protector de las yemas de huevo es similar entre tratamiento; en la comparación de los tratamientos en las etapas de descongelado e incubado por 1.5 horas no se encontró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre YHG y YHC, los mismos con diferencia significativa ($P \leq 0.05$) comparados con el YHP. Por lo cual podemos afirmar que la YHG y YHC tiene una mejor capacidad crioprotectora en comparación con la YHP; en la comparación de los tratamientos en la etapa de incubación del semen por 3 horas el mejor porcentaje de motilidad total se obtuvo en la YHC ($28.77 \pm 3.62\%$) sin diferencias significativas ($P \geq 0.05$) con la YHG y con diferencias significativas ($P \leq 0.05$) con la YHP ($17.04 \pm 1.82\%$). Del cual podemos deducir que la YHC tiene

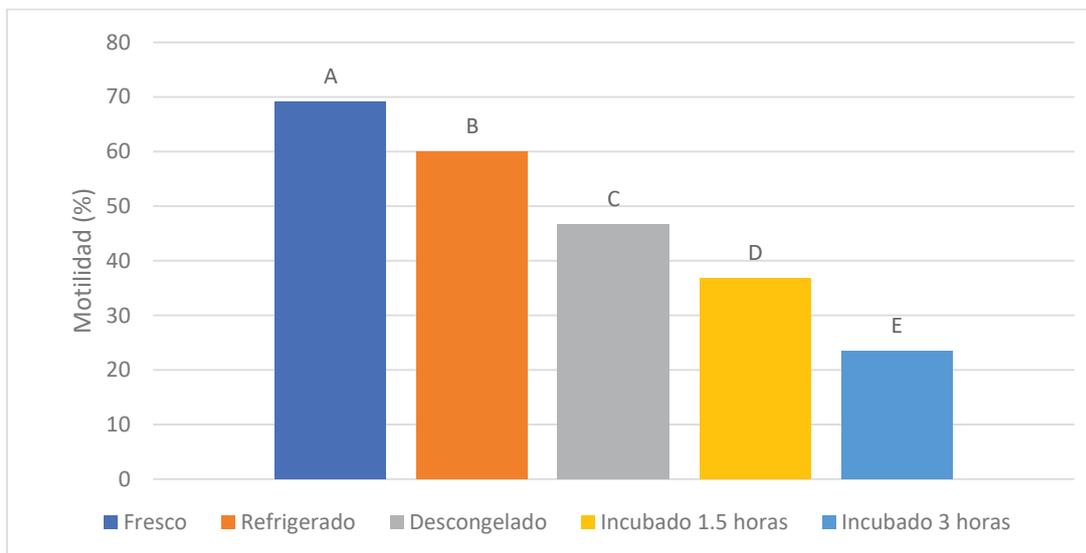
mejor efecto crioprotector que la YHP, pero el mismo efecto que la YHG. Por otra parte, Clulow *et al.*, (2006) indican que la YHP tiene mejor motilidad espermática total que la YHG hasta 1 hora de incubación después de la descongelación en los espermatozoides de equino, la explicación para los resultados obtenidos podría ser debido a la dieta del animal productor de la yema de huevo, al tipo de yema de huevo lo cuales produce diferentes concentraciones de lípidos (Bathgate *et al.*, 2006).

La motilidad total ($60.00 \pm 5.23\%$) obtenido al refrigerado y ($46.69 \pm 6.10\%$) obtenido al descongelado de las diferentes yemas de huevo es superior a los reportados por (Torres, 2018; Ciprian, 2018; Garcia *et al.*, 2017; Ccalta, 2017; Choez *et al.*, 2017; Gomez-Quispe *et al.*, 2016; Canorio *et al.*, 2015; Zirena, 2014; Morton *et al.*, 2007) quienes utilizaron dilutores que incluyeron la yema de huevo de gallina al 20% con diferentes crioprotectores a distintas concentraciones, utilizando diferentes protocolos de congelación, métodos de evaluación y de colección seminal. Así mismo esta superioridad en el presente trabajo podría ser debido a la motilidad inicial con el que se empezó la criopreservación y a la permanencia del plasma seminal.

La motilidad total (36.79 ± 8.59) y ($23.46 \pm 8.9\%$) obtenido durante la longevidad espermática después de la descongelación por 1.5 y 3 horas de incubación de las diferentes yemas de huevo es superior a lo reportado por Morton *et al.*, (2007) quien obtuvo $3.2 \pm 1.6\%$ después de 3 horas de incubación quienes utilizaron dilutores que incluye la yema de huevo de gallina (20%) con diferente protocolo de criopreservación y espermatozoides obtenidos del epidídimo, esta superioridad podría ser debido a la motilidad inicial con el cual se empezó a trabajar, manejo de las muestras, método de colección y presencia del plasma seminal, del

mismo modo Andrabi *et al.*, (2008) obtuvo 26.0% en Búfalos utilizando el mismo dilutor que incluía YHG 20% al incubado por 3 horas, la variación podría ser debido a que se trabajó con diferente especie, diferente protocolo de criopreservación, diferente manejo de las muestras. Así mismo (Clulow *et al.*, 2006) en equinos obtuvo (44.06%) utilizando YHP y (38.54%) utilizando YHG después de 1 hora de incubación, la diferencia podría ser debido a que se trabajó con diferente especie, al método de criopreservación y evaluación.

Gráfico 1. Efecto del proceso de criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas sobre la Motilidad total de los espermatozoides.



*Letras mayúsculas diferentes entre barras muestra diferencias estadísticas significativa.

La motilidad total de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación e incubación por 1.5 y 3 horas disminuyeron significativamente ($P \leq 0.05$).

La disminución significativa ($P \leq 0.05$) de la motilidad total podría ser debido a los cambios físicos químicos y mecánicos que se producen durante el descenso de temperatura de 26 °C hasta -196 °C. Que inducen a la alteración de la funciones de las membrana espermática, acrosomal y mitocondrial (Chaveiro *et al.*, 2006;

Watson, 2000) que van afectar principalmente la capacidad para el abastecimiento de energía, debido a que la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se pierde cuando la membrana celular se daña durante la congelación disminuyendo la concentración intracelular de ATP celular (Gilian *et al.*, 2004; Cerolini *et al.*, 2001), estos espermatozoides después de la criopreservación experimentan una vida más corta debido a que durante este proceso el metabolismo celular generan el anión super oxido (O₂⁻) y peroxido de hidrogeno (H₂O₂) por la disminución de su mecanismo de defensa antioxidante endógeno contribuyendo a la apoptosis espermática acelerada (Aitken y Baker, 2004).

4.3. Vitalidad espermática en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas en los tres tratamientos

Tabla 22. Efecto de los tratamientos (YHG, YHC y YHP) sobre la vitalidad espermática en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas.

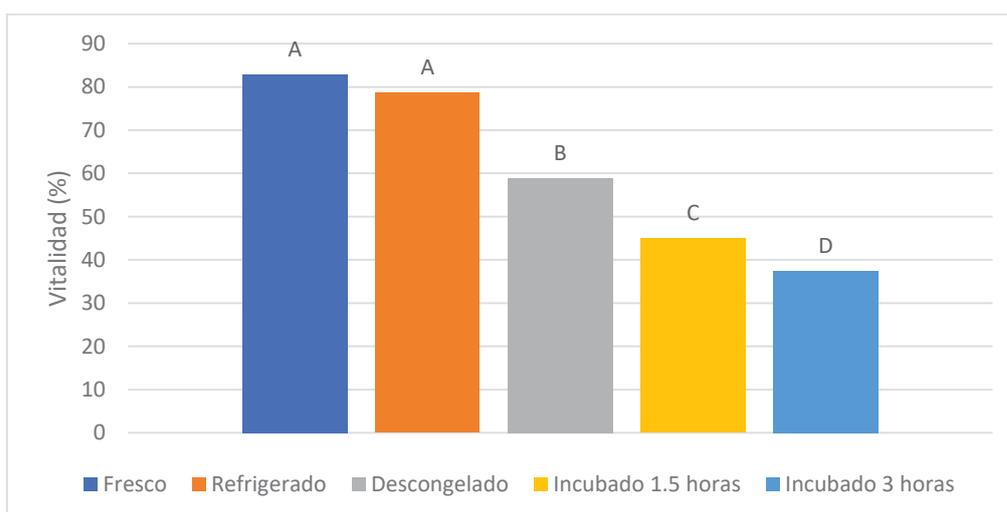
Momento de observación	Vitalidad espermática (%)			Promedio
	YHG	YHC	YHP	
Refrigerado	79.71 ± 1.71 ^a	78.30 ± 1.22 ^a	78.78 ± 2.47 ^a	78.64 ± 4.01
Descongelado	56.66 ± 3.17 ^a	56.69 ± 5.11 ^a	63.26 ± 5.27 ^a	58.86 ± 11.07
Incubado 1.5 horas	50.65 ± 4.39 ^a	44.39 ± 4.55 ^a	39.84 ± 3.88 ^a	44.99 ± 10.85
Incubado 3 horas	39.50 ± 4.59 ^a	40.14 ± 5.53 ^a	32.97 ± 4.23 ^a	37.42 ± 11.34

*Medias ± DS con diferentes letras en la misma fila muestran diferencias estadísticas significativas (YHG: yema de huevo de gallina, YHC: yema de huevo de codorniz, YHP: yema de huevo de pata)

El análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan, al comparar la YHG, YHC y YHP nos indica que no existe diferencias estadísticas significativas ($P \geq 0.05$), durante las etapas de refrigerado, descongelado, incubado a (1.5 y 3) horas. Del cual podemos indicar que las yemas de huevo tienen el mismo efecto protector. Tal como lo indica (Bathgate *et al.*, 2006) en espermatozoides de porcinos quienes compararon yemas de huevo de gallina, codorniz y pata durante la criopreservación.

La vitalidad espermática ($78.64 \pm 4.01\%$) obtenido al refrigerado y (58.86 ± 11.07) obtenido al descongelado de las diferentes yemas de huevo es superior a los reportados por (Torres, 2018; Ciprian, 2018; Ccalta, 2017; García *et al.*, 2017; Choez *et al.*, 2017; Canorio *et al.*, 2015; Zirena, 2014) quienes incluyeron la YHG 20% al dilutor, y utilizaron diferentes protocolos de refrigeración, métodos de evaluación y colección del semen, así mismo esta superioridad podría ser debido a la vitalidad inicial con el cual se empezó a trabajar y al plasma seminal.

Gráfico 2. Efecto del proceso de criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas sobre la Vitalidad de los espermatozoides.



*Letras mayúsculas diferentes entre barras muestra diferencias estadísticas significativa.

La vitalidad de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación disminuyeron ($P \geq 0.05$) de fresco a refrigerado y con diferencias significativas ($P \leq 0.05$) durante las etapas de refrigerado al descongelado e incubado por 1.5 y 3 horas.

La vitalidad espermática del fresco al refrigerado no hubo disminución significativa ($P \geq 0.05$) debido a que la yema de huevo protege al espermatozoide del shock por frío (26° a 5°C) por la presencia de colesterol, proteínas, fosfolípidos

y lipoproteínas de baja densidad (LDL) que permiten interactuar con la bicapa lipídica de la membrana plasmática del espermatozoide impidiendo eventos de transición de fase en los lípidos de la membranas durante la refrigeración (Mousa *et al.*, 2002), la disminución significativa ($P \leq 0.05$) de la vitalidad durante la criopreservación e incubado 1.5 y 3 horas se debería a que durante la congelación de (0 a -196°C) se produce la alteración química y física de la membrana espermática provocando un efecto arrastre en la funcionalidad espermática esto se traduce en una pérdida sustancial de espermatozoides viables (Bailey *et al.*, 2000). Así mismo, Los daños sufridos durante la congelación están asociados con la criocapacitación y longevidad reducida de los espermatozoides criopreservados (Watson, 2000).

4.4. Test hipo osmótico (Host) en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas en los tres tratamientos

Tabla 23. Efecto de los tratamientos (YHG, YHC y YHP) sobre el test hipo osmótico (Host) en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas.

Momento de observación	Host (%)			Promedio
	YHG	YHC	YHP	
Refrigerado	76.45 ± 2.67 ^a	76.14 ± 2.71 ^a	77.93 ± 2.05 ^a	76.80 ± 5.79
Descongelado	50.41 ± 2.78 ^a	51.53 ± 3.01 ^a	52.27 ± 3.60 ^a	51.00 ± 7.29
Incubado 1.5 horas	41.67 ± 4.21 ^a	44.81 ± 2.93 ^a	39.32 ± 2.43 ^a	41.93 ± 7.88
Incubado 3 horas	34.30 ± 2.50 ^a	39.29 ± 2.68 ^a	33.47 ± 1.75 ^a	36.68 ± 6.01

*Medias ± DS con diferentes letras en la misma fila muestran diferencias estadísticas significativas (YHG: yema de huevo de gallina, YHC: yema de huevo de codorniz, YHP: yema de huevo de pata)

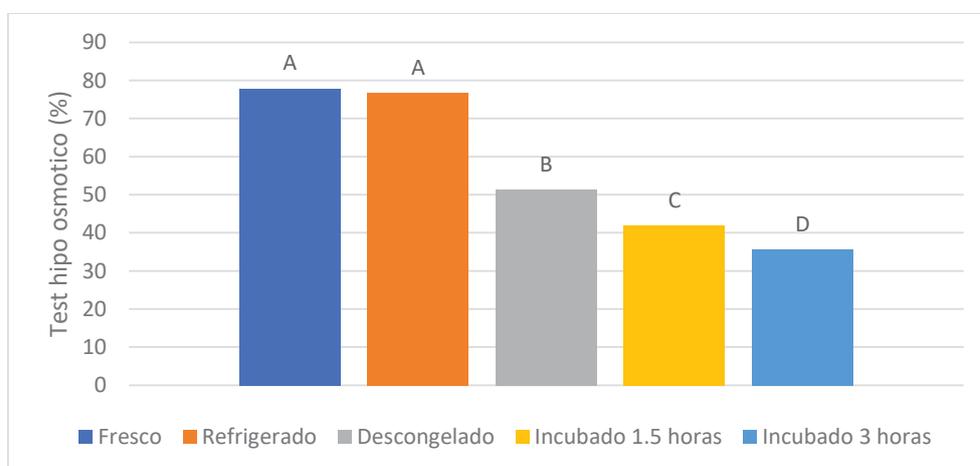
El análisis de varianza (ANOVA) a promedio obtenidos y la prueba de Duncan, que en la comparación de tratamientos durante las etapas de refrigerado, descongelado, incubado por (1.5 y 3) horas no se encontraron diferencia significativa ($P \geq 0.05$). Por lo cual se asume que el efecto protector de las yemas de huevo es similar entre tratamientos, Andrabi *et al.*, (2008) en búfalos indica que la

YHP comparado con otras YH conserva el parámetro de test hipo osmótico hasta las 6 horas después del descongelado.

El test hipo osmótico ($76.80 \pm 5.79\%$) obtenido al refrigerado y (51 ± 7.29) obtenido al descongelado de las diferentes yemas de huevo es superior a los reportados por (Torres, 2018; Ciprian, 2018; Ccalta, 2017; Garcia *et al.*, 2017; Zirena, 2014) quienes incluyeron la YHG 20% al dilutor y utilizaron diferentes métodos de evaluación, refrigeración y colección de eyaculados. Así Mismo esta superioridad podría ser debido a la selección de eyaculados al inicio del experimento y al manejo de las muestras.

El test hipo osmótico ($41.93 \pm 7.88\%$) y ($36.68 \pm 6.01\%$) obtenido durante la longevidad espermática después de la descongelación por 1.5 y 3 horas de incubación de las diferentes yemas de huevo. Son inferiores a lo reportado por (Andrabi *et al.*, 2008) en búfalos quien obtuvo 59.9% y 25.0% al incubado por 3 y 6 horas utilizando dilutor que incluía la YHP, la diferencia podría ser debido a que se trabajó con otra especie, al protocolo de criopreservación y método de evaluación.

Gráfico 3. Efecto del proceso de criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas sobre el Test hipo osmótico de los espermatozoides.



*Letras mayúsculas diferentes entre barras muestra diferencias estadísticas significativa.

El test hipo osmótico de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación disminuyeron ($P \geq 0.05$) de fresco a refrigerado y con disminución significativa ($P \leq 0.05$) durante la etapa de refrigerado al descongelado e incubado 1.5 y 3 horas.

En el test hipo osmótico durante la etapa de fresco al refrigerado no hubo una disminución significativa ($P \geq 0.05$) debido a que la yema de huevo estabilizada la membrana plasmática por acción de los fosfolípidos, proteínas y lipoproteínas que forman una capa que protege del daño producido por la disminución de la temperatura durante la refrigeración (Hu *et al.*, 2010), pero durante la criopreservación e incubación por 1.5 y 3 horas hubo una disminución significativa ($P \leq 0.05$) de la integridad de la membrana espermática debido a que existen dos principales rangos que producen el daño espermático: el periodo de enfriamiento (0° a -5°C) que ocasiona la agrupación irreversible de las proteínas integrales debido a la separación de los lípidos en la bicapa lipídica y algunas moléculas de colesterol son liberados como resultado de la ruptura de la interacción entre lípidos y proteínas provocando pérdida de la función de los canales iónicos ocasionando una falla en la permeabilidad selectiva de este modo se incrementa el flujo de iones de calcio y bicarbonato del espacio extra celular dentro del interior del espermatozoides ocasionando un fenómeno denominado crio-capacitación (Yeste, 2016). segundo periodo es la formación de cristales de hielo extra celular (-6° a -15°C) que incrementa la concentración de solutos (azúcar, sales y proteínas) formando un medio hiperosmótico en consecuencia el espermatozoide se deshidrata (Andrabi, 2008; Watson, 2000), causando daño físico en la membrana plasmática y disminuyendo su longevidad e incrementando espermatozoides con proceso de apoptosis.

4.5. Integridad de la membrana acrosomal en refrigerado, descongelado, incubado (1.5 y 3) horas en los tres tratamientos

Tabla 24. Efecto de los tratamientos (YHG, YHC y YHP) sobre la Integridad del acrosoma del espermatozoide en refrigerado, descongelado, Incubado (1.5 y 3) horas.

Momento de observación	Integridad de la Membrana Acrosomal (%)			Promedio
	YHG	YHC	YHP	
Refrigerado	80.84 ± 1.59 ^a	80.86 ± 2.42 ^a	75.76 ± 2.20 ^a	79.08 ± 5.46
Descongelado	77.68 ± 1.43 ^b	77.03 ± 1.55 ^b	71.20 ± 1.60 ^a	75.30 ± 4.61
Incubado 1.5 horas	72.38 ± 0.70 ^b	74.05 ± 1.78 ^b	65.95 ± 2.27 ^a	70.79 ± 5.33
Incubado 3 horas	69.89 ± 0.98 ^b	71.72 ± 3.07 ^b	62.55 ± 1.68 ^a	68.05 ± 6.58

*Medias ± DS con diferentes letras en la misma fila muestran diferencias estadísticas significativas (YHG: yema de huevo de gallina, YHC: yema de huevo de codorniz, YHP: yema de huevo de pata)

El análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan, en la comparación de los tratamientos durante la etapa del refrigerado no se encontró diferencia significativa ($P \geq 0.05$). Por lo cual se asume que el efecto protector de las yemas de huevo es similar entre tratamiento; en la comparación de los tratamientos en las etapas de descongelado e incubado por 1.5 y 3 horas no se encontró diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre YHG y YHC, los mismos con diferencia significativa ($P \leq 0.05$) comparados con el YHP. Por lo cual podemos afirmar que la YHG y YHC tiene una mejor capacidad crioprotectora en comparación con la YHP; en la comparación de los tratamientos en la etapa de incubación del semen por 3 horas el mejor porcentaje de motilidad se obtuvo en la YHC ($71.72 \pm 3.07\%$) sin diferencias significativas ($P \geq 0.05$) con la YHG y con diferencias significativas ($P \leq 0.05$) con la YHP ($62.55 \pm 1.68\%$). Del cual podemos deducir que la YHC tiene mejor efecto crioprotector que la YHP, pero el mismo efecto que la YHG.

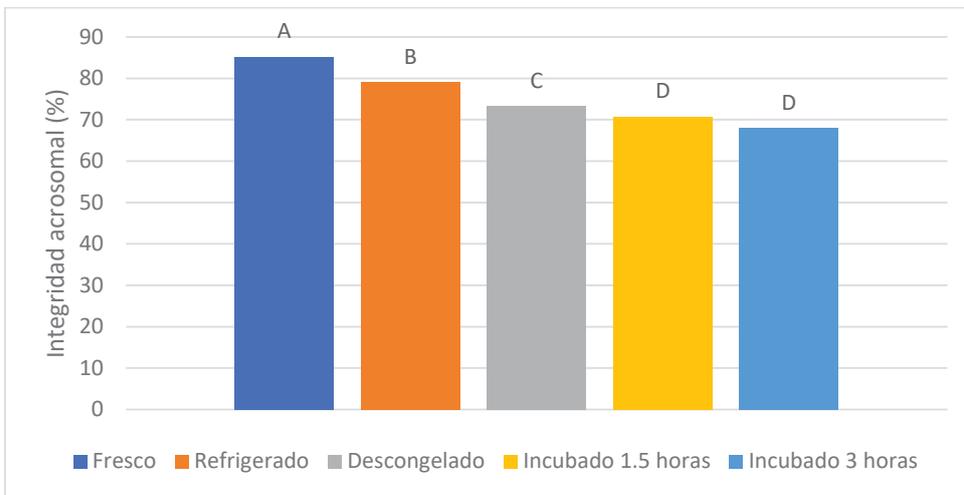
La integridad acrosomal ($79.08 \pm 5.46\%$) obtenidos al refrigerado de las diferentes yemas de huevo es inferior a lo reportado por (Ugarelli *et al.*, 2017 de

93.30%; Morton *et al.*, 2007 de 86.4%) y superior a lo reportado por (Torres, 2018 de 54.03%; Ciprian, 2018 de 76.44%; Ccalta, 2017 de 52.65%) quienes incluyeron yema de huevo de gallina al dilutor y realizaron diferentes métodos de evaluación y colección de eyaculado.

La integridad acrosomal ($75.30 \pm 4.61\%$) obtenidos al descongelado de las diferentes yemas de huevo es inferior a lo reportado por (Morton *et al.*, 2007 de 79.0%) superior a lo reportado por (Torres, 2018 de 45.08%; Ciprian, 2018 de 67.90%; Ccalta, 2017 de 44.97%; Choez *et al.*, 2017 de 51.8%) quienes incluyeron la YHG 20% en el dilutor y utilizaron diferentes métodos de criopreservación y colección de eyaculado, así mismo esta variabilidad podría ser debido al método de evaluación.

La integridad acrosomal ($70.79 \pm 5.33\%$) y ($68.05 \pm 6.58\%$) obtenidos durante la longevidad espermática después de la descongelación por 1.5 y 3 horas de incubación de las diferentes yemas de huevo es inferior a lo reportado por (Morton *et al.*, 2007) obtuvo 76.1% al incubado por 3 horas quien incluyo la YHG 20% en el dilutor, utilizando diferente método de evaluación y colección. así mismo (Andrabi *et al.*, 2008) obtuvo 81.4% en búfalos a las 3 horas y 76.6% a las 6 horas de incubación quienes incluyeron YHG al dilutor, utilizaron diferente protocolo de criopreservación y método de evaluación.

Gráfico 4. Efecto del proceso de criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3) horas sobre la Integridad acrosomal de los espermatozoides.



*Letras mayúsculas diferentes entre barras muestra diferencias estadísticas significativa.

La integridad acrosomal de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (fresco, refrigerado y descongelado) disminuyeron significativamente ($P \leq 0.05$). por otra parte, en la etapa de incubado por 1.5 al incubado 3 horas no hubo diferencia significativa ($P \geq 0.05$).

Durante el proceso de criopreservación la integridad de la membrana acrosomal de los espermatozoides de alpaca (73.30%) es más resistente en comparación ovino (Apaza, 2017 de 61.59% y Sandoval *et al.*, 2007 de 63.12%), bovino (Cabrera y Pantoja, 2012 de 48.6%) y porcino (Williams *et al.*, 2015 de 35.8%) al descongelado, posiblemente se deba a la composición del plasma seminal y a la especie.

CAPITULO V

CONCLUSION

- Los valores del semen pre seleccionado *pool* en fresco fueron: motilidad total (69.10%), concentración espermática (138.02×10^6 spz/ml), vitalidad espermática (82.82%), test hipo osmótico (77.93%), integridad de la membrana acrosomal (85.79%) y morfología espermática normal (73.58%).
- 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.
- Durante el proceso de criopreservación (fresco, refrigerado, descongelado) e incubado (1.5 y 3 horas) de los espermatozoides hubo una disminución significativa ($P \leq 0.05$) de la motilidad total e integridad acrosomal, y sin diferencias significativas ($P \geq 0.05$) en la vitalidad y test hipo osmótico de fresco a refrigerado así mismo en la integridad acrosomal de incubado 1.5 a incubado 3 horas.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda usar yema de huevo de codorniz y gallina para criopreservación de semen de alpaca
- Se recomienda añadir un antioxidante al dilutor para evitar el estrés oxidativo durante la criopreservación del semen.
- Se recomienda mantener el plasma seminal durante la criopreservación del semen.
- Se recomienda realizar una pre selección de eyaculados al inicio de la criopreservación del semen de alpaca.
- Se recomienda realizar estudios bioquímicos a los fluidos cervicales y uterinos de la alpaca.
- Se recomienda medir la temperatura del semen al finalizar la colecta.
- Se recomienda usar un degelificante solo para su evaluación microscópica de los espermatozoides.
- Se recomienda realizar las evaluaciones microscópicas mediante la citometría de flujo.
- Se recomienda realizar evaluación de la integridad mitocondrial, fragmentación del ADN y estrés oxidativo del espermatozoide criopreservado.

CAPITULO VI

BIBLIOGRAFIA

- Aguas, P.A.; Pinto, P. (1985). The acrosomal membrane of boar sperm: a golgi-derived membrane poor in glycoconjugates. *Journal of Cell Biology*, v.100, p.528-534.
- Aisen E, Álvarez H, Venturino A, Garde J. (2000). Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053- 1061. doi: 10.1016/S0093-691 X (00) 00251-X.
- Aitken RJ, Baker MA. (2004). Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and development* 16(5), 581-588.10.1071/RD03089.
- Alarcón, V., Wilber, G. y Bravo, W. P. (2012). Inseminacion Artificial de alpacas con semen Colectado por Aspiracion Vaginal y Vagina Artificial. *Rev Inv Vet Perú*, 23(1): 58-64.
- Aller J, R. G. K. A. A. R. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama. *Arch Zootec*, pp. 15-23.
- Andrabi SMH, Ansari MS, Ullah N, Anwar M, Mehmood A, Akhter S. (2008). Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa.;104:427-433.
- Apaza, L. (2017). Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero. (Tesis de pregrado). UNA, Puno, Peru.
- Ávila, R. (2009). Efecto de la congelación y descongelación de semen equino, en dos diluyentes comerciales (en línea). Tesis Med. Vet. Michoacan, Mexico, UMSNH. 34 p. Consultado 15 ago. 2018.

- Ávila-Portillo LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, Gómez C, Delgado LG, Gómez C, Lozano JM, Reguero MT. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología* 57 (4): 291-300.
- Bailey J.L., Bilodeau J.F., Cormier N. (2000). Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *Journal of Andrology.*, vol. 21, p. 1-7.
- Bamba K. (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 29:1245-1251.
- Banda R., J., Evangelista V. S., Ruiz G, L., Sandoval M., R., Rodriguez LI., C., Valdivia C., M., Santiani A., A. (2010). Efecto de Dilutores en Base a TRIS, Tes y Leche Descremada en la Criopreservación de Espermatozoides Obtenidos del Epidídimo de Alpaca. *Rev. Inv Vet.Perú*, 145-143.
- Bag, S.; Joshi, A.; Naqvi, S.; Rawat, P. y Mittal J. (2004). Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 72: 175–183.
- Baquero-Parrado J. Pardo Romero P. Cruz Casallas P. (2004). Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen canino bajo condiciones de refrigeración: efectos del tiempo de refrigeración, grado de dilución y de la concentración de fructosa. Trabajo de tesis. Universidad de los Llanos Meta, Colombia.: 8:26-33.

- Bathgate, R., Maxwell, W.M.C., Evans, G. (2006). Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod. Dom. Anim.* 41, 68–73.
- 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.
- Barrios B, Pérez-Pé R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, CebriánPérez J. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 63: 1531-1537.
- Boiso I. (2001). Principios básicos de criobiología. *Revista iberoamericana de fertilidad* 18 (4).
- Bravo PW, Alarcón V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, Tito F. (2012). Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 136: 157- 163.
- Bravo P.W., Skidmore J.A., Zhao (2000). Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science.*, vol. 62, p. 173-193.
- Bravo PW, Flores D, Ordoñez C. (1997). Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. *Biology of reprod.* 57: 520-524.
- Bravo, P. W., Ordoñez, C. y Alarcon, V., (1996). Semen processing and freezing of alpacas and llamas. 13th ICAR Sydney.

- Bravo, W. P., (1995). Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. proceedins of post graduate foundation in veterinary Science of University of Sydney., pp. 61-66.
- Brown, B. W. (2000). A review on reproduction in South American Camelids. Animal Reproduction Science, pp. 169-195.
- Buendía, P; Soler, C., Paolicchi, F., Gago, G.; Urquieta, B. (2002). Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm Class Analyzer Computer Assisted System. España.
- Bustinza, V. (2001). La Alpaca: Crianza, Manejo y Mejoramiento. Puno, Perú: Editorial Universitaria. 1 ed., 343 p.
- Canorio N. (2015). Efecto del proceso de criopreservación sobre las proteínas antioxidantes GPX1 Y GPX4 de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*) Para optar al grado académico de doctor en Ciencias Biológicas. UNMSM, Lima, Perú.
- Carretero, M., Giuliano, S., Casaretto, C., Gambarotta, M., & Neild., D. (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. Invet 11(1): 55-63.
- Cárdenas, N. (2002). Inseminación artificial con espermatozoides congelados colectados de los conductos deferentes en alpacas. Tesis. FMVZ-UNA. Puno.
- Casaretto, C. Martínez, SM. Giuliano, S. Rubin de celis, E. Gambarotta, M. Carretero, MI. (2011). Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. Andrologia; 44, pp 335-341.

- Cabrera, P., Pantoja, C. (2012). Viabilidad espermática e integridad acrosomal en semen congelado de toros nacionales, *Revista de investigación veterinaria del Perú*, 23(2),192-200.
- Cabrera, V. P. y Pantoja, A. C. (2008). Influencia de los dilutores Tris y Ovine Freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. *Rev Inv Vet Perú* 2008; 19 (2): 152-159.
- Cayo, S. (2013). Inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen fresco, refrigerado y congelado colectado por el método de electro eyacuación Tesis de pregrado UNSAAC Cusco-Perú.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2013. Resultados definitivos IV Censo Nacional Agropecuario 2012, Pp 63.
- Ccalta, R. (2017). Efecto de la adición del colesterol en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*) (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM. (2001). Change in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen, *Reproduction* 121, 395-401.
- Chaveiro, A., Machado, L., Frijters, A., Engel, B., Woelders, H. (2006). Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. *Therio genology* 65,1875-1890.
- Chequeman C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sanchez R. (2013). Assessment of Sperm Function Parameters and DNA Fragmentation in Ejaculated Alpaca

Sperm (Lama Pacos) by Flow Cytometry.;453:447-453.
doi:10.1111/rda.12096.

Choez, K., Ruiz, L., Sandoval, M., Evangelista, S., Santiani, A. (2017).
Determinación de la Concentración Óptima de Tres Crioprotectores para la
Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca, 28(3), 619–
628.

Choez K., Evangelista S., Castillo R., Santiani A. (2013). Efecto de la motilidad
inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de
espermatozoides epididimarios de alpaca. *Spermova*. 2013; 3(1): 83 – 8.

Ciprian Achirca, R. (2018). Tesis en Criopreservación del semen de alpaca
utilizando Metil- β -ciclodextrina cargada con colesterol. Universidad nacional
agraria la Molina escuela de posgrado maestria en produccion animal.

Clulow, J. R., Maxwell, W. M. C., Evans, G., & Morris, L. H. A. (2006). A comparison
of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm.
Australian Veterinary Journal, 85(6), 232–235.<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00151.x>.

Coombes, G. B., Varner, D. D., Schroeder, F., Burghardt, R. C., Blanchard, T. L.
(2000). Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of
frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of Reproduction and
Fertility Supplement* 56, 127-132.

Cortés, Susana. (1997). Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática
de semen caprino. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de ciencia
Biológicas. Tesis de grado Doctorado.

- Cuba, Y. (2000). Evaluación Microscópica de Semen de Alpaca (Lama Pacos), antes y después del proceso de congelado en el CICAS-La Raya. Tesis de pregrado UNSAAC Cusco.
- Davalos R, Olazabal J. (2002). Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Rev. Inv. Vet. Perú. 13 (2): 98-99.
- Deen, A., Vyas, S., y Sahani, MS. (2003). La recolección de semen, cryopreservación y la inseminación artificial en el dromedario. Anim. Reprod. Sci. 77, 223-233. doi: 10.1016 / S0378-4320 (03) 00040-X.
- Demianowicz W, Strezek J. (1996). The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. Reprod Domest Anim 31: 279-280.
- Derivaux, J. (1982). Reproducción de animales Domésticos. 2da. Ed. Edit. Acribia Zaragoza-España.
- Diaz H., Espinoza J., Huanca W., Rodriguez J. (2014). Características Bioquímicas del plasma seminal fresco y Congelado/Descongelado de alpacas (Vicugna pacos) Rev Inv Vet Perú 2015; 26(1): 43-48.
- Drobnis E.Z., Crowe L.M., Berger T., Anchoroguy T. J., Overstreet J.W. and Crowe J.H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membrane: a demonstration using sperm as a model. J. Exp. Zool. 265.
- Elwishy, A., (1988). Reproduction in the male Dromedary (*Camelus dromedarius*). Animal Reproduction Science, Volumen 17, pp. 217-241.
- Escobar, E. (2011). El efecto del plasma sanguíneo en la congelación del semen en el CICAS – LA RAYA. Tesis de pregrado UNSAAC Cusco.

- Evans, G., Maxwell, WMC. (1990). Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza; Ed Acriba. 204 p.
- Fernández, J., B. Barrios, J. Martí, T. Muiño, P. Cebrián. (2000). Perdida de proteínas de membrana de espermatozoides ovinos debida a la congelación. Zaragoza, España. Reproducción. p. 123-125.
- Fernandez Baca, S. Y Calderon, M. (1966). métodos de colección de semen de la alpaca. Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM. Vol. 18-20: 13-26.
- Ferré LB y Werkmeister A. (1996). Desarrollo de una Vagina Artificial Termoeléctrica para la colecta de semen en Camélidos (Resultados preliminares). Revista Argentina de Producción Animal, Vol. 16, No. 4:363-365.
- Foulkes, J.A., (1977). The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and the integrity of bovine spermatozoa. J. Reprod. Fert. 49, 277-284.
- Galindo W. (1995). Efecto de eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nacional del Altiplano.
- García, W., Alarcón, V. (2019). Efecto de la inseminación artificial con semen fresco, con uno y dos servicios, en la fertilidad y natalidad de las alpacas. Rev Inv Vet Perú., 30(2): 760-767.
- García, W., Alarcón, V., Bravo, W. (2017). Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo, 28(2), 337–344. Rev Inv Vet Perú 2017;

- García, W. (2014). Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción xisqueta y aranesa. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Medicina y Cirugía Animals.
- Garnica, J., Achata, R. y Bravo, P. W. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science.*, pp. 85-90.
- Gaully M, Leindinger H. (1996). Semen quality characteristics, volume distribution and hypo-osmotic sensitivity of spermatozoa of *Lama glama* and *Lama guanicoe*. En: 2nd European symposium on south American camelids. Universita Di Camerino. p. 235-244.
- Gilian L., W.M. Cris Maxwell y G. Evans. (2004). Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reprod. Fert. Dev.*, 16(4): 447-454.
- 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*). *Anim. Reprod. Sci.* 104, pag. 359–369.
- Giuliano SM, Spirito SE, Maragaya MH. (2002). Electro ejaculation and seminal parameters in vicuña (*Vicugna vicugna*). *Theriogenology* 57: 583.
- Gómez-Quispe, E., Perez, G., Machaca, V. (2016). Adición del Antioxidante Tempol en la Criopreservación de Espermatozoides de Alpaca (*Vicugna pacos*) Colectados por Desviación del Conducto Deferente. *Rev Inv Vet Perú* 2016; 27(2): 294-302 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v27i2.11642>.
- Guyton A. & J. Hall. (2000). Tratado de Fisiología Medica. 10ma edición Mc Graw-Hill – Interamericana de España, Madrid. 1280 P.

- Hafez ESE. (2002). Preservación y criopreservación de gametos y embriones. En: Hafez E. S. E., Hafez B., eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: McGraw Hill Inter americana. p. 441-452
- Harrison, R. A., P. J. Ashworth, y N. G. Miller. (1996). Bicarbonate/CO₂, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.* 45:378-391.
- Holt, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, 47-58.
- Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH. (2010). The cryoprotective effect of low/density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing/thawing. *Animal reproduction science*; 117 11-17.
- Huanca. N. (2015). Índice de fragmentación de ADN espermática en semen de alpacas (*vigcuna pacos*) utilizando el integrated system-ISAS. Tesis FAZ.UNSAAC, Cusco, Perú.
- Huanca, W. y G. P. Adams. (2007). Semen Collection and Artificial Insemination in Llamas and Alpacas. En: R. Youngquist and W. Threlfall (Eds). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*, 2° Edition Saunders. Elsevier Inc. pp 869-873.
- Huanca W, Gaulty M. (2001). Conservación de semen refrigerado de llamas. *Rev. Inv. Vet. Perú* 1: 460-464.
- Huillcahuaman, R. (2012). Inseminación artificial en alpacas huacaya con semen fresco, refrigerado y congelado. Tesis de pregrado UNSAAC Cusco-Perú.

- Isachenko E, Isachenko V, Kathov II, Dessole S, Nawroth F. (2003). Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online* 6: 191 – 200.
- Jamil-ur-Rahman Hea. (2011). Effects of different levels of pigeon egg yolk in extenders on the Post-Thaw semen quality of sahiwal Bulls. *Pakistan Veterinary Journal*; 32: 315-318.
- Jeyendran, R., Van der ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. and Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70, 219-228.
- Johnson LW. (1989). Llama reproduction. *Vet. Clin. N. Am. FoodAnim. Pract.* 5: 159-182.
- Kershaw-Young C. M. Y Maxwell W. M., (2011). Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 4), 369–375 (2012).
- Kumar S, Millar JD, Watson PF. (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*, 46:246-253.
- Ladha, S. (1997). Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell the mammalian spermatozoon. *J. Membr. Biol.* 165, 1-10.7.
- Lamia A., Anton M., Tainturier D. (2005). Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before,

during and after freezing and thawing 2Reproduction129 535–543.Obtenida de <http://www.reproductiononline.org/content/129/4/535.long>.

López, Y. (2014). Comparación de tres métodos de tinción para determinar la morfometría del espermatozoide de alpaca usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). Tesis. FAZ-UNSAAC. Cusco. Perú.

Machaca, A., Ordoñez, C., Ampuero, E., Antezana, W., Cucho, H. (2012). Propuesta de implementación y funcionamiento del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos “CICAS - La Raya” FAZ – UNSAAC. Cusco.

Mancisidor, I. (2013). “Efecto del α -tocoferol durante el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*)”. Tesis Título. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, E.A.P. Genética y Biotecnología. Lima.

Marín-Briggiler CI, Tezon JG, Miranda PV, Vazquez-Levin MH. (2002). Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. Fertil Steril 77:252–259.

Mazur P. (1984). Freezing and living cells: mechanism and implications. Am J Physiol – Cell Physiol 247: 125-142.

McEvoy TG, Bourke DA, Adam CL. (1994). Recent advances in understanding and controlling the reproductive biology of South American camelids. En: Reproductive technology and andrology meeting. España 5: 277-298.

McEvoy, T. G., Kyle, P., Young, C. L. y Adan, D. A. (1992). Aspects of artificial breeding and establishment of pregnancy in south American camelids. Proc. 12 Int. Cong. Anim. Reprod. The Hague, Volumen 4.

- Mendoza, J; Dulin, P; y Warrent, T. (2000). The lower hydrolysis of ATP by the stress protein GroEL is a major factor responsible for the disminished chaperonin activity at low temperature (en línea).
- Medeiros CM, Forel F, Oliveira AT, Rodrigues JL. (2002). Current status of sperm cryopreservation: *Theriogenology* 57: 327-344.
- Montalvo, C., Cevallos, E. y Copaira, M., (1979). Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. Res proyectos de investigación Universidad Nacional Mayor de San Marcos, p.37.
- Moussa, M., Marinet, 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, 1695–1706.
- Mogrovejo D. (1952). Estudios de semen de la alpaca. Tesis de Bachiller. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 21 p.
- Morton KM., G. Evans, & W.M.C. Maxwell. (2010). Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the survival and functional integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 74: 311–316.
- Morton, K. M., Vaughan, J. L. & Maxwell, W. M., (2008). Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation. 45, 637-642.

- Morton K.M., Bathgate R., Evans G., Maxwell W.M.C (2007). Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of Citrate, Tris and Lactose based diluents, and pellets and straws. *Reproduction Fertility Development.*, vol.19, p.792– 6.
- Morton KM, Thomson PC, Bailey K, Evans G, Maxwell WMC. (2006). Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure. *Reprod. Dom. Anim.* 45(4): 637-643.
- Muiño, R. (2008) Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: Identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis de Doctorado, Universidad Santiago de Compostela.
- Narváez, G. (2008). Inseminación artificial en alpacas con semen congelado, colectado de vagina natural post coital y vagina artificial. Tesis Ing. Zoot. Cusco, Perú, UNSAAC.
- Neely, D. y Bravo, P. (1998). Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. *Youngquist RS*, pp. 787-792.
- Ordoñez, C., Ampuero, E., Alarcon, V., Franco, E., Hanzen, C., Cucho, H. (2015). Evaluación de tres dilutores en la criopreservación de semen de alpaca (*vicugna pacos*) en pellets. *Spermova*;5(1) 119-123.
- Ordoñez, C., Ampuero, E., Cucho, H., Chalco, G. (2012). Caracterización morfológica de los espermatozoides de alpacas usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). *Spermova*: 67 – 68.

- Pacheco, J., Mamani, R., Franco, F., Zea, O., Pezo, D., Vélez, V. (2014). Efecto de la osmolaridad sobre la respuesta endosmótica en espermatozoides de epidídimo y eyaculados de alpaca (*Vicugna pacos*). *Spermova*. 2014; 4(1): 36-38.
- Pacheco, J. (2008). Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos.
- Paricahua, E. (2001). Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpacas (*Lama pacos*). Tesis FMVZ-UNA.7
- Paucar, A. D. (2011). Evaluación de cuatro dilutores comerciales en la congelación de semen de alpacas colectados con vagina artificial y post copula (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Peña, A.; C. Linde-Forsberg. (2000). Effect of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718.
- Pérez B, González JL, Clemente MG, García-Casado P. (1999). El test de endósmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albéitar* 30: 16-17.
- Phillips, P. (1939). Preservation of bull semen. *J. Biol. Chem*, pp. 130-415.
- Polakoski, K.L.; McRorie, R.A. (1973). Boar acrosin: classification, inhibition and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes. *The Journal of Biology and Chemistry*, v.248, p.8183-8188.
- Quintano, J. (2001). Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.

- Quispe, D. (2015). Evaluación reproductiva del plantel de reproductores del banco de germoplasma de alpacas (*Lama pacos*) de color del CICAS “La Raya” (Tesis de pregrado). UNSAAC, Cusco, Perú.
- Quispe, F. (1987). Evaluación de Las Características Físicas del semen de la Alpaca (*Lama Pacos*) Durante la Época de Empadre. Tesis. Fac. Med. Vet. Zoot. U.N.A. Puno. Perú.
- Rasul Z, Ahmed N, Anzar M. (2007). Antagonist effect od DMSO on the cryoprotection ability of glicerol during cryopreservation of buffalo sperm. *Theriogenology* 68: 813-819.
- Raymundo, F., Huanca, W., Huertas, S. y Gaulty, M., (2000). Influence of different extender son themotility in alpaca (*Lama pacos*) semen. 2nd Intcamelidconferenceagroeconomics of camelfarming Almaty.
- Rivera, E. (1998). Uso de la yema de huevo y la glicerina en la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca. Tesis FMVZ-UNA Puno. Perú.
- Rios, C. (2013). Categorización de alpacas macho reproductores huacaya blanco del CICAS La Raya de acuerdo a las características fenotípicas, la calidad de fibra y semen. Tesis UNSAAC Cusco-Perú.
- Ruíz GL. (2005). Efecto de dos antioxidantes (Tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Salinas, P., Sánchez, R., Risopatron, J. (2013). Criopreservacion de espermatozoides caninos a -80°C. *Int. J. Morphol.*, 31(1):2017-224.

- Salomón S, Maxwell W. (2000). Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77-111.
- Salomon, S; Y Maxwell, W. (1995). Frozen storage of ram semen. I processing freezing, thawing and fertility after cervical insemination (en línea).
- Sánchez, J. (2010). Inseminación artificial vía la paroscópica con semen fresco diluido y semen descongelado en alpacas Huacaya primerizas. Tesis FAZ. UNSAAC, Cusco, Perú.
- Sandoval R, Santiani A, Ruiz L, Leyva V, Coronado L, Delgado A. (2007). Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Rev Inv Peru*; 18 (2):107-104.
- Santiani, A., Huanca, W., Sapana, R., Huanca, T., Sepúlveda, N., y Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen thawed alpaca semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.* 7, 303-309.
- San Martín M. (1961). Fisiología de la reproducción de la alpaca, *Anim. Symp. Sobre problemas ganaderos*. Lima Peru, pp 121- 131.
- Silva, A.R. (2007). Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31 (Suppl.1), 119-127.
- Silva, L.D.M. and Verstegen, J.P. (1995). Comparison between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen thawed spermatozoa. *Theriogenology* 44: 571– 579.
- Smith, B., (1999). Overview of reproduction in the male llama and alpaca. *Proceedings of the Society for Theriogenology*, pp. 191-196.

- Sumar J. (2002). Llamas y alpacas. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7a ed. México: McGraw Hill Interamericana. p 224- 242.
- Sumar J. (1996). Reproduction in llamas y alpacas. Anim. Reprod. Sci. 42: 405-415.
- Sumar, J. (1983). Studies on reproductive pathology in alpacas. Master Thesis. Sweddish University of Agrarian Sciences.
- Sumar, J. y Leyva, V. (1981). Colección de Semen Mediante Vagina Artificial en la Alpaca (Lama pacos). En Memoria. IV Convergencia, inter. sobre Camelidos Sudamericanos Corp.
- Suttiyotin, P. y Thwaites, C. J., (1992). Comparison of a swim-up technique with Hamilton Thorn Motility Analyser for measurement of sperm velocity and motility. Reprod Fertil Dev. 1992; 4 (2): 153 - 160.
- Sutovsky P, Manandhar G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En: J. De Jonge C., Barratt L. R. C., eds. The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration. Estados Unidos. Cambridge University Press. p. 1-30.
- Tibary A, Anouassi A, (1997). Theriogenology in Camelidae. Actes Editions, Rabat, Morocco.
- Torres E. (2018). Efecto de la adición de plasma seminal antes y después de la congelación de espermatozoides colectados del conducto deferente de alpacas sobre algunas características espermáticas. (Tesis de pregrado). UNA, Puno, Perú.

- Tribulo, H. (2009). Curso de congelado de semen bovino. Argentina. Instituto de Reproducción Animal Córdoba IRAC. Guía práctica. P 31-33.
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G. & Tainturier, D. (1997). Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for freeze preservation of Poitou jacas sperm. *Cryobiology*, 34, 385-393.
- Ugarelli A, Evangelista S, Santiani A. (2017). Evaluación de la Integridad Acrosomal en Espermatozoides Epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo.;28(1):130-140.
- Vaughan, J. L., Galloway, D. y Hopkins, D. (2003). Artificial insemination in alpacas (Lama pacos). Rural Industries Research and Development Corporation. Australia., p. p. 90.
- Vera NM. (2009). Caracterización de la función sexual de carneros de la raza highlander y suffolk. [En línea] 2009. [Citado el: 10 de marzo de 2013. Tesis.
- Vélez, C. (1997). El efecto de la copula del macho en el endometrio uterino de la hembra, aspectos histológicos y ecográficos. Tesis de Médico Veterinario, Universidad Católica Santa María, p. 68.
- Von Kubineck J. (1974). Samenentnahme beim AlpakadurcheineHarnohrenfistel. *Z. Tierzucht* 90: 335.
- Wani, NA, Billah, M., y Skidmore, JA. (2008). Los estudios sobre la licuefacción y el almacenamiento de dromedario eyaculado (Camelus).
- Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 60:481-492.

- Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7, pp.871-91.
- Watson, P.F.; Matin, I.C. (1975). The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees. *Aust J Biol Sci.*, 28:145-52.
- Williams S, Fernández V, Gavazza M, Marmunti M, Zeinsteger P, Prenna G. (2015) Congelación de semen porcino: resultados y avances en la técnica Boar Semen Cryopreservation: Results and Advances in the Technique.;3(1):17-25.
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85, 47–64.
- Yildiz, C., Kaya, A., Aksoy, M. y Tekeli, T. (2000). Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 54, 579-585.
- Zirena, N. (2014). Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación (Tesis de pregrado). UNMSM, Lima, Perú.