

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL
CUSCO**

FACULTAD DE AGRONOMIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



**“EVALUACIÓN DE CUATRO DILUTORES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN
DE SEMEN DE LLAMA (*Lama glama*) OBTENIDO POR
ELECTROEYACULACION”**

**Tesis presentada por el Bachiller en Ciencias
Agrarias FREDY SALAS CHAMPI.**

**Para Optar el Título Profesional de INGENIERO
ZOOTECNISTA.**

ASESOR:

Ing. Zoot. Dr. Lucio Enrique Ampuero Casquino

Ing. Zoot. Mgt. Aydee Meza Chatata

Ing. Zoot. Edison Ronny Cusiyunca Phoco

**PATROCINADO POR EL PROGRAMA DE FINANCIAMIENTO DE TESIS DE
PREGRADO YACHAYNINCHIS WIÑARINAPAQ - UNSAAC**

KAYRA- CUSCO - PERÚ

2023

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida y la vida de mis padres, por guiarme a lo largo de mi carrera, por iluminar mi camino y mi alma, por brindarme una vida llena de aprendizaje, experiencia sobre todo la felicidad.

A mis queridos padres Abdón y Albertha. Con todo mi cariño y amor por ser mi fortaleza, mi motivo, por darme ejemplo de superación, humildad y sacrificio. Mi carrera profesional, la herencia más valiosa que pudiera recibir, a ustedes mi agradecimiento incondicional.

Con mucho cariño a mis hermanos y hermanas: Vicente, Julio Cesar, Bertha, Vidal y Eva Lucia, con mucho aprecio, por estar ahí siempre en los momentos más necesitados, por apoyarmeddd en momentos difíciles y también por esos momentos buenos que compartimos y seguiremos compartiendo.

A mis sobrino y sobrinas, Josmel Cesar, Listh Licero, Luz Nelly y Lisbeth Xiomara por llegar a mi vida y llenar de alegría.

AGRADECIMIENTO

- Expresar mi agradecimiento y reconocimiento a todos y cada uno de los docentes de la Escuela Profesional de Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias, quienes contribuyeron con conocimientos y enseñanzas en mi formación profesional.
- De manera especial a mis asesores al Dr. Enrique Ampuero Casquino; Ing. Zoot. Mgt. Aydee Meza Chatata e Ing. Zoot. Édison Ronny Cusiyunca Phoco, por brindarme su apoyo, paciencia, sus enseñanzas y orientación desde el proceso de experimentación y culminación del presente trabajo de investigación.
- Al Mgt. Hernán Cucho Dolmos mi eterno agradecimiento, por brindarme su apoyo, sus consejos, enseñanzas y orientaciones hasta la culminación del presente de investigación.
- Al Ing. José Antonio Becerra Ccallo., Mvz. Nilthon Cárdenas Suarez y al Dr. Wilber García, por su amistad, enseñanzas y apoyo en el proceso experimental del presente trabajo de investigación.
- A todo el personal administrativo y técnico que labora en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) “La Raya - UNSAAC”, en especial a los Señores: Nico M., Pedro C., Fortunato C., Julio B., Efraín A y Héctor Q, quienes me brindaron su comprensión y apoyo incondicional.
- Gratitud y agradecimiento a mis amigos y compañeros de la Universidad del Código 2010: Wilber F., Andrés T., Fiorela G., Rosalio K., Samuel G., Mónica C., Sharit U., Ruth Cc y Yuri S.
- Un agradecimiento especial a compañeros tesisistas: Rosalio K., Efraín H., Abelardo M y Mónica C., por su apoyo total e incondicional durante el proceso experimental del presente trabajo de investigación.
- Y por último a mis amigos del colegio: Adolfo, Cesar, Rosvili y Alexander, por su amistad y consejos.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTO.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE ANEXOS	XII
GLOSARIO	XIII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.2. PROBLEMA GENERAL.....	4
1.3. PROBLEMAS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO II.....	5
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	5
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	5
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
2.3. JUSTIFICACIÓN	5
2.4. HIPOTESIS	6
CAPÍTULO III	7
MARCO TEÓRICO.....	7
3.1. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA LLAMA	7
3.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE LLAMA	7

3.3. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN DE LLAMA.....	8
3.3.1. COLECCIÓN DE SEMEN	8
3.3.2. ELECTROEYACULACIÓN (EE).....	8
3.4. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE LLAMA	9
3.4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	9
a. Volumen	9
b. Color seminal.....	9
c. pH.....	10
d. Filancia	11
3.4.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS.....	11
a. Motilidad	11
b. Parámetros cinéticos de la motilidad.....	12
c. Concentración espermática.....	14
d. Vitalidad espermática.....	15
e. Funcionalidad de la membrana espermática (HOST: Hipo - Osmotic Swelling Test).....	16
f. Integridad acrosomal	17
g. Morfometría espermática	18
3.5. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN	20
3.5.1. DEGELIFICACIÓN.....	21
3.5.2. DILUTORES	22
3.5.3. USO DE CRIOPROTECTORES	22
a. Glicerol	23
b. Dimetilformamida (DMFA).....	24
3.5.4. PROCESAMIENTO DE DILUCIÓN	24
3.6. ENFRIAMIENTO – REFRIGERADO.....	25
3.7. ADICIÓN DE CRIOPROTECTORES Y ENVASADO.....	25
3.8. PROCESO DE EQUILIBRADO, CONGELACIÓN Y ALMACENAMIENTO.....	26
3.9. DESCONGELACIÓN.....	27
CAPÍTULO IV.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1. DEL LUGAR DE ESTUDIO	31

4.1.1. ÁREA GEOGRÁFICA.....	31
4.1.2. DISPONIBILIDAD DE ALIMENTO.....	31
4.1.3. INSTALACIONES	32
4.1.4. DURACIÓN DEL ESTUDIO	32
4.2. MATERIALES Y EQUIPOS.....	32
4.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	32
4.2.2. MATERIALES Y EQUIPOS PARA LA COLECCIÓN DE SEMEN.....	32
4.2.3. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE LLAMA	33
4.2.4. MATERIALES DEL GABINETE.....	35
4.3. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO.....	35
4.3.1. SELECCIÓN DE ANIMALES.....	35
4.3.2. MÉTODO DE COLECCIÓN POR ELECTROEYACULACIÓN (EE).....	35
4.3.3. COLECCIÓN DE SEMEN	35
4.4. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE SEMEN DE LA LLAMA	39
4.4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	39
a. Volumen Seminal.....	40
b. Color Seminal	40
c. pH Seminal	40
d. Filancia seminal	41
4.4.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN	41
a. Motilidad espermática	41
b. Parámetros de la motilidad	42
c. Concentración Espermática	42
d. Vitalidad espermática.....	43
e. Funcionalidad de la Membrana Espermática (HOST)	44
f. Integridad Acrosomal	45
g. Morfometría Espermática.....	47
4.5. CRIOCONSERVACION DEL SEMEN DE LLAMA	48
4.5.1. TRATAMIENTO DEL SEMEN	48
4.5.2. DEGELIFICANTE.....	48
4.6. PREPARACIÓN DEL DILUTOR	49
4.7. ADICIÓN DE DILUTOR	49
4.8. DILUTORES DE CRIOPRESERVACIÓN PLANTEADOS	51

4.9. REFRIGERADO	51
4.10. ADICIÓN DEL CRIOPROTECTOR.....	51
4.11. EMPAJILLADO.....	52
4.12. EQUILIBRADO.....	52
4.13. CONGELACIÓN RÁPIDO.....	52
4.14. ALMACENADO	53
4.15. DESCONGELADO	53
4.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
4.16.1. DISEÑO ESTADÍSTICO.....	56
CAPÍTULO V.....	57
RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
5.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL SEMEN FRESCO.....	57
5.1.1. EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.....	57
a. Volumen seminal	57
b. Filancia seminal	58
c. pH seminal	58
d. Color seminal.....	58
5.1.2. EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	59
a. Motilidad total.....	59
b. Motilidad no progresiva (MNP).....	59
c. Motilidad progresiva (MP)	60
d. Parámetros de la motilidad	60
e. Concentración espermática	61
f. Vitalidad espermática.....	61
g. Integridad acrosomal	62
h. Funcionalidad de la membrana espermática (HOST).....	62
i. Morfometría espermática	63
5.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN REFRIGERADO	64
a. Motilidad total.....	64
b. Parámetros de la motilidad	65
c. Vitalidad espermática	66
d. Integridad acrosomal	67

e. Morfometría espermática	67
5.3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN DESCONGELADO	69
a. Motilidad total.....	69
b. Parámetros de la motilidad	69
c. Vitalidad espermática	71
d. Integridad acrosomal	72
e. Morfometría espermática	72
CAPÍTULO VI.....	75
CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO VII.....	76
RECOMENDACIONES	76
CAPÍTULO VIII.....	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Volumen seminal de llamas colectadas por electroeyaculación (EE).	9
Tabla 2. Color semen de llamas (%) colectado por electroeyaculación (EE).	10
Tabla 3. pH seminal de llamas colectado por electroeyaculación (EE).	10
Tabla 4. Filancia seminal de llamas colectado por electroeyaculación (EE).	11
Tabla 5. Motilidad espermática de llamas colectada por electroeyaculación (EE). ...	12
Tabla 6. Motilidad no progresiva y progresiva de llamas colectada por Electroeyaculación (EE).	12
Tabla 7. Parámetros cinéticos de velocidad espermática evaluada en ISAS.	13
Tabla 8. Parámetros cinéticos de espermatozoides de llamas colectadas por electroeyaculación (EE).	14
Tabla 9. Concentración espermática de llamas colectada por electroeyaculación (EE).	15
Tabla 10. Vitalidad espermática de llamas colectada por electroeyaculación (EE). .	16
Tabla 11. Porcentaje de reacción total al efecto del estrés hipoosmótico (50 mOsm) del semen de llama colectado por electroeyaculación (EE).	17
Tabla 12. Integridad de la membrana acrosomal del semen (promedio y Desviación Estándar) de llamas colectado por electroeyaculación (EE).	18
Tabla 13. Parámetros de morfometría espermática de alpaca según el ISAS.	19
Tabla 14. Parámetros de la región y forma de la cabeza de espermatozoides colectado por electroeyaculación (EE).	20
Tabla 15. Valores de motilidad, vitalidad e integridad acrosomal en semen refrigerado de llama y alpaca.	25
Tabla 16. Valores de parámetros cinéticos de velocidades de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado colectados por electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA).	26
Tabla 17. Valores de motilidad, vitalidad e integridad acrosomal en semen descongelado de llama y alpaca.	28
Tabla 18. Valores de parámetros cinéticos de velocidades de espermatozoides de alpaca en semen descongelado, colectados por electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA).	29

Tabla 19. Parámetros de evaluación morfológica del espermatozoide de alpaca en semen descongelado, colectados por electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA).	30
Tabla 20. Especies vegetales dominantes en el CICAS La Raya.	32
Tabla 21. Registro del peso, edades y medición de testículos de las llamas.	36
Tabla 22. Registro de aplicación anestésicos de llamas por electroeyaculación en llamas.....	38
Tabla 23. Insumos para la preparación del dilutor Base TRIS.....	49
Tabla 24. Crioprotector planteado para los cuatro dilutores.	51
Tabla 25. Volumen, filancia y pH de semen de llamas colectado por electroeyaculación.	57
Tabla 26. Color seminal de las llamas colectado por electroeyaculación.	58
Tabla 27. Motilidad total, motilidad no progresiva y motilidad progresiva de los espermatozoides en semen fresco de las llamas colectados por electroeyaculación.	59
Tabla 28. Parámetros de motilidad espermática en semen fresco de llamas colectados por electroeyaculación.	60
Tabla 29. Concentración espermática en semen fresco de las llamas obtenidas por electroeyaculación.	61
Tabla 30. Vitalidad, integridad acrosomal y funcionalidad de la membrana espermática en semen fresco de las llamas colectados por electroeyaculación.	62
Tabla 31. Parámetros de la morfometría espermática en semen fresco de llamas colectados por electroeyaculación.....	63
Tabla 32. Motilidad total en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	64
Tabla 33. Porcentaje de parámetros de la motilidad en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	65
Tabla 34. Vitalidad espermática en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	66
Tabla 35. Integridad acrosomal en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	67
Tabla 36. Porcentaje de parámetros morfológicos de la cabeza y forma de cabeza en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	68

Tabla 37. Porcentaje de motilidad total en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	69
Tabla 38. Parámetros de la motilidad en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	70
Tabla 39. Vitalidad espermática en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	71
Tabla 40. Integridad acrosomal en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	72
Tabla 41. Porcentaje de parámetros morfométricos de la cabeza y forma de cabeza en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parámetros cinéticos obtenidos por el sistema CASA.	13
Figura 2. Parámetros de evaluación morfometría del espermatozoide de llama (cabeza y pieza intermedia).	19
Figura 3. Medición testicular de las llamas.	37
Figura 4. Anestesiado para la sedación de llamas con Ketamina y Xylacina.	37
Figura 5. Limpieza de vía rectal y pene prepucio con agua bidestilada.	39
Figura 6. Evaluación de volumen seminal de llamas y evaluación de color seminal, se consideran tonalidades de blanco: lechoso (a) y cristalino (b).	40
Figura 7. Evaluación de pH seminal de llamas.	41
Figura 8. Medición de filancia seminal de llamas.	41
Figura 9. Análisis de la motilidad espermática en el equipo ISAS _(r) v 1.2.	42
Figura 10. Parámetros cinéticos de la motilidad.	42
Figura 11. Tinción Eosina-Nigrosina y vitalidad espermática, espermatozoides vivos (I) y muertos (II).	44
Figura 12. Espermatozoides expuestos a una reacción de stress hipoosmótica, espermatozoides con reacción fuerte (I), espermatozoides con reacción moderada (II) y espermatozoides sin reacción (III).	45
Figura 13. Integridad de la membrana espermática con la presencia de capuchón acrosomal (A) y con ausencia de capuchón acrosomal (B).	46
Figura 14. Espermatozoides capturados en el módulo de morfometría del ISAS.	48
Figura 15. Serie fotográfico sobre la criopreservación de semen de llama.	54
Figura 16. Flujoograma de la evaluación del semen de llama colectado por electroeyaculación.	55

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Serie fotográfico del sitio y materiales del laboratorio del centro experimental CICAS La Raya.....	90
Anexo 2. Reactivos para la preparación de dilutor base tris.	91
Anexo 3. Análisis de varianza y prueba de medias de las características microscópicas en muestra de semen refrigerado de llamas colectadas por electroeyaculación EE.....	92
Anexo 4. Análisis de varianza y prueba de medias de las características microscópicas en muestra de semen descongelado de llamas colectadas por electroeyaculación EE.....	99

GLOSARIO

ALH	: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza.
ANVA	: Análisis de varianza.
BCF	: Frecuencia de batida de la cabeza.
CASA	: Computer Assisted Sperm Analysis.
CFDA/PI	: Di acetato de fluoresceína/Yoduro de propidio.
CICAS	: Centro de investigación en camélidos sudamericanos.
CSA	: Camélidos sudamericanos.
CV	: Coeficiente de Variabilidad.
DBCA	: Diseño de bloques completamente al azar.
DMFA	: Demetilformamida.
DS	: Desviación estándar.
EE	: Electroeyaculación.
FITC-PNA	: Isotiocinato de fluorescencia. Arachis hipogea aglutinina.
GLI	: Glicerol.
HOST	: Hipoosmotic swelling test.
Hz	: Hertz.
ISAS	: Sistema integrado de análisis de semen.
LIN	: Índice de linealidad.
MNP	: Motilidad no progresiva.
mOsm	: Miliosmoles.
MP	: Motilidad progresiva.
MT	: Motilidad total.
SAS	: Statistical analysis system.
STR	: Índice de rectitud.
VA	: Vagina artificial.
VAP	: Velocidad media.
VCL	: Velocidad curvilínea.
VSL	: Velocidad rectilínea.
WOB	: Índice de oscilación.

RESUMEN

El presente estudio “Evaluación de cuatro dilutores para la criopreservación de semen de Llama (*Lama glama*) obtenido por electroeyaculación”, fue realizado en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos (CICAS) - La Raya, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, fue efectuado entre enero 2019 a diciembre 2020, con el objetivo de determinar la evaluación de cuatro dilutores de criopreservación de semen de llama (*Lama glama* L.) obtenido por electroeyaculación; se realizaron dos colectas por cada una de las ocho llamas machos por el método de electroeyaculación. El semen fue degelificada con papaína (1/2:1), inhibidor (1:1) evaluándose el semen fresco, se diluyeron con dilutor a base tris y refrigeradas por 2,5 horas a la temperatura de 5 °C, se divide en cuatro partes iguales las muestras y se añadió los dilutores glicerol 5 % y 7 %; dimetilformamida 7 % y 9 %, momento en que se evaluaron los dilutores. La última evaluación seminal se realizó después del descongelamiento de muestras conservadas durante 30 días en Nitrógeno líquido. Los resultados de las evaluaciones seminales en semen fresco: volumen seminal tuvo una media de 3,69 ml \pm 0,75 ml; color seminal (blanco cristalino 75 % y blanco lechoso 25 %); pH seminal tiene una media de 7,34 \pm 0,24; filancia de 3,53 cm \pm 0,54 cm. la motilidad total fue de 43,28 % \pm 15,15 %; concentración de 72,92 (10^6 /ml) \pm 35,33 (10^6 /ml); vitalidad de 68,44 % \pm 4,56 %; integridad acrosomal de 77,31 % \pm 6,13 %; funcionalidad de la membrana espermática de 65,84 % \pm 7,09 %; parámetros de la morfometría (longitud 5,90 μ m \pm 0,35 μ m; ancho 3,30 μ m \pm 0,12 μ m; área 16,04 μ m² \pm 1,02 μ m²; perímetro 17,58 μ m \pm 0,71 μ m; porcentaje acrosomal 40,85 \pm 3,82). En semen refrigerado, se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para la motilidad total, vitalidad, mientras que la integridad acrosomal y morfometría, no se encontró diferencias ($p > 0,05$) en los cuatro protocolos propuestos, siendo el dilutor 1 (glicerol 5 %) el que presentó mejores resultados. En muestras descongeladas, se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para los parámetros cinéticos, vitalidad y morfometría, pero la motilidad total, integridad acrosomal y morfometría no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$), pero en general los mejores resultados dieron el dilutor 1 (glicerol 5 %), siendo superior a los dilutores 2 (glicerol 7 %), dilutor 3 (dimetilformamida 7 %) y dilutor 4 (dimetilformamida 9 %).

Palabras clave: Dilutor; Criopreservación; Llamas.

ABSTRACT

The present study "Evaluation of four extenders for the cryopreservation of Llama (*Lama glama*) semen obtained by electroejaculation", was carried out at the South American Camelid Research Center (CICAS) - La Raya, of the National University of San Antonio Abad del Cusco, was carried out between January 2019 and December 2020, with the objective of determining the evaluation of four cryopreservation dilutors of llama semen (*Lama glama* L.) obtained by electroejaculation; two collections were made for each of the eight male llamas per the electroejaculation method. The semen was degelled with papain (1/2:1), inhibitor (1:1), evaluating the fresh semen, diluted with a tris-based diluter and refrigerated for 2.5 hours at a temperature of 5 °C, divided into four equal parts the samples and the diluents glycerol 5% and 7% were added; dimethylformamide 7% and 9%, when the diluters were evaluated. The last semen evaluation was performed after thawing of samples stored for 30 days in liquid Nitrogen. The results of the seminal evaluations in fresh semen: seminal volume had a mean of 3.69 ml \pm 0.75 ml; seminal color (75% crystalline white and 25% milky white); Seminal pH has an average of 7.34 \pm 0.24; fiance of 3.53 cm \pm 0.54 cm. total motility was 43.28% \pm 15.15%; concentration of 72.92 (106/ml) \pm 35.33 (106/ml); vitality of 68.44% \pm 4.56%; acrosomal integrity of 77.31% \pm 6.13%; functionality of the spermatic membrane of 65.84% \pm 7.09%; morphometry parameters (length 5.90 μ m \pm 0.35 μ m; width 3.30 μ m \pm 0.12 μ m; area 16.04 μ m² \pm 1.02 μ m²; perimeter 17.58 μ m \pm 0.71 μ m; percentage acrosomal 40.85 \pm 3.82). In refrigerated semen, significant differences ($p < 0.05$) were found for total motility, vitality, while acrosomal integrity and morphometry, no differences were found ($p > 0.05$) in the four proposed protocols, being the extender 1 (glycerol 5%) the one that presented the best results. In thawed samples, significant differences ($p < 0.05$) were found for the kinetic parameters, vitality and morphometry, but no significant differences were found for total motility, acrosomal integrity and morphometry ($p > 0.05$), but in general the best results were given by diluter 1 (glycerol 5%), being superior to diluters 2 (glycerol 7%), diluter 3 (dimethylformamide 7%) and diluter 4 (dimethylformamide 9%).

Key words: Diluter; cryopreservation; Calls.

INTRODUCCIÓN

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

Según Fernández-Baca y Calderón, (1966); Sumar y Leyva, (1981); Bravo *et al.*, (1997), mencionan que la congelación de semen es una biotecnología reproductiva muy poco empleada en camélidos sudamericanos por la dificultad en la colección de semen y en el manejo de las muestras seminales, debido a su alta viscosidad, y el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados. Estos factores imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación con resultados óptimos de calidad espermática al descongelar; esto determina que la inseminación artificial quede restringida al uso de semen fresco, asimismo se tiene que considerar la baja concentración de espermatozoides y el alto porcentaje de anormales que, como características usuales del semen de alpaca, aumentan la dificultad de obtener parámetros espermáticos post-descongelamiento adecuados que permitan la reproducción.

Las investigaciones referentes a la congelación de semen de camélidos sudamericanos no obtuvieron resultados alentadores con respecto a la calidad seminal post-descongelamiento. En llamas se obtuvo solo un 10 % de motilidad al descongelamiento de semen colectado por electroeyaculación (McEvoy *et al.*, 1992).

Según Von Baer y Hellemann, (1999), describen motilidades entre 16 y 28 % en semen descongelado de llama, probando la adición de un surfactante al 0,5 % (Equex).

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante Inseminación Artificial (IA), ha causado gran impacto en la reproducción animal, debido a que favorece el comercio nacional e internacional de razas o líneas genéticas y formación de bancos de germoplasma (Aller *et al.*, 2003).

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

CAPÍTULO I

PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Escasos trabajos de inseminación artificial han sido publicados hasta el presente en camélidos sudamericanos, debido quizás a la falta de una metodología fiable de recolección de semen y a las características seminales de alta viscosidad, baja motilidad, baja concentración espermática (Fowler, 1989) y la falta de conocimiento sobre el uso de dilutores (Bustinza, 2001).

Uno de los trabajos reportados en crio preservación de semen de camélidos sudamericanos usando semen de alpaca, obtuvo un porcentaje de motilidad post congelamiento de 46,7 % y en llama 45 %, estas, las mayores tasas obtenidas hasta la fecha; sin embargo, no ha sido posible reproducir la metodología (Bravo *et al.*, 1996). Así también tenemos un estudio realizado con semen obtenido por electroeyaculación y diluido con Tris – Yema huevo – Glicerol, con este, solo pudo obtenerse un 10 % de motilidad post descongelamiento (McEvoy *et al.*, 1992).

El uso de etilenglicol como agente crioprotector ha sido reportado, permitiendo una tasa de motilidad post descongelamiento del 20 % (Santiani *et al.*, 2005). A pesar de estos resultados a la fecha no se han reportado estudios que nos permitan señalar la factibilidad de congelar semen de camélidos; Posiblemente, como sucede con otras especies, no va a ser fácil congelar semen, más aún si a las dificultades de contar con un dilutor apropiado, hay que considerar los altos porcentajes de anomalías presentes en los eyaculados (Huanca *et al.*, 2007); por lo que se necesitan nuevas investigaciones que permitan el desarrollo de protocolos de criopreservación de semen, para que se puedan aplicar las biotecnologías reproductivas (IA) en camélidos, por el momento restringido al uso de semen fresco diluido y utilizado inmediatamente, reportando resultados próximos al 50 %.

1.2. PROBLEMA GENERAL

¿Cuáles son los mejores dilutores para la criopreservación de semen de llama empleando una curva de congelación rápida, de la colecta de semen por electroeyaculación?

1.3. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

- a. ¿Cuáles serán las características macroscópicas y microscópicas del semen de llama obtenido por el método de colección por electroeyaculación?
- b. ¿Cuáles serán los dilutores de criopreservación de semen de llama colectado por electroeyaculación?
- c. ¿Aplicando los 4 dilutores para la criopreservación en semen de llama mejoraran las características microscópicas de las muestras, después del descongelamiento?
- d. ¿Qué efectos causara en los espermatozoides cada uno de los dilutores planteados?

CAPÍTULO II

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar cuatro dilutores para la criopreservación de semen de llama (*Lama glama* L.) obtenido por electroeyaculación.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Evaluar las características macroscópicas (volumen, color, pH, filancia) y microscópicas (motilidad, concentración espermática, vitalidad, funcionalidad de la membrana espermática, integridad acrosomal, morfometría) del semen de llama en fresco colectado por electroeyaculación.
- b) Evaluar las características microscópicas (motilidad, vitalidad, integridad acrosomal, morfometría) del semen refrigerado sometido a cuatro protocolos de criopreservación colectado por electroeyaculación.
- c) Evaluar las características microscópicas (motilidad, vitalidad, integridad acrosomal, morfometría) del semen descongelado sometido a cuatro protocolos de criopreservación empleando una curva de congelación rápida y que fue colectado por electroeyaculación.

2.3. JUSTIFICACIÓN

La región del Cusco, es la segunda productora de llamas a nivel nacional con alrededor de 122,000 ejemplares (INEI, 2012); en 9,900 unidades familiares, la mayor parte en las denominadas provincias altas del Cusco. La población de la región representa el 16,3 % de la población nacional, por lo que su aporte a la economía de las familias que las crían es importante.

Según Solís, (1997), en los camélidos sudamericanos la colección de semen tiene grandes dificultades como: la duración y posición de la cópula, el lugar de depósito del semen y el tipo de eyaculación, así como el aspecto del eyaculado, su extrema

viscosidad y la dificultad de su manejo hizo que durante varias décadas se investigue una técnica óptima para poder extraer muestras seminales y poder manejar las células espermáticas sin que estos pierdan su capacidad fecundativa. Por lo tanto, es necesario el estudio complementario tanto de parte reproductiva y biológica de la llama (*Lama glama* L.), incluyendo en estos estudios el comportamiento sexual del macho, características seminales y la criopreservación.

El conocimiento de la fisiología espermática de la llama, aún no se ha determinado, si existen varios protocolos, o cuál es la tasa de capacitación espermática espontánea, en el semen colectado por diferentes métodos. Por esta razón, se planteó el presente trabajo de investigación denominado “Evaluación de cuatro dilutores para la criopreservación de semen de llama (*Lama glama* L.) obtenido por electroeyaculación”, se espera aportar datos de las características macroscópicas y microscópicas y también acerca de los dilutores de criopreservación de semen de llama, de esta manera aportar información para futuras investigaciones.

2.4. HIPOTESIS

“La aplicación de los dilutores para la criopreservación de semen de llama (*Lama glama* L.) obtenido por electroeyaculación, tienen efecto sobre las características microscópicas de las muestras de semen procesadas con estas”.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO

3.1. CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS DE LA LLAMA

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

3.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE LLAMA

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

3.3. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN DE LLAMA

3.3.1. COLECCIÓN DE SEMEN

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

3.3.2. ELECTROEYACULACIÓN (EE)

El uso del método de electroeyaculación para la colección de semen de camélidos (llamas) se utiliza aplicando voltajes de 15 voltios (V). Iniciando desde 0,5 V hasta llegar a 10 V y ascendiendo cada 0,5 V gradualmente. 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 (Valle, 2013). Implica tranquilizar al animal por vía intravenosa con una mezcla de xylacina, en dosis de 0,2 ml/kg y de ketamina 1,5 ml/kg. La colección se realiza con el animal acostado; la sonda del electroeyaculador consta de tres electrodos, la cual es introducida sobre la próstata, cuya profundidad es evaluada por medio de un transductor ecográfico (Giuliano *et al.*, 2008).

La estimulación ocurre mediante impulsos eléctricos de 0,5 V inducidos a intervalos de 1 segundo durante 3 segundos; el voltaje se va incrementando gradualmente de 2 a 15 V en 6 a 12 minutos. En esta colección se evita la formación de espuma, como ocurre en el método de vagina artificial. El uso de la electroeyaculación para la colección de semen de alpacas, utilizando un equipo de fabricación nacional, con una intensidad máxima de 40 V, 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; también se utilizó esta técnica para obtener semen de vicuñas y paco vicuñas (híbrido cruce de alpaca con vicuña) (Fernández-Baca y Calderón, 1966).

3.4. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE LLAMA

3.4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

a. Volumen

El volumen de semen varía según el estado fisiológico del macho, edad, raza, alimentación, frecuencia de colección, preparación psicosexual y por el método de colección (vagina artificial, funda vaginal, esponja vaginal, fistula uretral, electroeyaculación, bulbouretrorromización, desviación del conducto deferente y otros). Existe una variabilidad de volumen de eyaculado obtenido dentro de un mismo método de colecta, como se puede observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Volumen seminal de llamas colectadas por electroeyaculación (EE).

Autor	Media \pm DS (ml)
Casaretto <i>et al.</i> , (2012)	3,82 \pm 2,19
Fumuso <i>et al.</i> , (2020)	3,90 \pm 2,70
Ccoiso (2019)	3,63 \pm 1,64
Gallegos (2019)	3,80 \pm 0,80
Laruta <i>et al.</i> , (2016)	1,67 \pm 0,29
Rodríguez (2013)	1,60 \pm 0,60
Carretero <i>et al.</i> , (2012)	2,80 \pm 1,19

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar.

b. Color seminal

Rodríguez, (2013) menciona que la evaluación del color por el método electroeyaculación en llamas, por observación directa en el tubo colector falcón indica que existe variabilidad en el color de semen que depende de la concentración espermática y del método de colección, como se indica en la siguiente Tabla 2.

Tabla 2. Color semen de llamas (%) colectado por electroeyaculación (EE).

Autor	Color
Rodríguez (2013)	Blanco lechoso 73,4 %; blanco cremoso 13,3 % y blanco cristalino 13,3 %
Gallegos (2019)	Blanco cristalino brillante 56,3 %; Blanco lechoso 34,4 % y Gris 9,4 %
Ccoiso (2019)	Blanco cristalino 80 % y Blanco lechoso 20 %
Ordoñez <i>et al.</i> , (2013)	Blanco lechoso claro a blanco lechoso medio

Fuente: Varios autores.

c. pH

El pH aproximado de semen es de aproximadamente 7 (de 6,9 a 7,5 para las diferentes especies), cae en límites de actividad óptima de la mayoría de las enzimas del espermatozoide. Por lo tanto, si se mantiene un pH neutro (7,0) se espera una tasa metabólica elevada. Si el pH del semen se desvía hacia la alcalinidad o hacia la acidez, se reducirá el índice metabólico (Sumar, 1991). La investigación en esta área establece la importancia de diluir el semen en un medio amortiguado que resista los cambios de pH, de manera que se pueda mantener la vida máxima fértil del espermatozoide. (Bearden y Fuquay, 1980).

Tabla 3. pH seminal de llamas colectado por electroeyaculación (EE).

Autor	Media ± DS
Valle (2013)	7,08
Ccoiso (2019)	7,25 ± 0,48
Gallegos (2019)	7,00 ± 0,10
Bravo <i>et at.</i> , (1995)	7,50 a 8,50
Quispe y Delgado (2012)	7,70
Fowler (1998)	7,20 a 8,60

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar, pH: potencial de hidrogeniones.

El pH de semen de la alpaca está comprendido entre 7,1 y 8,3 y el de la llama entre 7,2 y 8,6 (como se indica en la Tabla 3). En llamas el pH fue determinado utilizando tiras de papel con un rango de $\pm 0,5$ (Aller *et al.*, 2003).

d. Filancia

La filancia se define como la capacidad de formación de hilo y es, por lo tanto, una característica reológica diferente a la viscosidad. La formación de hilo no refleja la viscosidad del semen, sino que se está evaluando la filancia del mismo reportado por (Giuliano *et al.*, 2012). La evaluación de la filancia de semen colectado por electroeyaculación se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Filancia seminal de llamas colectado por electroeyaculación (EE).

Autor	Media \pm DS (mm)
Ccoiso (2019)	3,63 \pm 0,93
Gallegos (2019)	3,70 \pm 0,64

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar.

3.4.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

a. Motilidad

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

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

Tabla 5. Motilidad espermática de llamas colectada por electroeyaculación (EE).

Autor	Media ± DS (%)
Casaretto <i>et al.</i> , (2012)	34,40 ± 25,80
Ccoiso (2019)	44,68 ± 18,93
Gallegos (2019)	44,90 ± 19,10
Quispe y Delgado (2012)	66,50
Carretero <i>et al.</i> , (2020)	22,00 ± 10,90
Casaretto <i>et al.</i> , (2011)	38,53 ± 28,50
Carretero <i>et al.</i> , (2012)	28,20 ± 19,30

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar.

La motilidad individual de la llama es lenta, lineal y rotatoria, es decir que la motilidad espermática de la llama es en mayor porcentaje de movimientos no progresivos y estáticos en relación al porcentaje de los motiles progresivos de un mismo eyaculado, que es siempre menor, por el carácter filante que presenta el semen de la llama (Rodríguez, 2013). Se tiene reportes de motilidad progresiva y no progresiva en muestras colectadas en llamas, los cuales se indican en la Tabla 6.

Tabla 6. Motilidad no progresiva y progresiva de llamas colectada por Electroeyaculación (EE).

Autor	MNP	MP
	Media ± DS (%)	Media ± DS (%)
Rodríguez (2013)	12,70 ± 2,20	1,20 ± 2,20
Ccoiso (2019)	43,15 ± 18,31	1,53 ± 0,83
Valle (2013)	54,66	-
Giuliano <i>et al.</i> , (2010)	4,40 ± 10,43	-

Fuente: Varios autores.

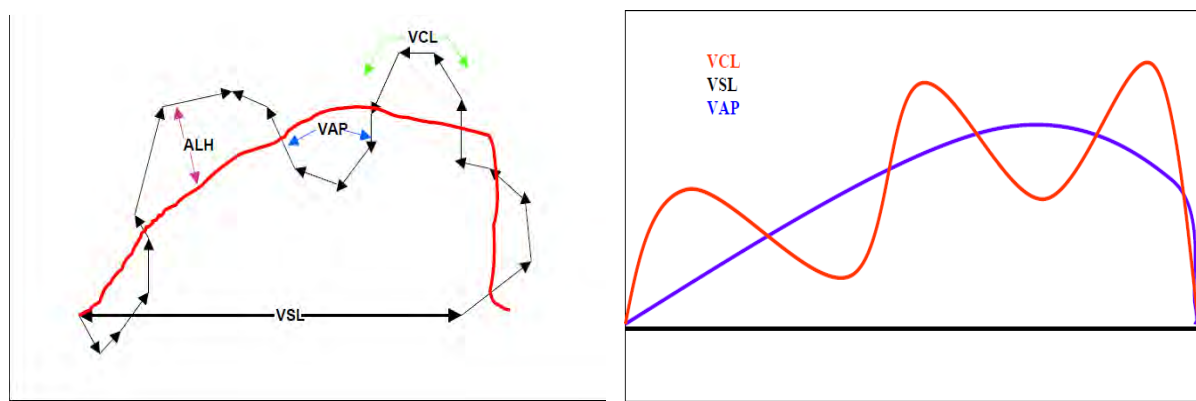
Leyenda: DS: Desviación estándar.

b. Parámetros cinéticos de la motilidad

El modelo de motilidad del ISAS® realiza un análisis automático de la motilidad y la concentración espermática en tiempo real; además el sistema ofrece una amplia gama de parámetros cinéticos de velocidad (PROISER, 2010), tales como se indica en la

Figura 1 y Tabla 7. Se tiene reportes por diferentes autores; pero, por el mismo método de colección (EE) los cuales podemos observar en la Tabla 8.

Figura 1. Parámetros cinéticos obtenidos por el sistema CASA.



Fuente: Quintero (2003).

Tabla 7. Parámetros cinéticos de velocidad espermática evaluada en ISAS.

PARÁMETROS	UNIDAD	DESCRIPCIÓN
Velocidad curvilínea (VCL)	$\mu\text{m/s}$	Velocidad promedio de desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
Velocidad rectilínea (VSL)	$\mu\text{m/s}$	Velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta.
Velocidad media (VAP)	$\mu\text{m/s}$	Velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria.
Índice de linealidad (LIN)	%	Relación porcentual entre la VSL y VCL.
Índice de rectitud (STR)	%	Relación porcentual entre la VSL y VAP.
Índice de oscilación (WOB)	%	Relación porcentual entre la VAP y VCL.
Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH)	μm	Desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
Frecuencia de batido de la cabeza (BCF)	Hz	frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la línea en función del tiempo.

Fuente: Quinteros - Moreno (2003).

Leyenda: $\mu\text{m/s}$: Micrómetros por segundo; Hz: Hertz.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de espermatozoides de llamas colectadas por electroeyaculación (EE).

Variable	Ccoiso (2019)	Rodríguez (2013)
	Media ± DS	Media ± DS
VCL (µm/s)	60,82 ± 11,47	36,90 ± 8,80
VSL (µm/s)	13,20 ± 2,12	8,00 ± 2,30
VAP (µm/s)	28,75 ± 3,88	18,50 ± 3,30
LIN (%)	22,12 ± 4,75	22,20 ± 5,50
STR (%)	45,63 ± 4,57	43,00 ± 8,20
WOB (%)	48,01 ± 5,78	51,60 ± 9,70
ALH (µm)	3,18 ± 0,71	1,00 ± 0,80
BCF (Hz)	3,68 ± 1,20	1,80 ± 1,80

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad media; LIN: Índice de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación; ALH: Índice de oscilación.

c. Concentración espermática

La concentración espermática es importante para determinar la cantidad de hembras a inseminar con un número óptimo de espermatozoides. Las diversas glándulas accesorias y la secreción de la testosterona por los testículos determinan la concentración espermática. La concentración espermática es diferente estadísticamente entre llamas, teniendo en general de 65×10^6 espermatozoides por ml, estos rangos se deben esencialmente a la influencia del efecto de eyaculaciones sucesivas (Fernández y Novoa, 1968). La concentración espermática varía de acuerdo al método utilizado en la colección del semen, así se tiene que los investigadores van encontrando concentraciones que varían desde $7,78 \times 10^4/\text{mm}^3$ (Pacheco, 1996), además se tiene los reportes de los autores indicados en la Tabla 9.

Tabla 9. Concentración espermática de llamas colectada por electroeyaculación (EE).

Autor	Media \pm DS (10^6/ml)
Laruta <i>et al.</i> , (2016)	39,14 \pm 11,22
Ccoiso (2019)	101,71 \pm 39,52
Gallegos (2019)	97,14 \pm 44,22
Rodríguez (2013)	84,39 \pm 71,22
Fumuso y Giuliano (2018)	98,00 \pm 75,00
Casaretto <i>et al.</i> , (2012)	78,43 \pm 101,48
Carretero <i>et al.</i> , (2009)	148,40 \pm 164,40

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar.

d. Vitalidad espermática

Los espermatozoides vivos no permiten el ingreso de colorantes supra vitales, mientras que los muertos los absorben; es decir la membrana espermática representa una barrera al paso de las mencionadas tinciones al medio celular. Son varios los colorantes que pueden usarse para la determinación de la vitalidad. Éstos, en su mayoría, son mezclas de eosina y algún colorante de contraste, siendo las más usadas las combinaciones Eosina-nigrosina y Eosina-verde resistente (Sorensen, 1991).

Según Quispe, (1987) clasificó las células espermáticas en vivos y muertos, indicando que una buena motilidad tiene más del 60 % de espermatozoides vivos, mientras que la motilidad regular esta entre 40 a 60 % y motilidad baja con 40 % de espermatozoides vivos en semen colectado de alpaca, también se tiene reportes de vitalidad espermática en llamas colectadas por el método de electroeyaculación (Tabla 10).

Tabla 10. Vitalidad espermática de llamas colectada por electroeyaculación (EE).

Autor	Media \pm DS (%)	Tinción
Casaretto <i>et al.</i> , (2012)	52,24 \pm 17,98	CDFA/PI
Ccoiso (2019)	64,56 \pm 13,54	Eosina y Nigrosina
Laruta <i>et al.</i> , (2016)	86,67 \pm 5,77	Eosina-Nigrosina
Giuliano <i>et al.</i> , (2010)	60,22 \pm 12,57	CFDA/PI
Fumuso y Giuliano (2018)	62,10 \pm 11,60	CFDA/PI

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar, CDFA/PI: Di acetato de fluoresceína/Yoduro de propidio.

e. Funcionalidad de la membrana espermática (HOST: Hipo - Osmotic Swelling Test)

La prueba de endosmosis (Hypo-Osmotic Swelling Test, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo, para que esta respuesta se produzca la membrana plasmática del espermatozoide debe estar integra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (Jeyendran *et al.*, 1984). La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo, las células con la membrana funcionalmente dañada no experimentan cambios en la forma del flagelo (Quinteros, 2003). Así se tiene reporte por diferentes autores en espermatozoides de llamas colectado por el método de electroeyaculación como se puede observar en la Tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje de reacción total al efecto del estrés hipoosmótico (50 mOsm) del semen de llama colectado por electroeyaculación (EE).

Autor	Media \pm DS (%)
Flores (2014)	40,06 \pm 12,17
Ccoiso (2019)	57,33 \pm 8,91
Rodríguez (2013)	38,20 \pm 7,20
Giuliano <i>et al.</i> , (2010)	42,35 \pm 15,03
Fumuso y Giuliano (2018)	34,00 \pm 10,50

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar.

f. Integridad acrosomal

La evaluación de la integridad acrosomal ha sido estudiada en distintas especies domésticas, incluidos los Camélidos Sudamericanos (CSA), por su importancia en la fecundación (Ugarelli *et al.*, 2015). La reacción acrosomal es un proceso exocitótico que consiste en la fusión del acrosoma con la membrana plasmática, resultando en la exposición y liberación del contenido acrosomal al medio extracelular permitiendo que se realice la fecundación del ovocito (Ramalho-Santos *et al.*, 2002). La liberación del contenido acrosomal se lleva a cabo cuando el espermatozoide entra en contacto con mecanismos de señalización que se encuentra en la zona pelúcida (Harrison, 1998) y esta mediado por la progesterona, además de estar regulado por el incremento intracelular de calcio (Patrat *et al.*, 2000).

En la llama se ha utilizado la tinción con Coomassie Blue para evaluar la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal (Giuliano *et al.*, 2012), además se utilizaron otras tinciones los autores ya mencionados como se muestra en la Tabla 12.

Tabla 12. Integridad de la membrana acrosomal del semen (promedio y Desviación Estándar) de llamas colectado por electroeyaculación (EE).

Autor	Media \pm DS (%)	Tinción
Fumuso <i>et al.</i> , (2014)	81,51 \pm 10,95	Coomasie blue
Ccoiso (2019)	59,33 \pm 7,16	Coomasie blue
Carretero <i>et al.</i> , (2014)	48,30 \pm 10,20	Coomasie blue
Fumuso y Giuliano (2018)	96,80 \pm 3,60	FITC-PNA/PI
Carretero <i>et al.</i> , (2015)	64,44 \pm 13,60	FITC-PNA

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar; FITC-PNA/PI: Isotiocianato de fluoresceína. Arachis hipogea aglutinina/yoduro de propidio.

g. Morfometría espermática

Los análisis de morfometría asistido por computadora (CASA) han sido desarrollados correctamente la forma y dimensiones de la cabeza del espermatozoide (Martí *et al.*, 2011). Estos programas han sido mostrados para ser precisos y repetibles, y revelan diferencias sutiles entre individuos que no pueden ser detectados con métodos subjetivos (Martí *et al.*, 2011).

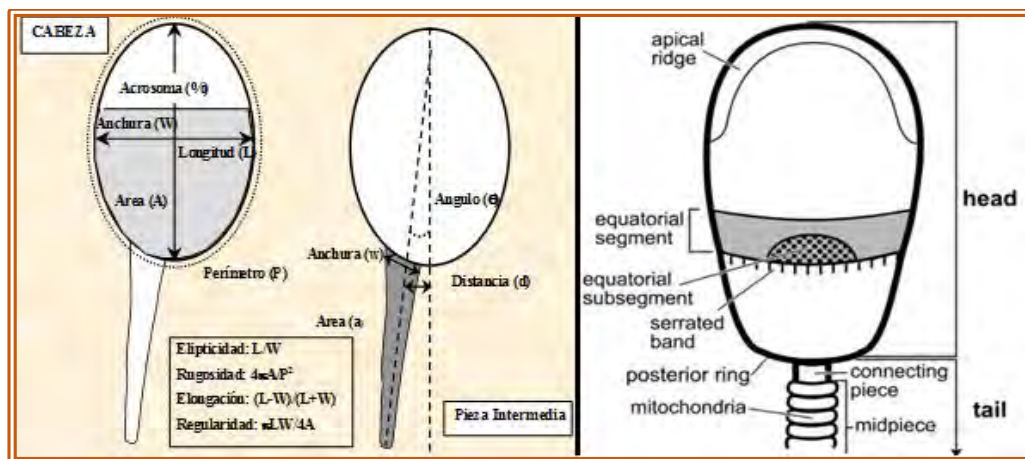
El módulo de morfometría del ISAS realiza un análisis automático de la morfología y la morfometría espermática a partir de muestras teñidas; además el análisis morfométrico que realiza en el ISAS® CASA aporta un total de 14 parámetros como: tamaño (longitud, anchura, perímetro y área) y forma de la cabeza (elipticidad, elongación, rugosidad, y regularidad), porcentaje del acrosoma, nivel de color de la cabeza, tamaño (área y anchura) e inserción de la pieza intermedia (ángulo y distancia) (Soler *et al.*, 2005), como se muestra en la Figura 2 y Tabla 13.

Tabla 13. Parámetros de morfometría espermática de alpaca según el ISAS.

Cabeza	Pieza intermedia (P.I)	Forma de la cabeza/formula
Longitud (L) (μm)	Nivel De Gris (%)	Elipticidad L/W
Ancho (W) (μm)	Anchura de la P. I	Rugosidad $4\pi A/P^2$
Área (A) (μm^2)	Área De la P. I	Elongación $(L-W)/(L+W)$
Perímetro (P) (μm)	Distancia de inserción de la P. I	Regularidad $\pi LW/4^a$
% de Acrosoma	Angulo de Inserción de la P. I	

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

Figura 2. Parámetros de evaluación morfometría del espermatozoide de llama (cabeza y pieza intermedia).



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

Se ha caracterizado la morfometría de los espermatozoides de llama, para ello uso la tinción 15 y un sistema de análisis integrado de análisis de semen. (Casaretto *et al.*, 2011); pero, algunos autores reportan los parámetros evaluados en llamas como podemos observar en la Tabla 14.

Tabla 14. Parámetros de la región y forma de la cabeza de espermatozoides colectado por electroeyaculación (EE).

Autores		Gallegos (2019)	Casaretto (2011)	Soler <i>et al.</i> , (2014)
Métodos		EE	EE	VA
Región	Parámetros	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
Cabeza forma de cabeza	Longitud (µm)	5,23 ± 0,39	6,60 ± 3,83	5,50 ± 0,70
	Ancho (µm)	3,10 ± 0,27	4,14 ± 2,78	3,40 ± 0,40
	Área (µm ²)	13,55 ± 1,61	20,09 ± 2,75	13,20 ± 2,80
	Perímetro (µm)	16,61 ± 1,43	18,54 ± 0,47	14,10 ± 1,60
	% de Acrosoma	51,67 ± 6,23	-	-
	Elipticidad	1,70 ± 0,16	-	0,20 ± 0,10
	Rugosidad	0,62 ± 0,07	1,28 ± 3,70	0,90 ± 0,10
	Elongación	0,26 ± 0,04	1,59 ± 1,02	-
	Regularidad	0,94 ± 0,05	-	1,10 ± 0,10

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar, VA: Vagina artificial.

3.5. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN

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

Según Woods *et al.*, (2004) menciona que la criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad 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. Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar.

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

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

Aller, JF y Col (2003), congelan semen a una concentración mínima de 75 millones de espermatozoides/ml con 50 % de motilidad individual. El dilutor fue yema de huevo, citrato, glucosa, glicerol, DMSO (Dimetil Sulfoxido) y antibióticos. El diluyente básico fue dividido en dos fracciones; la fracción A sin glicerol ni DMSO y la fracción B contenían dos veces la concentración final deseada de glicerol (6 %) y DMSO (8 %). Cada muestra de semen fue diluida con la fracción A (sin crioprotectores) a 35 °C, hasta la mitad del volumen final calculado y enfriado hasta 5 °C a una tasa de 0,25 a 0,50 °C minuto y luego la fracción B fue adicionada en dos pasos con 15 minutos de intervalo.

3.5.1. DEGELIFICACIÓN

El semen altamente viscoso no se homogeniza uniformemente con crio-diluyentes, al mezclar, evitando el contacto adecuado entre los crioprotectores y la membrana del esperma durante la congelación (Kershaw-Young *et al.*, 2012). Por lo tanto, es necesario reducir la viscosidad del plasma seminal sin afectar la función de los espermatozoides antes de la congelación para mejorar el éxito y mejorar el desarrollo de los protocolos de criopreservación en los camélidos (Kershaw-Young *et al.*, 2012).

La alta viscosidad es común en el semen de los camélidos. Esto representa un desafío más para realizar estudios como la evaluación de las características microscópicas y

desarrollar la inseminación artificial. Muchas investigaciones citan la viscosidad natural del semen de los camélidos como el principal obstáculo que impide el desarrollo de la conservación y la inseminación artificial (Morton *et al.*, 2008).

Los investigadores han intentado reducir o eliminar esta viscosidad por medios mecánicos o enzimáticos (Bravo *et al.*, 1999; Giuliano *et al.*, 2010) sin embargo, no han podido determinar la causa subyacente de la viscosidad. En consecuencia, se ha utilizado un enfoque aleatorio mediante el cual se han probado una serie de proteasas y enzimas. Se ha logrado cierto éxito con la colagenasa en la que se eliminó la viscosidad y se mantuvo la función del espermatozoide en llamas (Giuliano *et al.*, 2010) y alpacas (Bravo *et al.*, 1999). Sin embargo, otros investigadores han documentado un efecto perjudicial de la colagenasa en alpacas (Morton *et al.* 2008) y no se ha evaluado la capacidad de crio conservar los espermatozoides tratados con colagenasa.

3.5.2. DILUTORES

Según Carballo, (2009), por diluyentes se entiende que es una solución acuosa que permite incrementar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, para preservar las características funcionales de las células espermáticas y mantener el nivel de fertilidad adecuado.

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

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

3.5.3. USO DE CRIOPROTECTORES

En los medios de congelación se incluyen sustancias crioprotectoras, que se pueden dividir en no permeables (azúcares, proteínas y lipoproteínas, que se adicionan

mediante el uso de productos naturales como la yema de huevo y la leche descremada) y permeables siendo el glicerol el más utilizado. Estas sustancias crioprotectoras van a minimizar los daños que se producen durante el proceso de enfriamiento, congelación y descongelación (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

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

Usando 6 % de glicerol y 8 % de dimetilsulfoxido en la congelación de semen de llama, obtuvo resultados de 20,4 % post descongelado con una motilidad individual de 54,3 % en semen fresco (Aller *et al.*, 2003).

a. Glicerol

El glicerol (GL) ha sido extensamente usado en la criopreservación de varios tipos de células, incluyendo el esperma mamífero (Rasul *et al.*, 2007). 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 intracelular disponible para congelarse; pero, manteniendo el volumen celular (Rasul *et al.*, 2007), lo que evita el colapso de las células por una deshidratación excesiva (Medeiros *et al.*, 2002). Además, tienen la función de evitar la formación intracelular de cristales de hielo, así como evitar la excesiva deshidratación causada por la congelación lenta (Medeiros *et al.*, 2002).

El glicerol tiene tres grupos hidroxilo (OH) cuyos átomos de hidrógeno probablemente formen enlaces H con los átomos de oxígeno de los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana (Kundu *et al.*, 2000). Actúa como un crioprotector permeable a la membrana, lo que provoca la deshidratación de los espermatozoides debido principalmente a la salida osmótica del agua intracelular (Watson, 1995; Amann, 1999).

El glicerol, por su bajo peso molecular le permite ingresar a la célula y reemplazar osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento. Esto

combina con una velocidad de congelamiento lenta disminuye la formación de cristales de hielo intracelular (Salamon y Maxwell, 2000).

El glicerol sigue siendo el crioprotector de elección para los espermatozoides de todas las especies y se usa comúnmente en concentraciones de 4 % a 8 %. La toxicidad del glicerol limita el uso de altas concentraciones de glicerol en medios crioprotectores (Hammerstedt y Graham, 1992; Fisher y Fairfull 1984).

b. Dimetilformamida (DMFA)

La dimetilformamida es un líquido casi incoloro, de elevado punto de ebullición, inflamable, fuertemente polar e higroscópico, con un leve olor a amoníaco. Es miscible en agua y en varios disolventes orgánicos. Tiene un peso molecular de 73,09 gr/mol; la fórmula molecular es C_3H_7NO , su punto de fusión es $-60,5\text{ }^{\circ}C$ y el punto de ebullición es de $153\text{ }^{\circ}C$ (Alvarenga *et al.*, 2000).

Las amidas son moléculas de bajo peso molecular y de baja viscosidad por lo que penetran rápidamente las membranas, de esta manera podrían reducir los daños asociados al estrés osmótico (López *et al.*, 2009).

Determinaron que el equilibrio a temperatura ambiente y el uso de dimetilformamida al 7 % como crioprotector penetrante, conservó la movilidad, viabilidad e integridad funcional de la membrana plasmática espermática y a su vez conservó la integridad y condensación de la cromatina de los espermatozoides de llama (Carretero *et al.*, 2014).

3.5.4. PROCESAMIENTO DE DILUCIÓN

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

Para una inseminación artificial con semen diluido debe contener entre 10 a 16 millones de espermatozoides (Cuba, 2000; Cárdenas, 2002; Alarcón *et al.*, 2012; Cayo, 2013).

3.6. ENFRIAMIENTO – REFRIGERADO

Según Choez, (2010), indica que para el proceso de refrigeración se necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura, como la yema de huevo.

La refrigeración es la disminución gradual de la temperatura para lograr una baja movilidad, generalmente manteniendo en 4 a 5 °C. El tiempo de refrigeración puede ser de 1 o de 2 horas (Ordoñez *et al.*, 2013; Baca, 1998; Cuba, 2000; Morton *et al.*, 2007), se tienen reportes de diferentes autores donde evalúan motilidad, vitalidad e integridad acrosomal en semen de alpaca y llama (Tabla 15) y así mismo se tiene reportes de parámetros cinéticos en la etapa de refrigeración como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 15. Valores de motilidad, vitalidad e integridad acrosomal en semen refrigerado de llama y alpaca.

Autor	Método	Dilutor	Vitalidad (%)			Integridad acrosomal (%)			Motilidad (%)		
			Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	
Ciprian (2019)	EE (alpaca)	Glicerol 7 %	53,74 ± 8,07	-	-	24,81 ± 12,76	-	-	-	-	
		DMFA 7 %	56,89 ± 10,47	-	-	36,23 ± 13,56	-	-	-	-	
		DMFA 9 %	54,89 ± 8,42	-	-	37,40 ± 16,99	-	-	-	-	
Carretero y Giuliano (2014)	EE (llama)	Glicerol 7 %	-	-	-	14,70 ± 15,50	-	-	-	-	
		DMFA 7 %	-	-	-	40,00 ± 13,50	-	-	-	-	
Quispe (2018)	VA (alpaca)	DMFA 7 %	61,58 ± 11,65	65,45 ± 13,62	-	13,37 ± 10,85	-	-	-	-	

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar, DMFA: Dimetilformamida; EE: Electroeyaculación; VA: Vagina artificial

3.7. ADICIÓN DE CRIOPROTECTORES Y ENVASADO

Como indican Baca, (1998) y Cuba, (2000), que las pajillas de cloruro de polivinilo (de 0,25 – 0,50 ml) son las más difundidas por sus ventajas de ocupar menos área de

almacenamiento, mejor supervivencia, mejores índices de concepción y buena congelación.

Mientras que Morton y Maxwell, (2006), en una investigación que realizaron con espermatozoides del epidídimo, se evaluó la congelación de semen en pellets y pajuelas, obteniendo mejor recuperación en espermatozoides congelados en forma de pellets.

Tabla 16. Valores de parámetros cinéticos de velocidades de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado colectados por electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA).

Autores	Ciprian (2019)		Quispe (2018)	Flores (2015)	
Método	EE		VA	EE	
Dilutores	Glicerol 7 %	DMFA 7 %	DMFA 9 %	DMFA 7 %	DMFA 7 %
Parámetros de la motilidad	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
VCL (µm/s)	46,74 ± 13,70	53,15 ± 10,80	53,49 ± 11,30	53,47 ± 8,68	38,70 ± 9,40
VSL (µm/s)	10,36 ± 3,53	12,09 ± 3,72	1,52 ± 3,47	14,64 ± 2,11	9,80 ± 1,80
VAP (µm/s)	18,95 ± 5,56	22,08 ± 5,39	23,18 ± 4,69	26,90 ± 2,15	22,70 ± 3,20
LIN (%)	-	-	-	27,93 ± 5,29	5,10 ± 6,40
STR (%)	-	-	-	54,56 ± 7,35	43,40 ± 5,70
WOB (%)	-	-	-	51,00 ± 4,90	60,20 ± 7,50
ALH (µm)	1,04 ± 0,89	1,71 ± 1,11	1,36 ± 0,94	2,18 ± 0,76	-
BCF (Hz)	2,77 ± 2,37	4,04 ± 2,63	3,11 ± 2,40	4,31 ± 2,10	-

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar; DMFA: Dimetilformamida; EE: Electroeyaculación; VA: Vagina artificial; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad media; LIN: Índice de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación; ALH: BCF: Índice de oscilación.

3.8. PROCESO DE EQUILIBRADO, CONGELACIÓN Y ALMACENAMIENTO

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

La congelación en forma horizontal se hace en un depósito de poliestireno expandido, donde se vierte nitrógeno líquido (NL) hasta una altura de 4 cm, donde las pajillas son colocadas en una gradilla a una altura de 4,5 cm por sobre el NL, y se congela con los

vapores por 8 minutos y posteriormente sumergidas en NL, posteriormente son transferidos a los tanques criogénicos de almacenamiento (Cárdenas, 2002).

Los espermatozoides actualmente pueden conservarse en nitrógeno líquido a una temperatura baja de -196 °C y sobrevivir con fertilidad relativamente alta después de su descongelamiento, sin embargo, muchos de los espermatozoides existentes mueren o se encuentran inmóviles por el efecto de la congelación y descongelación (Gómez, 1984; AX *et al.*, 2000).

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

3.9. DESCONGELACIÓN

La descongelación se realiza a 35 °C durante 30 segundos (Aller *et al.*, 2003; Cárdenas, 2002), a 20 segundos (Paucar, 2011), por un minuto (Cuba, 2000), a 37 °C por 30 segundos (Cayo, 2013; Franco, 2015). Se teoriza respecto a la congelación y descongelación que por lo menos el 50 % de los espermatozoides mueren o se hacen inmóviles durante la congelación y su posterior descongelación (Salisbury *et al.*, 1982; Gómez, 1984).

Derivaux, J. (1982), indica que los mejores resultados se obtienen al descongelar las pajillas de semen en baño maría de 32 °C a 37 °C por 30 a 40 segundos, el cual consiste en sacar las pajillas del termo criogénico con rapidez y cuidado y pasarlo al termo con agua a temperatura de 37 °C. También reporta que la descongelación rápida propicia una mayor recuperación de la motilidad y fertilidad de los espermatozoides.

En semen congelado de camélidos se reportan valores que van de 0 a 40 % de recuperación espermática después de su descongelación (Bravo *et al.*, 2000; Santiani *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Aller *et al.*, 2003), también se tiene valores reportados de motilidad, vitalidad e integridad acrosoma de semen descongelado de llama y alpaca (Tabla 17), así mismo se tiene reportes de parámetros cinéticos (Tabla 18) y parámetros morfométricos (Tabla 19) en semen colectado por EE y VA.

Tabla 17. Valores de motilidad, vitalidad e integridad acrosomal en semen descongelado de llama y alpaca.

Autor	Método	Dilutores	Vitalidad (%)	Integridad acrosomal (%)	Motilidad (%)
			Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
Ciprian (2019)	EE	Glicerol 7 %	46,52 ± 9,36	-	5,45 ± 4,74
	(alpaca)	DMFA 7 %	48,27 ± 7,07	-	8,19 ± 4,83
		DMFA 9 %	48,62 ± 10,78	-	8,85 ± 5,86
Carretero y	EE	Glicerol 7 %	-	22,40 ± 10,00	0,80 - 1,80
Giuliano (2014)	(llama)	DMFA 7 %	-	24,20 ± 13,00	22,10 - 11,70
Quispe (2018)	VA	DMFA 7 %	44,97 ± 9,43	53,79 ± 8,94	4,94 ± 2,27
	(alpaca)				

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar, DMFA: Dimetilformamida, EE: Electroeyaculación, VA: Vagina artificial.

Tabla 18. Valores de parámetros cinéticos de velocidades de espermatozoides de alpaca en semen descongelado, colectados por electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA).

Autores	Ciprian (2019)			Quispe (2018)	Flores (2015)
Método	EE			VA	EE
Dilutores	Glicerol 7 %	DMFA 7 %	DMFA 9 %	DMFA 7 %	DMFA 7 %
Parámetros de la motilidad	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
VCL (µm/s)	19,44 ± 13,10	38,54 ± 17,10	38,64 ± 20,30	29,90 ± 13,63	34,00 ± 10,70
VSL (µm/s)	4,72 ± 3,39	8,99 ± 4,63	9,68 ± 5,53	16,28 ± 25,27	8,40 ± 2,80
VAP (µm/s)	8,39 ± 5,78	16,30 ± 6,71	17,77 ± 8,52	17,18 ± 4,51	19,20 ± 5,10
LIN (%)	-	-	-	29,38 ± 3,99	25,70 ± 5,20
STR (%)	-	-	-	52,55 ± 5,10	44,80 ± 9,20
WOB (%)	-	-	-	56,05 ± 6,49	57,80 ± 7,70
ALH (µm)	0,09 ± 0,17	0,38 ± 0,73	0,48 ± 0,43	0,81 ± 0,62	-
BCF (Hz)	0,28 ± 0,58	0,96 ± 1,93	1,09 ± 1,10	0,99 ± 0,93	-

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar, DMFA: Dimetilformamida; Dimetilformamida, EE: Electroeyaculación, VA: Vagina artificial; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad media; LIN: Índice de linealidad; STR: Índice de rectitud; WOB: Índice de oscilación; ALH: Índice de oscilación.

Tabla 19. Parámetros de evaluación morfométrica del espermatozoide de alpaca en semen descongelado, colectados por electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA).

Autores	Ciprian (2019)			Quispe (2018)	Flores (2015)
Método	EE		VA	EE	
Dilutores	Glicerol 7 %	DMFA 7 %	DMFA 9 %	DMFA 7 %	DMFA 7 %
Parámetros de la morfometría	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
Largo (µm)	5,50 ± 0,49	5,56 ± 0,48	5,54 ± 0,49	5,75 ± 0,66	5,68 ± 0,68
Ancho (µm)	3,09 ± 0,30	3,10 ± 0,29	3,08 ± 0,30	3,15 ± 0,34	3,10 ± 0,45
Área (µm ²)	14,14 ± 1,81	14,36 ± 1,85	14,24 ± 1,84	14,97 ± 2,13	14,50 ± 2,70
Perímetro (µm)	16,56 ± 1,44	16,56 ± 1,41	16,52 ± 1,40	18,31 ± 2,66	16,89 ± 2,42
Acrosoma (%)	50,08 ± 7,26	49,07 ± 7,62	49,17 ± 7,23	57,02 ± 6,51	-
Elipticidad	1,79 ± 0,22	1,80 ± 0,20	1,80 ± 0,21	-	1,82 ± 0,33
Rugosidad	0,65 ± 0,07	0,66 ± 0,07	0,65 ± 0,06	-	0,63 ± 0,13
Elongación	0,27 ± 0,05	0,28 ± 0,05	0,28 ± 0,05	-	0,29 ± 0,08
Regularidad	0,94 ± 0,04	0,94 ± 0,04	0,94 ± 0,05	-	0,96 ± 0,07

Fuente: Varios autores.

Leyenda: DS: Desviación estándar, DMFA: Dimetilformamida; µm: micrómetro.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. DEL LUGAR DE ESTUDIO

4.1.1. ÁREA GEOGRÁFICA

El presente trabajo de investigación se realizó entre enero 2019 a diciembre del 2020, en la provincia de Canchis, distrito de Marangani, del departamento de Cusco, en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos CICAS “La Raya”. Los análisis de laboratorio se efectuaron en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Escuela Profesional de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, en las coordenadas: 14°28 448’ Latitud Sur, 71°02 753’ Longitud Oeste, altitud de 4 133 msnm y una superficie de 6 320 has (GPS Garmin® Oregón 300). El Promedio de precipitación pluvial es de 965 mm con un rango de temperatura de -6,5 °C a 13,5 °C. Estación meteorológica de La Raya (1995), ver Anexo 1 (Figura 1).

4.1.2. DISPONIBILIDAD DE ALIMENTO

Los animales se encontraban en sus zonas de pastoreo campo libre, su alimentación fue con pastos naturales propios de la zona, donde predominan ocho comunidades vegetales 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* (Machaca et al., 2012). En la Tabla 20 se presenta la relación de especies vegetales dominantes en el CICAS - La Raya, se observa en el Anexo 1 (Figura 2).

Tabla 20. Especies vegetales dominantes en el CICAS La Raya.

Código	Denominación local	Asociación vegetal
Fedo – Mufa	Chillihuar	<i>Festuca dolichphylla</i> – <i>Muhlenbergia fastigiata</i>
Feor	Iral	<i>Festuca ortophylla</i>
Feri	Ichal	<i>Festuca rigescens</i>
Caam	Llama ichu	<i>Calamagrostis amoena</i>
Stob – Stic	Tisña	<i>Stipa obtusa</i> – <i>Stipa ichu</i>
Fedo – Plato	Oqonal	<i>Festuca dolichophylla</i> – <i>Plantago tubulosa</i>
Dimu	Kunkunal	<i>Distichia muscoides</i>
Scri	Totorilla	<i>Scirpus rigidus</i>

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

4.1.3. INSTALACIONES

El laboratorio de biotecnologías reproductivas del centro experimental La Raya, para la evaluación macroscópica, microscópica de cuatro protocolos de criopreservación de semen de llama. Dos corrales, con enmallado de alambres para el manejo adecuado de los animales machos durante la colección de semen.

4.1.4. DURACIÓN DEL ESTUDIO

El estudio se realizó entre los meses de enero del 2019 a diciembre del 2020.

4.2. MATERIALES Y EQUIPOS

4.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ocho llamas macho para la colección de semen por el electroeyaculación de semen.

4.2.2. MATERIALES Y EQUIPOS PARA LA COLECCIÓN DE SEMEN

- Jeringa descartable 60 ml
- Tubo falcón de 15 y 50 ml
- Jeringa de 5, 10 y 20 ml
- Agujas de 18 G x 1/2 y de 21 G x 1/2
- Colchón de esponja
- Cuaderno de campo
- Lapiceros
- Sogas
- Papel toalla

- Agua bidestilada
- Gasa
- Cámara digital
- Guantes quirúrgicos
- Anestésicos (Xylasina y Ketamina)
- Vitaminas
- Gel de transmisión
- Vernier metálico
- Balanza mecánica tipo reloj de 200 kg de capacidad
- Electroeyaculador (Minitube e320 - manual y automático de 20 V)
- Ecógrafo Agrosan L - 10, transductor de 5,0 MHz

Nota: ver Anexo 1 (Figura 3).

4.2.3. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO PARA LA EVALUACIÓN Y CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE LLAMA

a. **Materiales**, se observa en el Anexo 1 (Figura 4 y 5).

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Micro pipeta de 0,5 – 10 μ l y de 10 – 100 μ l
- Tips de 0,5 – 10 μ l y de 10 – 100 μ l
- Papel Bond
- Lapiceros o marcador indelebles
- Barbijos y gorras
- Guantes quirúrgicos
- Cronometro digital tipo reloj
- Tubos de heppendor
- Gradillas
- Termo criogénico
- Termómetro
- Regla metálica
- Peachimetro
- Caja de Tecnopor
- Tuberculina de 1 ml
- Corta pajilla
- Canastilla
- Portaglobet
- Globet
- Pinzas para pajuelas (metálica y plástica)
- Cinta (embalaje y masque)
- Medidor de nitrógeno líquido
- Pajillas de 0,5 ml
- Embudo
- Placa Petri
- Embace de vidrio pequeño
- Vaso precipitado de 100 - 500 ml
- Viales
- Papel de lente óptico
- Táper de plástico
- Mechero
- Fosforo

- Microscopio de contraste de fases UOP – UB 200i
- platina caliente
- Fluorescencia
- Cámara o computadora con software ISAS v 1,2
- Baño seco de esfera
- Platina térmica
- Baño maría a 37 °C
- Vortex mixer
- Balanza de precisión
- Refrigeradora
- Osmómetro
- Centrifuga digital
- Balón de nitrógeno (MVE 34 Kilos)
- Ecógrafo Agrosan L-10
- Microscopio Motic plus
- Software SAS University (sistema de análisis estadístico)
- Cámara digital

b. Reactivos e insumos, ver Anexo 1 (Figura 6).

- Degelificante (papaína)
- Inhibidor de papaína
- Aceite de inmersión
- Alcohol polivinílico en polvo
- Alcohol isopropílico
- Nitrógeno líquido (N2L)
- Yema de huevo de gallina
- Dimetilformamida (DMFA)
- Glicerol (GRI)
- PBS
- Eosina, nigrosina para vitalidad
- Algodón

c. Reactivos para el dilutor

- Base tris
- Ácido cítrico
- Fructuosa
- Agua destilada

d. Solución para la integridad acrosomal

- Metanol
- Ácido acético
- Agua destilada
- Coomassie blue G 250

e. Solución para la funcionalidad de la membrana espermática

- Citrato de sodio
- Fructuosa
- Agua destilada
- Formaldehído al 40 %

f. Solución para la evaluación de la morfometría

- Coloración Hemacolor (solución I, II, III)
- Alcohol de 96°

4.2.4. MATERIALES DEL GABINETE

- Registro de colección
- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Computadora
- Impresora

4.3. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO

4.3.1. SELECCIÓN DE ANIMALES

Los animales que se utilizaron en esta investigación fueron llamas de la raza Q'ara y Ch'aku, se preseleccionaron 15 machos del plantel de reproductores del CICAS "La Raya", machos sin problemas reproductivos y con fertilidad comprobada, que oscilaban entre tres a nueve años de edad, de los cuales se seleccionaron ocho llamas macho para la respectiva colección de semen por el método de electroeyaculación, dichas llamas fueron codificados y suplementadas con vitaminas.

4.3.2. MÉTODO DE COLECCIÓN POR ELECTROEYACULACIÓN (EE)

El estudio se desarrolló entre enero 2019 a diciembre del 2020. Se utilizaron ocho llamas con una frecuencia de colección de una vez por semana.

4.3.3. COLECCIÓN DE SEMEN

Para efectuar la colección de semen por el método de electroeyaculación se utilizaron ocho machos, con dos repeticiones a cada uno; con intervalos de descanso de una semana; Se utilizó el electroeyaculador (Minitube e320 manual/automático 20 V), y tubos falcón para la colección, el cual se rotulo el código del animal en evaluación.

Los animales durante el experimento estaban con pasto natural, y agua a disponer de ellos en cualquier momento y para realizar el trabajo respectivo fue trasladado cada mañana cerca al laboratorio para facilitar el trabajo.

a. Pesado y medición testicular de las llamas

El pesado de las llamas se realizó con la ayuda de una balanza de plataforma. El peso promedio de las llamas con las que se realizó esta investigación fue de $129,25 \pm 10,86$ kg; consecutivamente se efectuó la medición de los testículos derecho e izquierdo de cada animal (Tabla 21), esta medición se llevó a cabo con un vernier (ver Figura 3). Se realizó el examen clínico de los órganos genitales externos (testículos, pene y prepucio) por medio de exámenes de inspección y palpación, dando especial atención al tamaño y forma de los testículos y epidídimos, palpados a través del escroto, estos se mostraron firmes y elásticos, no se observaron lesiones, deformidades ni adherencia pene-prepucial y también se midió la distancia de ano-próstata, para dicha medición se usó un transductor ecográfico y una regla milimetrada.

Tabla 21. Registro del peso, edades y medición de testículos de las llamas.

Animales					Tamaño testicular			
N°	Código	Raza	Edad (años)	Peso (kg)	Izquierdo		Derecho	
					Largo	Ancho	Largo	Ancho
1	4	Ch'aku	4	120,5	4,5	3,3	3,8	3,1
2	7	Ch'aku	9	145,0	4,3	2,7	4,2	2,6
3	11	Q'ara	4	138,0	4,8	3,4	4,1	3,2
4	9	Q'ara	4	127,5	4,6	2,7	3,9	2,6
5	12	Q'ara	6	128,0	4,4	3,5	4,7	3,7
6	14	Q'ara	3	112,0	3,8	2,5	4,1	2,8
7	13	Ch'aku	7	139,0	4,2	3,1	4,5	3,3
8	6	Ch'aku	7	124,0	4,8	3,6	4,9	3,8
Media				129,25	4,43	3,10	4,28	3,14

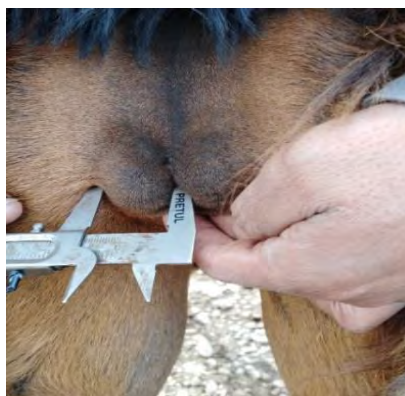


Figura 3. Medicion teticular de las llamas.

b. Aplicación de anestésicos

Para el proceso de la aplicación de anestésicos (ver Figura 4) se realizó según el protocolo de (Director *et al.*, 2007), en la colección de semen por el método de electroeyaculación, se suministró dosis de Ketamina (2,5 ml/100 Kg PV) y Xilacina (0,2 ml/20 kg PV), es así que se suministró hasta 3,63 ml de Ketamina y 1,45 ml de Xilacina como máximo por animal, vía endovenosa, con un lapso de caída aproximadamente de 30 a 60 segundos (ver Tabla 22), para que el animal quede inmovilizado, con el fin de mantener sedado por un lapso promedio de 15 minutos.



Figura 4. Anestesiado para la sedación de llamas con Ketamina y Xylacina.

Tabla 22. Registro de aplicación anestésicos de llamas por electroeyaculación en llamas.

Animal	Peso (kg)	Dosis de anestésico (ml)		Respuesta al estímulo (voltios)		Duración del estímulo (min)
		Ket. (2,5)	Xil. (0,2)	Erección	Eyaculación	Tiempo
		(ml/100 kg)	(ml/20 kg)			
1	120,5	3,01	1,21	11	17	14
2	145,0	3,63	1,45	7	13	11
3	138,0	3,45	1,38	12	16	16
4	127,5	3,19	1,28	7	10	11
5	128,0	3,20	1,28	8	10	11
6	112,0	2,80	1,12	10	14	14
7	139,0	3,48	1,39	11	13	17
8	124,0	3,10	1,24	8	12	14
Media	129,25	3,23	1,29	9,25	13,13	14

c. Protocolos de limpieza de la zona prepucio y estimulación eléctrica de la próstata

- Una vez sedado, el macho fue colocado sobre un colchón en posesión de cubito lateral y luego se estimuló al animal a orinar
- Se prosiguió con la limpieza de la zona pene-prepucio con 10 ml de agua destilada a 37 °C, este trabajo previo se realizó para evitar que el semen colectado que no sea contaminado con la orina y suciedad ubicada a nivel del prepucio (ver Figura 5).
- Posteriormente se realizó la limpieza de la vía rectal utilizando guantes de quirúrgico y papel de toalla.
- Seguidamente se lubrico el transductor de electroeyaculación con gel para facilitar la entrada y así estimular a la altura de la próstata.

- Después de esta acción profiláctica se inició con la relajación de la “S” peniana, el posterior desvainado y sujeción de pene. Es importante tener sujetado el pene de la llama antes de empezar la estimulación eléctrica.

La estimulación eléctrica fue realizada siguiendo el protocolo de (Director *et al.*, 2007), con algunas modificaciones.

- Se utilizó el equipo electroeyaculador (Minitube e320 manual/automático 20 V). Se introdujo el transductor, previamente lubricado con gel hasta la altura de la próstata y seguidamente se empezó la estimulación eléctrica.
- El incremento de voltaje fue gradualmente cada 2 voltios hasta llegar a 18 voltios, cada 3 segundos y repitiéndose cada estímulo tres veces en el mismo voltaje, con intervalos de 2 segundos de descanso. El tiempo que duró todo el proceso de colección fue de 11 a 17 minutos aproximadamente. Se observó la erección del pene a 7 voltios y la eyaculación a 10 voltios, el cual fue diferente para cada animal.
- Se desechó semen con plasma seminal el cual carecía de espermatozoides, el eyaculado obtenido se mantuvo en baño maría seco a una temperatura de 37 °C, hasta el momento de la evaluación y posterior dilución.



Figura 5. Limpieza de vía rectal y pene prepucio con agua bidestilada.

4.4. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE SEMEN DE LA LLAMA

4.4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Inmediatamente después de la colección del semen de las llamas, por el método de electroeyaculación, se prosiguió con la evaluación del volumen, color seminal, filancia

y pH, es decir las características macroscópicas del semen y se analizaron a través del examen visual.

a. Volumen Seminal

La colección de semen de las llamas por el método de electroeyaculación, se realizó en tubos falcón de 15 ml, estériles y graduados en mililitros (ml), se dio la lectura del volumen seminal a través del examen visual en los tubos graduados atemperados a 37 °C, ver Figura 6.

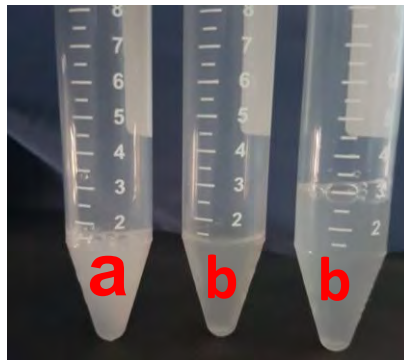


Figura 6. Evaluación de volumen seminal de llamas y evaluación de color seminal, se consideran tonalidades de blanco: lechoso (a) y cristalino (b).

b. Color Seminal

El color seminal se comprobó paralelo al volumen a través de la observación continua o directa, esto se facilitó por que los tubos falcón de 15 ml eran transparentes. El color seminal colectado por el método de electroeyaculación, fue desde blanco cristalino a blanco lechoso, ver Figura 6.

c. pH Seminal

La determinación del pH se realizó utilizando bandas para medir el pH (ver Figura 7), con una escala de 1 – 12. Para la medición del pH, se efectuó de la siguiente manera:

Se utilizaron tiras de papel especiales para la medición del pH. Estas tiras reaccionaban con la muestra de semen y enseguida se teñían del color correspondiente al nivel de pH, estas tiras tenían una leyenda el cual describía los niveles desde básico, neutro y ácido con su respectivo color.

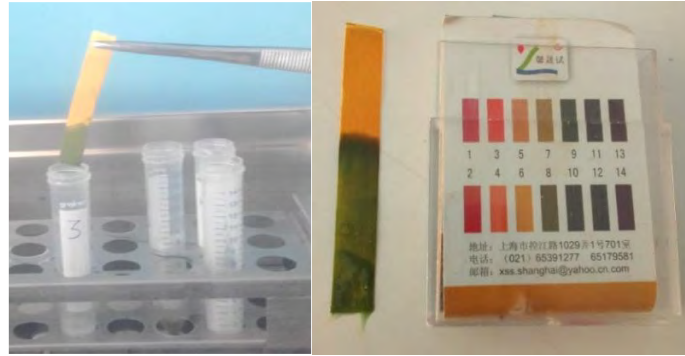


Figura 7. Evaluación de pH seminal de llamas.

d. Filancia seminal

La filancia se midió en centímetros (ver Figura 8), se puso la muestra a placa Petri en una superficie plana, igual se colocó una regla metálica a dicha placa, se tomó 5 μ l de semen con micro pipeta y se estiro verticalmente, en seguida se prosiguió a la lectura de la medida de la filancia.

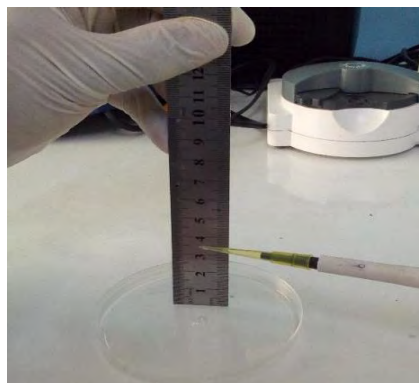


Figura 8. Medición de filancia seminal de llamas.

4.4.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN

Se evaluaron las siguientes características como la motilidad, concentración, vitalidad, funcionalidad de membrana espermática, integridad acrosomal y morfometría, estas características fueron evaluadas en el equipo ISAS v 1,2 - CASA y MotiC plus.

a. Motilidad espermática

Para determinar la motilidad del semen se procedió a colocar 5 μ l de la muestra sobre una lámina portaobjetos, previamente atemperados a 37 °C, cubriendo con el cubreobjetos, luego se observó en un enfoque de 10 X en el Equipo ISAS CASA (ver

Figura 9), que está provista con una platina térmica. Se trabajó en el módulo de motilidad del Integrated Semen Analysis System (ISAS_(r) v 1,2); con una configuración de 25 fotos por segundo, en 10 campos diferentes como mínimo evitando sobre todo las aglomeraciones y aglutinaciones (PROISER, 2010).

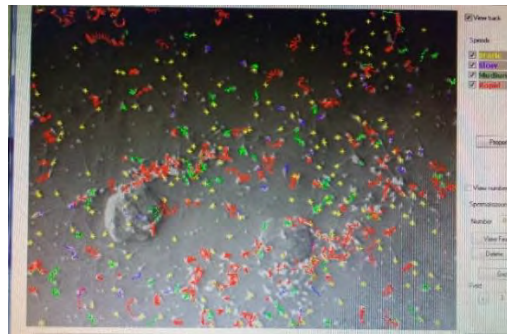


Figura 9. Análisis de la motilidad espermática en el equipo ISAS_(r) v 1.2.

b. Parámetros de la motilidad

Para la evaluación de parámetros cinéticos se tomó los datos de la motilidad. Los parámetros cinéticos que se evaluaron fueron: parámetro de velocidad: Velocidad curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$); Velocidad rectilínea (VSL, $\mu\text{m/s}$); velocidad media (VAP, $\mu\text{m/s}$); Índice de linealidad (LIN, %); Índice de rectitud (STR, %), y Índice de oscilación (WOB, %): parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm), y Frecuencia de batido (BCF, Hz), ver Figura 10.

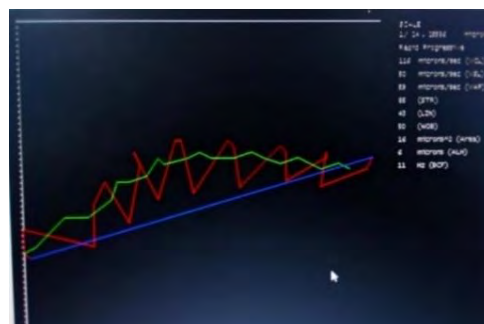


Figura 10. Parámetros cinéticos de la motilidad.

c. Concentración Espermática

Esta evaluación fue paralelamente con la evaluación de la motilidad espermática en el módulo de motilidad del (ISAS_(r) v 1,2); se depositó una pequeña cantidad de

muestra (5 μ l) en una lámina portaobjetos atemperada a 37 °C, luego fue cubierto con una laminilla cubreobjetos manteniendo la misma temperatura, posteriormente se observó con un objeto de 10 X del microscopio, se tomó 6 fotogramas con una configuración de 25 fotos/segundo y lo expresa en millones de espermatozoides por milímetro de la muestra espermática ($\times 10^6$ /ml). Finalmente, a los fotogramas se corrigieron porque este programa reconoce otras partículas como espermatozoides que nos puede llevar a datos con errores (PROISER, 2010).

d. Vitalidad espermática

El análisis de la vitalidad espermática fue con la coloración de vital Hancock (tinción de eosina y nigrosina), que indica una solución roja y una solución negra. Posteriormente se observó en microscopio BA 310 Motic en un objetivo de 40 X, y se usó el software Motic Imagen Plus 2,0 ml.

Protocolo para la evaluación de vitalidad:

- Inicialmente se rotularon los portaobjetos con los datos del animal, fecha y previo calentado del portaobjeto a 37 °C.
- Se colocó en una lámina portaobjetos 10 μ l de muestra espermática con micro pipeta graduada que fue mezclada con 10 μ l eosina al 2 %, luego de unos 10 segundos fue mesclado con 10 μ l nigrosina solución, se homogenizó los componentes con movimientos en círculos, esperar 10 segundos; con la ayuda de otro portaobjetos se procedió a realizar un frotis, posteriormente se hace el secado a temperatura ambiente.
- Finalmente, se procedió con la evaluación de vitalidad espermática en un microscopio BA 310 Motic® en un objetivo de 40 X y contar un mínimo de 200 células espermáticas (ver Figura 11). Se consideró como vivo aquel espermatozoide que no se coloreaba y como muerto aquel que adoptaban una coloración roja. El resultado fue expresado en porcentajes (Tribulo, 2009).



Figura 11. Tinción Eosina-Nigrosina y vitalidad espermática, espermatozoides vivos (I) y muertos (II).

e. Funcionalidad de la Membrana Espermática (HOST)

La evaluación se realizó con la prueba de HOST (*Hipo Osmotic Swelling Test*), que consiste en la exposición de los espermatozoides en un medio hipoosmótica (Jeyendran *et al.*, 1984).

La solución hipoosmótica que fue preparada por citrato de sodio 0,0245 gr/por milímetro de solución, fructuosa 0,045 gr/por milímetro de solución y agua bidestilada 10 ml. Se toma 0,3 ml de la solución hipoosmótica en un tubo Eppendorf, se procede a la lectura de la osmolaridad calculada, la cual debe ser 50 mOsm/l. La solución formulada fue preparada de 1 ml de la propia solución hipoosmótica más 3 μ l de formaldehído al 40 % según Vásquez *et al.*, (2012).

- Se rotuló en un tubo eppendorf con los datos de cada animal.
- Se colocó 100 μ l de solución hipoosmótica previamente atemperada en baño maría seco a 37 °C.
- Luego se agregó 25 μ l de muestra espermática con el uso de micropipeta y con el respectivo tips.
- Se procedió a incubar por un espacio de 5 minutos en baño maría a 37 °C.
- Cuando termina el tiempo de incubación se añadió 31 μ l de la solución formulada, fue homogenizada y enfriada a temperatura ambiente para la reacción al stress hipoosmótica.

- Posteriormente se puso 5 μ l de la muestra incubada sobre un portaobjetos, cubierto por un cubreobjetos fue evaluado en el microscopio ISAS_(r) v 1,2 en el módulo de vitalidad a un aumento de 40 X, para así contabilizar un mínimo de 200 células espermáticas por muestra.
- Finalmente, el conteo y clasificación (Figura 12) de los espermatozoides fueron detallados en función a tres patrones de reacción, similar a lo descrito por (Vásquez *et al.*, 2012).
- Espermatozoides con reacción fuerte (cola enrollada).
- Espermatozoides con reacción moderada (cola semienrollada).
- Espermatozoides sin reacción (cola recta).

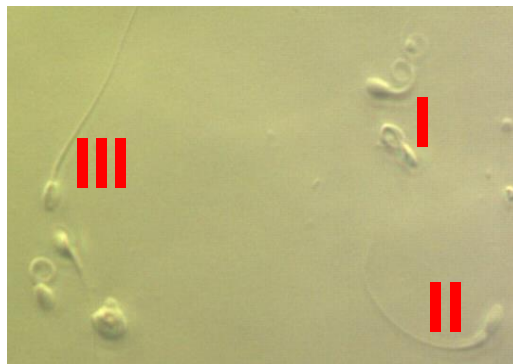


Figura 12. Espermatozoides expuestos a una reacción de stress hipoosmótica, espermatozoides con reacción fuerte (I), espermatozoides con reacción moderada (II) y espermatozoides sin reacción (III).

f. Integridad Acrosomal

Para la evaluación de la integridad acrosomal se utilizó la tinción de coomasie blue descrito por Fumuso *et al.*, (2014), el cual sigue el siguiente procedimiento:

- La solución de Comasie blue fue preparada por 25 ml de metanol; 5 ml de ácido acético; 0,11 gr de Comasie blue G 250 y 20 ml de agua destilada.
- La solución formaldehido al 4 % fue preparada en un envase de vidrio 10 ml de formaldehido al 40 % (formol) y 90 ml de PBS.

- Se procedió el frotis colocando 5 μ l de la muestra espermática en una lámina porta objeto previo rotulado con los datos del macho, posteriormente se hace el secado a temperatura ambiente.
- Seguidamente se fijó el frotis en paraformaldehído al 4 % durante 15 minutos.
- Concluido el tiempo de fijación se procedió el lavado con 2 a 3 inmersiones por 1 segundo en PBS y dejar secar por 2 minutos a temperatura ambiente.
- Concluido el tiempo se sumergió la placa en la solución Coomasie Blue durante 5 minutos.
- Posteriormente se hizo el proceso con el lavado en agua bidestilada sumergiendo por 2 a 3 veces y se dejó el secado a temperatura ambiental,

Finalmente se dio con la evaluación de la integridad del acrosoma, se observó en el microscopio BA 310 Motic en un objetivo de 40 X más aceite de emersión, donde se usó el software Motic imagen Plus 2,0 ML; se contabilizo un mínimo de 200 espermatozoides por muestra, luego se determinó el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto y con acrosoma dañado (ver Figura 13), dicha evaluación se basó en 2 patrones, según Fumuso *et al.*, (2014).

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



Figura 13. Integridad de la membrana espermática con la presencia de capuchón acrosomal (A) y con ausencia de capuchón acrosomal (B).

g. Morfometría Espermática

La morfometría espermática fue evaluada inmediatamente luego de concluida la colección espermática, se utilizó el kit de tinción Hemacolor® para luego ser observado en el módulo de morfometría del ISAS®, el cual hace un análisis automático de la morfometría espermática. De acuerdo a lo mencionado por (Buendía *et al.*, 2002).

Para lo cual se procedió con la tinción Hemacolor, previo rotulado el portaobjeto con los datos del animal. Se realizó un frotis colocando 5 µl de la muestra espermática con la ayuda de micropipeta en una lámina portaobjetos, y seguidamente se esparció la muestra, el frotis se dejó secar al aire por 60 minutos. Una vez secadas las láminas se procedieron a la tinción con las 3 soluciones del Hemacolor®, de la siguiente manera:

- Se realizaron cinco inmersiones con intervalo de un segundo en la solución I (solución fijadora).
- Se efectuaron tres inmersiones con intervalo de un segundo en la solución II (reactivo de coloración rojo).
- Luego se hicieron seis inmersiones con intervalo de un segundo en la solución III (reactivo de coloración azul).
- Se dejó secar al aire durante una hora.
- Para la evaluación la morfometría espermática, se limpió en envés de la placa con algodón y alcohol.
- Se observaron las láminas en el lente objetivo de 100 X más aceite de inmersión, se procedió a la captura manual entre 200 a 250 espermatozoides por colecta y por animal evaluado, Figura 14.

El módulo de morfometría del ISAS® CASA mide parámetros de la morfometría espermática como: tamaño de la cabeza y forma de la cabeza, así mismo el nivel de color de la cabeza, área, anchura, distancia de la inserción y ángulo de la pieza intermedia.

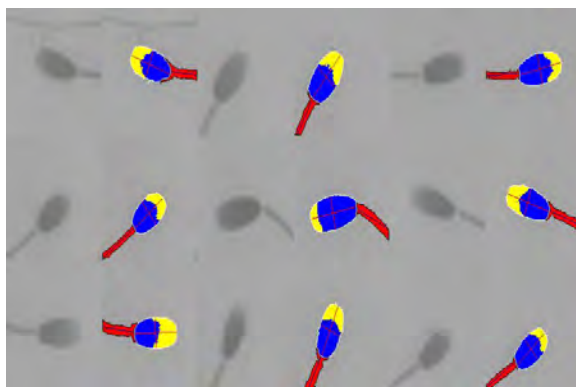


Figura 14. Espermatozoides capturados en el módulo de morfometría del ISAS.

4.5. CRIOCONSERVACION DEL SEMEN DE LLAMA

4.5.1. TRATAMIENTO DEL SEMEN

El tratamiento de muestra espermática colectada por electroeyaculación se realizó con mucha delicadeza para no causar un shock térmico al momento de la evaluación.

4.5.2. DEGELIFICANTE

Esta etapa se realizó el tratamiento de la muestra seminal para reducir la viscosidad observado en el semen, que evita el manejo adecuado del análisis microscópicas y en el proceso de criopreservación de semen de llama. Similar a lo descrito por (Kershaw-Young *et al.*, 2012).

Para disminuir la viscosidad del semen se utilizó la enzima papaína en una relación de 1:0,5 (semen: papaína), para evaluar las características microscópicas del semen colectado por el método de EE.

a. Preparación de la papaína:

- Se preparó en matraz esterilizado 250 ml de Base TRIS.
- Luego agregar 25 mg de papaína.
- Se homogenizó las sustancias con ligeros movimientos, concluida la homogenización para su mejor uso, se guardó en un tubo falcón de 50 ml.

b. Uso de la enzima papaína:

- Una vez colectado la muestra semen se realizó los exámenes correspondientes en fresco incubado a una temperatura de 37 °C.
- Luego se agregó la papaína (1:0,5) (papaína: muestra espermática), y fue incubado durante 20 minutos.
- Al término del incubado se agregó el inhibidor de papaína en proporción de 1 µl por 1 ml de muestra, y luego se incubo durante cinco minutos.

4.6. PREPARACIÓN DEL DILUTOR

La preparación del dilutor fue con el protocolo de Souza, (2009), como se observa en la tabla 23.

Tabla 23. Insumos para la preparación del dilutor Base TRIS.

Composición	Cantidad
Base TRIS (C H NO)	0,3028 g
Ácido Cítrico (CHO)	0,17 g
Fructuosa (CHO)	0,125 g
Agua Bidestilada	10 ml
Yema de huevo	25,00 ml

Fuente: Souza (2009).

En el presente trabajo se ajustó a una osmolaridad de 300 mOsm/Kg; como lo indica Cossio, (2019). No se agregó ningún antibiótico.

4.7. ADICIÓN DE DILUTOR

Luego de la evaluación de semen fresco, las muestras que tienen una buena concentración y motilidad espermática fueron agregados con dilutor A, donde a cada muestra se añadió el volumen apropiado hasta alcanzar una concentración de 20 millones de espermatozoides/ml.

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

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

Dónde:

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

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

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

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

También se utilizó yema de huevo previo homogenizado en vortex para luego extraer el sobrenadante con la finalidad de disminuir cantidad de glóbulos grasos, aplicando la regla de tres simple para el cálculo con relación de volumen final de la muestra. En seguida se realizó la mezcla con la muestra, dilutor calculado y yema de huevo de gallina calculado.

4.8. DILUTORES DE CRIOPRESERVACIÓN PLANTEADOS

Los dilutores planteados de criopreservación se describe en la Tabla 24.

Tabla 24. Crioprotector planteado para los cuatro dilutores.

Dilutores de criopreservación	Método de colección	Crio protector	% de crio protector	Tiempo de refrigerado	Tiempo de congelado	Tiempo de descongelación
Dilutor 1	EE	Glicerol	5	2,5 horas	curva de congelación rápida	30 segundos
Dilutor 2	EE	Glicerol	7	2,5 horas	curva de congelación rápida	30 segundos
Dilutor 3	EE	Dimetilfor mamida	7	2,5 horas	curva de congelación rápida	30 segundos
Dilutor 4	EE	Dimetilfor mamida	9	2,5 horas	curva de congelación rápida	30 segundos

4.9. REFRIGERADO

Se trabajó con el semen diluido en tubos falcón de 15 ml, previamente identificados y son puestos a refrigeración en un vaso precipitado con agua a la temperatura de la muestra de 37 °C, de tal manera que la temperatura desciende gradualmente evitando un shock térmico desde los 37 °C hasta llegar a 5 °C concluido la refrigeración que duró aproximadamente 2,5 horas; ver Figura 15 (a).

4.10. ADICIÓN DEL CRIOPROTECTOR

En este proceso la muestra de semen diluida, fue fraccionado en cuatro dilutores y colocando en un tubo de viales rotulado, manteniendo en refrigeración a 5 °C y a cada vial se agregó el dilutor “B” como el glicerol 5 % para dilutor 1, glicerol 7 % para dilutor

2, dimetilformamida 7 % para dilutor 3 y dimetilformamida 9 % para dilutor 4, y luego estas cuatro protocolos se homogenizaron suavemente y se dejaron en refrigeración durante 10 minutos, finalmente se evaluaron en el equipo ISAS CASA, a fin de determinar la motilidad espermática de cada protocolo, ver Figura 15 (b).

4.11. EMPAJILLADO

Previamente se hizo el rotulado de las pajillas, codificadas con la identificación de machos, protocolos correspondientes y fecha de colección. Luego se procedió a cargar manualmente en las pajillas de 0,5 ml de semen diluido, con la ayuda de jeringa de tuberculina modificada para facilitar esta operación de empajillado, para evitar que revienten las pajillas en el descongelado se dejó un espacio de aire durante el sellado de las pajuelas con alcohol polivinílico en polvo y fue colocado inmediatamente en una bandeja de agua temperada a 5 °C, todo esto se hizo dentro de la refrigeración para evitar los cambios bruscos de temperatura, ver Figura 15 (c).

4.12. EQUILIBRADO

Se realizó en una bandeja con agua temperada a 5 °C, en el que se introducían las pajillas cargadas durante 10 minutos, con el objetivo de que los espermatozoides entren en un equilibrio con la finalidad de evitar la cristalización al momento del congelado. ver Figura 15 (d).

4.13. CONGELACIÓN RÁPIDO

Culminando el equilibrado, se usó el método de congelación horizontal, para lo cual se vació 2 kg de nitrógeno a una caja de poliestireno expandido (20 x 30 x10 cm) y para evitar la vaporización del nitrógeno líquido, se colocó rápidamente y cuidadosamente las pajillas de semen previo secado con papel de toalla para evitar que no se pegue, luego se ubicó sobre una gradilla artesanal a una altura de 5 cm sobre el nitrógeno líquido, donde se congelaron con los vapores de nitrógeno durante 15 minutos, concluir el tiempo se sacó la gradilla artesanal dejando caer las pajillas para que este en contacto con el nitrógeno líquido durante 10 minutos, ver Figura 15 (e).

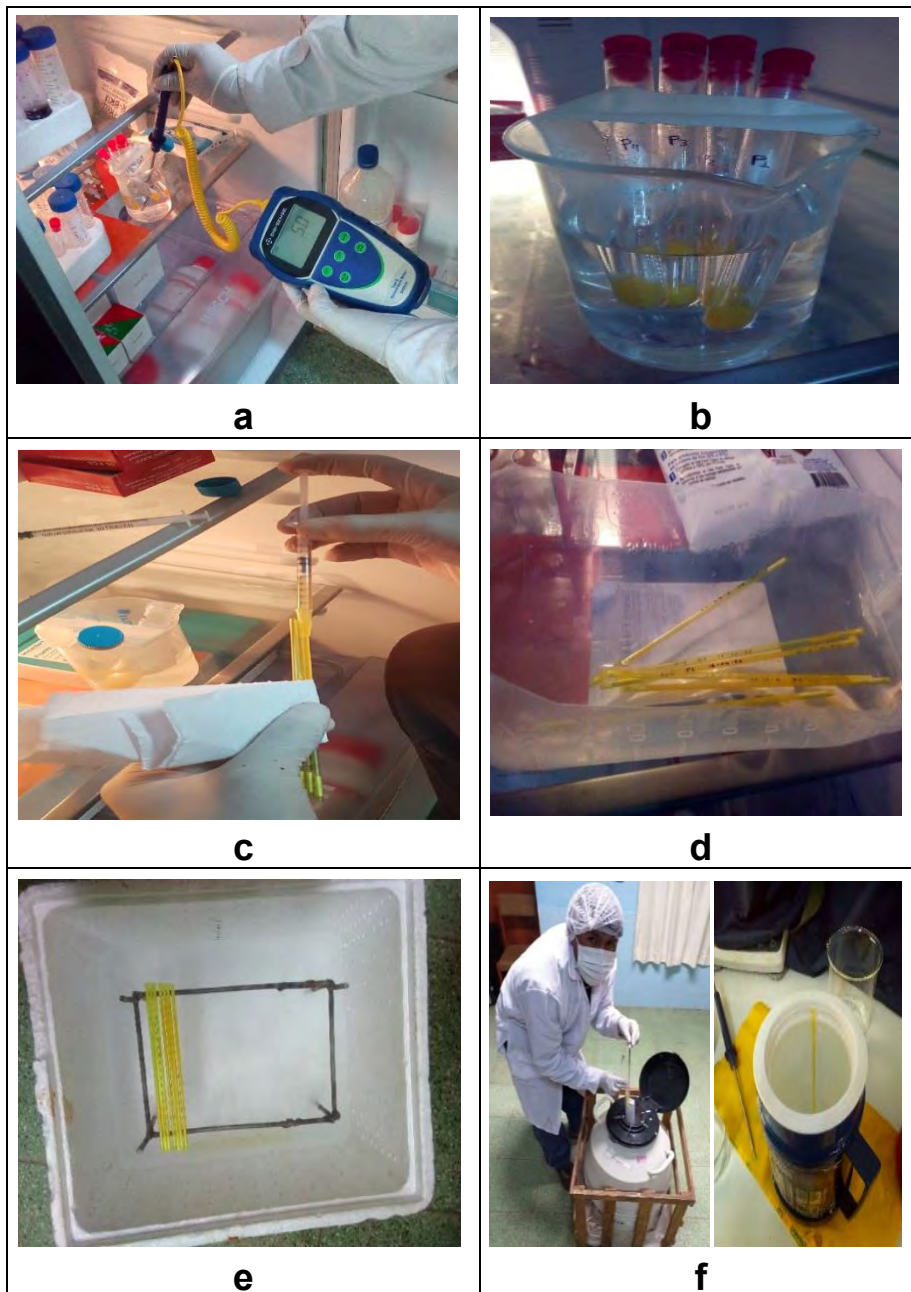
4.14. ALMACENADO

Culminada la congelación, se colocaron las pajillas con los espermatozoides congelados en los globets y porta globets, separados por su identificación, y posteriormente fueron introducidos y colocados en las canastillas del balón de nitrógeno y almacenados a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo 30 días, ver Figura 15 (f).

4.15. DESCONGELADO

La descongelación se hizo después de 30 días de almacenado se descongelo las pajillas, para ello utilizando una pinza de plástico, se procedió a sacar las pajillas de las canastillas del balón de nitrógeno, rápida y cuidadosamente para descongelarlo en el termo descongelador que contiene agua a $37\text{ a }38\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, para luego sacarlos y se hizo la respectiva evaluación microscópica, ver Figura 15 (f).

Figura 15. Serie fotográfica sobre la criopreservación de semen de llama.



Leyenda: **a.** Muestra refrigerada y medición de la temperatura; **b.** Dilutor A y B con diferentes concentraciones de crioprotector; **c.** Empajillado los cuatro protocolos codificados respectivamente; **d.** Equilibrado de pajuelas a 5 °C durante 10 minutos; **e.** Congelación horizontal de pajillas de semen en vapor de nitrógeno líquido; **f.** Congelamiento, almacenado y descongelamiento de las pajuelas del semen.

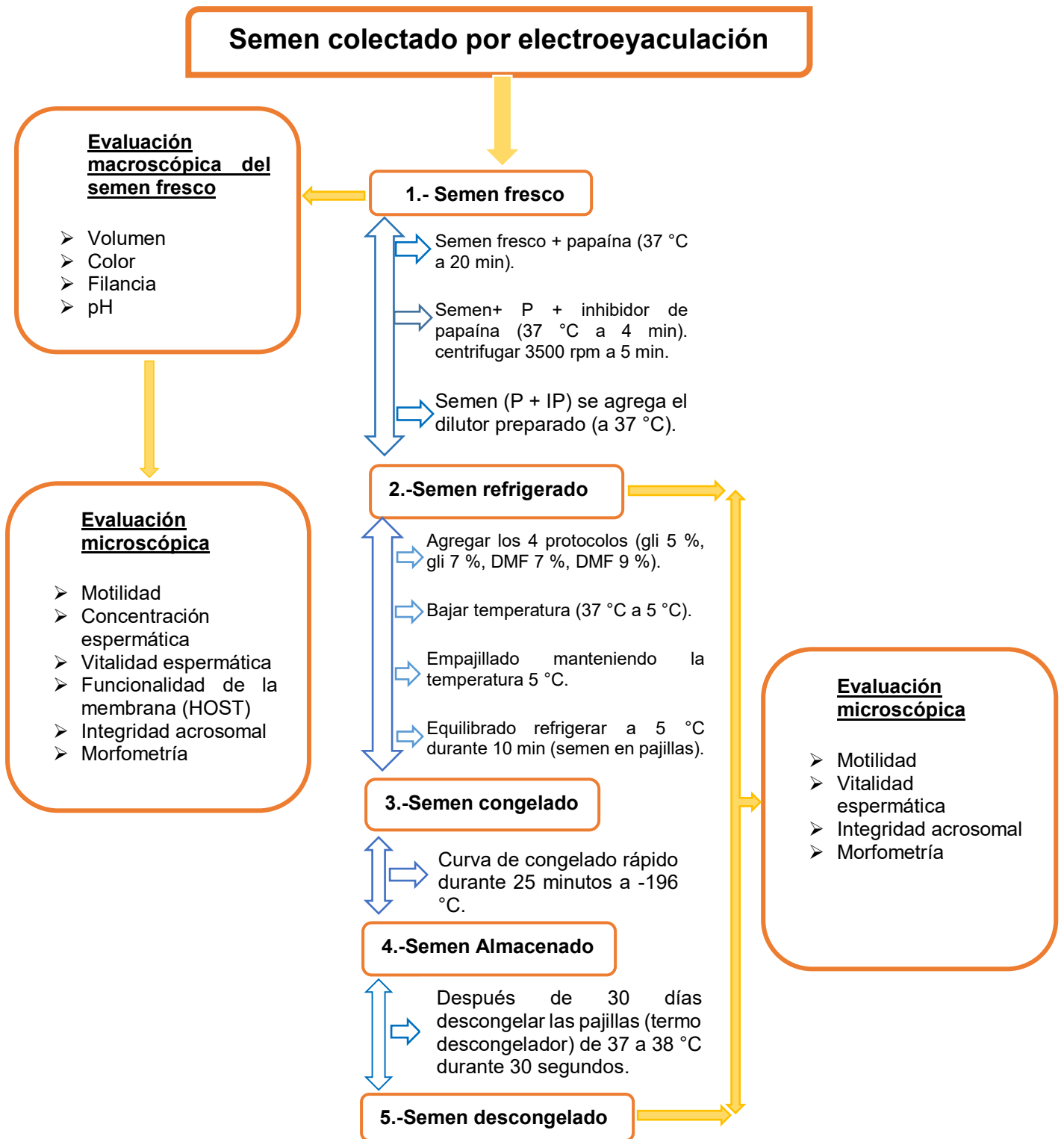


Figura 16. Flujograma de la evaluación del semen de llama colectado por electroeyaculación.

4.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.16.1. DISEÑO ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de las variables macroscópicas como volumen, color, filancia y pH se evaluaron mediante estadística descriptiva.

Se uso el test de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de datos; y el test de Levene para determinar la homogeneidad de varianzas. Los parámetros de motilidad (VCL, VSL, VAP, LIN STR, ALH y BCF), concentración, vitalidad, integridad acrosomal y morfometría en semen fresco se analizaron con un análisis de varianza (ANVA) mediante un diseño de bloques completamente al azar (DBCA), la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey. Para el semen refrigerado y descongelado también se empleó un DBCA, cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + M_j + e_{ijk}$$

Donde:

μ : Media

C: Efecto de la i-esimo animal

M: Efecto del i-eximo protocolo de congelación

e: Error experimental

Las pruebas estadísticas, se realizaron empleando el programa SAS University, la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. EVALUACIÓN MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL SEMEN FRESCO

5.1.1. EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

a. Volumen seminal

La media de volumen seminal de llamas colectadas por electroeyaculación, se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Volumen, filancia y pH de semen de llamas colectado por electroeyaculación.

Variable	n	Media (ml)	± DS	(%) CV	Máximo (ml)	Mínimo (ml)
Volumen (ml)	16	3,69	0,75	20,34	5,0	2,0
Filancia (cm)	16	3,53	0,54	15,21	4,5	2,7
pH	16	7,34	0,24	3,26	7,5	7,0

Leyenda: N: número de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad.

La media del volumen seminal de llamas colectado por electroeyaculación fue superior a lo reportado por Laruta *et al.*, (2016) de 1,67 ml ± 0,29 ml; pero, similar a lo reportado por Ccoiso (2019) de 3,63 ml ± 1,64 ml e inferior a lo reportado por Fumuso (2020) de 3,90 ml ± 2,70 ml y Gallegos (2019) de 3,80 ml ± 0,80 ml; todos estos estudios se realizaron en llamas colectadas por el método de electroeyaculación. Las diferencias estarían sometidas al efecto animal, condiciones medio ambientales, frecuencia de colecta.

Se observa diferencias numéricas en el volumen seminal debido a que se utilizaron diferentes animales para este método de electroeyaculación, en este estudio se trabajó con llamas alimentadas con pastos naturales, con suplemento alimenticio "vitamina".

b. Filancia seminal

La media de la filancia de llamas colectadas por electroeyaculación, se aprecia en la Tabla 25.

Filancia seminal de llamas colectado por electroeyaculación fue inferior a lo reportado por Gallegos (2019) de $3,70 \text{ cm} \pm 0,64 \text{ cm}$; Ccoiso (2019) de $3,63 \text{ cm} \pm 0,93 \text{ cm}$; estos estudios se realizaron en llamas colectadas por el método de electroeyaculación. Las diferencias se deben posiblemente al efecto animal y frecuencia de colecta.

c. pH seminal

La media del pH seminal de llamas colectada por electroeyaculación, se muestra en la Tabla 25.

pH seminal de llamas colectado por electroeyaculación fue superior a lo reportado por Gallegos (2019) de $7,00 \pm 0,10$; Valle (2013) de 7,08; similar a lo reportado por Ccoiso (2019) de $7,25 \pm 0,48$ e inferior a lo reportado por Quispe y Delgado (2012) de 7,70; todos estos estudios se realizaron en llamas colectadas por el método de electroeyaculación. Las diferencias numéricas se deben probablemente al instrumento y metodología de medida utilizado que utilizó cada autor.

d. Color seminal

El color del semen de llama, colectada por electroeyaculación fue evaluado de acuerdo al criterio de observador, determinando los colores descrito en porcentaje que se muestra en la Tabla 26.

Tabla 26. Color seminal de las llamas colectado por electroeyaculación.

Color	n	%
Blanco Cristalino	12	75
Blanco Lechoso	4	25
Total	16	100

Leyenda: N: Numero de colecta.

EL color seminal predominante que se obtuvo fue el color blanco cristalino, similar al reporte de Ccoiso (2019); pero, diferente a los reportes de Gallegos (2019), Rodríguez

(2013) y Ordoñez (2013). Las diferencias se deberían probablemente al criterio de evaluación de cada autor y efecto animal.

5.1.2. EVALUACIÓN DE CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS

a. Motilidad total

La media de motilidad total de llamas colectado por electroeyaculación, se observa en la Tabla 27.

Tabla 27. Motilidad total, motilidad no progresiva y motilidad progresiva de los espermatozoides en semen fresco de las llamas colectados por electroeyaculación.

Variable	n	Media (%)	± DS	(%) CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
MT	16	43,28	15,15	35,00	72,1	17,6
MNP	16	41,04	14,40	35,08	68,3	17,4
MP	16	2,24	2,85	127,10	11,6	0,1

Legenda: N: número de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad; MT: motilidad total; MNP: Motilidad no progresiva; MP: Motilidad progresiva.

La media de la motilidad total fue superior al reporte de Carretero (2020) de 22,00 % ± 10,90 % y Casaretto *et al.*, (2012) de 34,40 % ± 25,80 %; la diferencia posiblemente este en la época de colecta, condición medio ambiental, pero inferior a lo reportado por Ccoiso (2019) de 44,68 % ± 18,93 % y Gallegos (2019) de 44,90 % ± 19,10 %; la diferencia estaría dadas al efecto animal. Todos estos estudios se realizaron en llamas colectada por el método de electroeyaculación.

b. Motilidad no progresiva (MNP)

Motilidad no progresiva de llamas colectado por electroeyaculación, se observa en la Tabla 27.

La media de la motilidad no progresiva fue superior a lo reportado por Rodríguez (2013) de 12,70 % ± 2,20 % y Giuliano *et al.*, (2010) de 4,40 % ± 10,43 % e inferior a lo reportado por Ccoiso (2019) de 43,15 % ± 18,31 % y Valle (2013) de 54,66 %; la

diferencia estaría dada a época de colecta y condición medio ambiental. Todos estos estudios se realizaron en llamas colectada por el método de electroeyaculación.

c. Motilidad progresiva (MP)

En referencia a la motilidad progresiva de llamas colectado por electroeyaculación, se observa en la Tabla 27.

Los resultados en motilidad progresiva fueron superior a lo reportado por Ccoiso (2019) de $1,53 \% \pm 0,83 \%$ y Rodríguez (2013) de $1,20 \% \pm 2,20 \%$; cabe mencionar que para dichas evaluaciones se utilizaron el sistema de análisis computarizado ISAS - CASA. En llamas colectada por el método de electroeyaculación. Las diferencias podrían deberse a la cantidad de animales utilizadas y frecuencia de colecta.

d. Parámetros de la motilidad

Los resultados de los parámetros cinéticos (VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, ALH y BCF), obtenido de los espermatozoides de llamas, donde se observa los promedios totales de 8 animales, se observa en la Tabla 28.

Tabla 28. Parámetros de motilidad espermática en semen fresco de llamas colectados por electroeyaculación.

Variable	Media	± DS	(%) CV	Máximo	Mínimo
VCL ($\mu\text{m/s}$)	55,37	16,53	29,86	89,7	34,4
VSL ($\mu\text{m/s}$)	12,38	3,23	26,08	19,7	9,4
VAP ($\mu\text{m/s}$)	25,99	5,53	21,27	39,3	19,2
STR (%)	26,96	7,05	26,14	42,9	17,0
LIN (%)	48,60	7,47	15,36	65,4	37,9
WOB (%)	51,81	7,04	13,59	61,1	40,2
ALH (μm)	3,01	0,68	22,67	4,2	2,2
BCF (Hz)	4,44	1,36	30,71	7,6	2,5

Leyenda: DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio de desplazamiento; STR: Índice de rectitud; LIN: Porcentaje de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza; BCF: Frecuencia de batida.

Los resultados fueron superiores a lo reportado por Rodríguez (2013), valores promedios VCL de $36,90 \mu\text{m/s} \pm 8,80 \mu\text{m/s}$; VSL de $8,00 \mu\text{m/s} \pm 2,30 \mu\text{m/s}$; VAP de $18,50 \mu\text{m/s} \pm 3,30 \mu\text{m/s}$; LIN de $22,20 \% \pm 5,50 \%$; STR inferior $43,00 \% \pm 8,20 \%$; WOB similar $51,60 \% \pm 9,70 \%$; ALH superior $1,00 \mu\text{m} \pm 0,80 \mu\text{m}$; BCF de $1,80 \text{ Hz} \pm 1,80 \text{ Hz}$; inferiores a lo reportado por Ccoiso (2019) valores promedios de VCL de $60,82 \mu\text{m/s} \pm 11,47 \mu\text{m/s}$; VSL de $13,1 \mu\text{m/s} \pm 2,12 \mu\text{m/s}$; VAP de $28,75 \mu\text{m/s} \pm 3,88 \mu\text{m/s}$; LIN de $22,12 \% \pm 4,75 \%$; STR inferior $45,63 \% \pm 4,57 \%$; WOB superior $48,01 \% \pm 5,78 \%$; ALH similar $3,18 \mu\text{m} \pm 0,71 \mu\text{m}$; BCF superior $3,68 \text{ Hz} \pm 1,2 \text{ Hz}$. Las diferencias estarían dadas probablemente al efecto y número de animales manipulados, porque el estudio se realizó en el mismo Centro Experimental utilizando el sistema de ISAS – CASA y el mismo método de evaluación.

e. Concentración espermática

La concentración espermática de semen obtenida en este estudio se presenta en la Tabla 29.

Tabla 29. Concentración espermática en semen fresco de las llamas obtenidas por electroeyaculación.

Variable	n	Media (10^6 spz/ml)	\pm DS	(%) CV	Máximo	Mínimo
Concentración	16	72,92	35,33	48,45	144,4	27,4

Leyenda: N: número de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad.

La concentración espermática fue superior a lo reportado por Laruta *et al.*, (2016) de $39,14 (10^6/\text{ml}) \pm 11,22 (10^6/\text{ml})$; inferior a lo reportado por Ccoiso (2019) de $101,71 (10^6/\text{ml}) \pm 39,52 (10^6/\text{ml})$; Fumuso y Giuliano (2018) de $98 (10^6/\text{ml}) \pm 75 (10^6/\text{ml})$ y Gallegos (2019) de $97,14 (10^6/\text{ml}) \pm 44,22 (10^6/\text{ml})$. Las diferencias serian método de evaluación, condición medioambiental, cantidad de animales utilizada y la frecuencia de colección.

f. Vitalidad espermática

La vitalidad espermática de semen obtenida en este estudio se presenta en la Tabla 30.

Tabla 30. Vitalidad, integridad acrosomal y funcionalidad de la membrana espermática en semen fresco de las llamas colectados por electroeyaculación.

Variable	n	Media (%)	± DS	(%) CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
Vitalidad	16	68,44	4,56	6,67	76,4	60,5
Integridad acro.	16	77,31	6,13	7,93	86,2	64,2
HOST	16	65,84	7,09	10,77	83,9	56,5

Leyenda: N: número de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad.

Nota: Número de animales utilizados 8 con 2 repeticiones.

La media de la vitalidad espermática en esta investigación fue superior a lo reportado por Fumuso y Giuliano (2018) de 62,10 % ± 11,60 %; Ccoiso (2019) de 64,56 % ± 13,54 % y Casaretto *et al.*, (2012) de 52,24 % ± 17,98 %; inferior a lo reportado por Laruta *et al.*, (2016) de 86,67 % ± 5,77 %. Las diferencias estarían dadas por el tipo de tinción, condición medio ambiental, calibración de microscopio que usaron los autores mencionados para evaluar la vitalidad espermática.

g. Integridad acrosomal

La integridad acrosomal de semen de llama se muestra en la Tabla 30.

La integridad acrosomal fue superior a lo reportado por Carretero *et al.*, (2015) de 64,44 % ± 13,60 % y Ccoiso (2019) de 59,33 % ± 7,16 %; inferior a lo reportado por Fumuso y Giuliano (2018) de 96,80 % ± 3,60 % y Fumuso *et al.*, (2014) de 81,51 % ± 10,95 %. Las diferencias estarían dadas por el método de evaluación, factor animal y tipo de las tinciones usadas.

h. Funcionalidad de la membrana espermática (HOST)

La funcionalidad de la membrana espermática se muestra en el la Tabla 30.

La media de la funcionalidad de la membrana espermática fue superior a lo reportado por Fumuso y Giuliano (2018) de 34,0 % ± 10,50 %; Ccoiso (2019) de 57,33 % ± 8,91 %; Flores (2014) de 40,06 % ± 12,17 %; Rodríguez (2013) de 38,2 % ± 7,20 % y Giuliano (2010) de 42,35 % ± 15,03 %; las diferencias estarían dadas por el método de evaluación, factor animal.

i. Morfometría espermática

Los resultados de morfometría espermática para los parámetros de las regiones de la cabeza y forma de la cabeza del espermatozoide, se muestra en la Tabla 31, donde se observa los promedios totales de cada uno de los parámetros de morfometría como de longitud, ancho, área, perímetro, % acrosomal, elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad de 8 animales.

Tabla 31. Parámetros de la morfometría espermática en semen fresco de llamas colectados por electroeyaculación.

Región	Parámetros	Media	± DS	(%) CV	Máximo	Mínimo
Cabeza	Longitud (µm)	5,90	0,35	5,94	6,42	5,19
	Ancho (µm)	3,30	0,12	3,64	3,53	3,08
	Área (µm ²)	16,04	1,02	6,36	17,52	14,48
	Perímetro (µm)	17,58	0,71	4,03	19,02	16,30
	% de Acrosoma	40,85	3,82	9,35	50,62	33,34
forma de la cabeza	Elipticidad	1,80	0,11	6,18	2,11	1,65
	Rugosidad	0,66	0,03	3,80	0,71	0,61
	Elongación	0,28	0,03	8,87	0,34	0,24
	Regularidad	0,96	0,01	1,22	0,99	0,95

Leyenda: DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad.

Los resultados obtenidos fueron superiores a lo reportado por Gallegos (2019), longitud de 5,23 µm ± 0,39 µm; ancho de 3,10 µm ± 0,27 µm; área de 13,55 µm² ± 1,16 µm²; perímetro de 16,61 µm ± 1,43 µm; pero el porcentaje acrosomal es inferior de 51,67 ± 6,23; y la forma de la cabeza, también es superior; elipticidad de 1,70 ± 0,60; rugosidad de 0,62 ± 0,07; elongación de 0,26 ± 0,04; regularidad de 0,94 ± 0,05, estudios realizados en el centro experimental CICAS La Raya, en llamas colectada por el método de electroeyaculación. Soler *et al.*, (2014), longitud de 5,50 µm ± 0,70 µm; pero similar en cuanto al ancho (3,40 µm ± 0,40 µm); superior área de 13,70 µm² ± 2,80 µm²; perímetro de 14,10 µm ± 1,60 µm; elipticidad de 0,20 ± 0,10; inferior rugosidad de 0,90 ± 0,10; regularidad de 1,10 ± 0,10; estudios realizados en el centro experimental CICAS - La Raya, en llamas colectada por el método de vagina artificial. Inferior a lo reportado por Casaretto *et al.*, (2011), longitud de 6,60 µm ± 3,83 µm;

ancho de $4,14 \mu\text{m} \pm 2,78 \mu\text{m}$; área de $20,09 \mu\text{m}^2 \pm 2,75 \mu\text{m}^2$; perímetro de $18,54 \mu\text{m} \pm 0,47 \mu\text{m}$; rugosidad de $1,28 \pm 3,70$ y elongación de $1,59 \pm 1,02$; estudio realizado en Argentina en llamas colectada por electroeyaculación. Las diferencias estarían dadas por el método de evaluación, método de colecta, factor animal, número de espermatozoides evaluados, intervalo de colecta y equipo utilizado.

5.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN REFRIGERADO

a. Motilidad total

Los resultados de motilidad total de llamas en el proceso de refrigerado, se observan en la Tabla 32, encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los dilutores.

Tabla 32. Motilidad total en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

Dilutor	n	Media (%)	± DS	(%) CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
Dilutor 1	16	20,76 ^a	13,06	62,91	45,8	6,0
Dilutor 2	16	20,00 ^a	11,96	59,82	44,8	2,3
Dilutor 3	16	12,35 ^b	6,39	51,77	23,3	4,4
Dilutor 4	16	14,34 ^{ab}	7,79	54,34	27,9	3,9

Leyenda: N: número de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad.

Letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Nota: Número de animales utilizados 8 con 2 repeticiones.

Los valores obtenidos de la motilidad total muestran que el dilutor 1 con glicerol al 5 % es similar al dilutor 2 con glicerol al 7 %, pero superior al dilutor 3 y esta es similar al dilutor 4. El dilutor 2 con glicerol al 7 % fue superior a lo reportado por Carretero y Giuliano (2014) de $14,70 \% \pm 15,50 \%$; mientras que el dilutor 3 con DMFA al 7 % fue inferior al reporte del autor ya mencionado de $40,00 \% \pm 13,50 \%$. Con referencias a los dilutores 1 y 4 no se tiene ningún reporte en llamas, pero si en alpacas mostrando resultado para el dilutor 4 DMFA al 9 % mostrando resultado inferior al reporte de Ciprian (2019) de $37,40 \% \pm 16,99 \%$, aplicando el método de colección por electroeyaculación.

b. Parámetros de la motilidad

Los valores de VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, ALH y BCF obtenido en espermatozoides de llamas mantenidas en refrigeración, se observan en la Tabla 33.

Para VCL, VSL, VAP, WOB, ALH y BCF se han encontrado diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dilutores y para STR y LIN no se encontraron diferencias ($p > 0,05$) entre los dilutores.

Tabla 33. Porcentaje de parámetros de la motilidad en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

VARIABLE	Dilutor							
	1		2		3		4	
	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS
VCL ($\mu\text{m/s}$)	47,56 ^a	14,32	48,29 ^a	12,50	35,54 ^b	7,52	33,88 ^b	7,68
VSL ($\mu\text{m/s}$)	13,46 ^a	2,81	12,75 ^a	2,36	10,65 ^b	1,34	10,63 ^b	1,31
VAP ($\mu\text{m/s}$)	26,76 ^a	6,02	26,21 ^a	5,29	21,74 ^b	4,26	21,07 ^b	4,28
STR (%)	35,52 ^a	10,98	32,57 ^a	6,53	36,40 ^a	6,41	37,86 ^a	7,09
LIN (%)	53,93 ^a	9,67	51,64 ^a	6,18	53,04 ^a	7,34	54,61 ^a	7,16
WOB (%)	62,14 ^{ab}	8,05	60,09 ^b	6,45	65,69 ^a	5,02	66,12 ^a	4,41
ALH (μm)	2,68 ^a	0,64	2,74 ^a	0,56	2,11 ^b	0,32	2,04 ^b	0,31
BCF (Hz)	3,68 ^a	1,17	3,46 ^{ab}	1,01	2,96 ^{ab}	1,09	2,74 ^b	1,13

Leyenda: DS: Desviación estándar; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio de desplazamiento; STR: Índice de rectitud; LIN: Porcentaje de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza; BCF: Frecuencia de batida. Letras distintas en filas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

No se tiene ningún reporte en llamas, pero si en alpacas mostrando que el dilutor 2 glicerol al 7 % muestra resultado superior a lo reporte por Ciprian (2019), VCL de $46,74 \mu\text{m/s} \pm 13,70 \mu\text{m/s}$; VSL de $10,36 \mu\text{m/s} \pm 3,53 \mu\text{m/s}$; VAP de $18,95 \mu\text{m/s} \pm 5,56 \mu\text{m/s}$; ALH de $1,04 \mu\text{m} \pm 0,89 \mu\text{m}$; BCF de $2,77 \text{Hz} \pm 2,37 \text{Hz}$; también dilutor 3 DMFA al 7 % y dilutor 4 DMFA al 9 % muestran resultados inferiores al reporte del mismo autor ya mencionado (VCL de $53,15 \mu\text{m/s} \pm 10,80 \mu\text{m/s}$; VSL de $12,09 \mu\text{m/s} \pm 3,72 \mu\text{m/s}$; VAP de $22,08 \mu\text{m/s} \pm 5,39 \mu\text{m/s}$; superior ALH de $1,71 \mu\text{m} \pm 1,11 \mu\text{m}$; inferior BCF de

4,04 Hz \pm 2,63 Hz); (VCL de 53,49 μ m/s \pm 11,30 μ m/s; VSL de 11,52 μ m/s \pm 3,47 μ m/s; VAP de 23,18 μ m/s \pm 4,69 μ m/s; superior ALH de 1,36 μ m \pm 0,94 μ m; inferior BCF de 3,11 Hz \pm 2,40 Hz); también el dilutor 3 DMFA al 7 % es inferior al reporte de Quispe (2018), VCL de 53,47 μ m/s \pm 8,68 μ m/s; VSL de 14,64 μ m/s \pm 2,11 μ m/s; VAP de 26,90 μ m/s \pm 2,15 μ m/s; superior LIN de 27,93 % \pm 5,29 %; inferior STR de 54,56 % \pm 7,35 %; superior WOB de 51,00 % \pm 4,90 %; similar ALH de 2,18 μ m \pm 0,76 μ m e inferior BCF de 4,31 Hz \pm 2,10 Hz; aplicando el método de colección por EE y VA.

c. Vitalidad espermática

Como resultado del análisis de la vitalidad espermática se observa en la Tabla 34, se han encontrado diferencias ($p < 0,05$) entre los dilutores.

Tabla 34. Vitalidad espermática en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

Dilutor	n	Media (%)	\pm DS	(%) CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
Dilutor 1	16	59,31 ^a	4,42	7,46	66,9	51,1
Dilutor 2	16	56,76 ^{bc}	4,51	7,95	65,8	49,6
Dilutor 3	16	55,28 ^c	4,28	7,75	64,5	47,3
Dilutor 4	16	57,91 ^{ab}	4,22	7,28	65,8	50,6

Leyenda: N: número de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad.

Letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Nota: Número de animales utilizados 8 con 2 repeticiones.

Los valores de la vitalidad espermática muestran que el dilutor 1 (glicerol 5 %) fue superior al dilutor 3 (DMFA 7 %), pero es relativamente similar al dilutor 2 (glicerol 7%) y dilutor 4 (DMFA 9 %). El glicerol al 5 % es superior posiblemente a que tiene menor porcentaje de crioprotector por lo que la citotoxicidad sería menor. No se tiene ningún reporte en llamas, pero si en alpacas mostrando que el dilutor 2 glicerol al 7 % muestra resultado superior a lo reportado por Ciprian (2019) de 53,74 % \pm 8,07 %; y los resultados del dilutor 3 DMFA al 7 % es similar al reporte del mismo autor (56,89 % \pm 10,47 %), pero inferior a lo reportado por Quispe (2018) de 61,58 % \pm 11,65 %; mientras que el dilutor 4 DMFA al 9 % fue superior al reporte del primer autor ya mencionado de 89 % \pm 8,42 %, aplicando el método de colección por

electroeyaculación y vagina artificial. Esta diferencia posiblemente método de colecta, la calidad inicial de la muestra, el tipo de dilutor, los tipos de tinción supravital.

d. Integridad acrosomal

Los resultados de la integridad acrosomal en el proceso de refrigeración, se observa en la Tabla 35, no se hallaron diferencias ($p > 0,05$) entre los dilutores.

Tabla 35. Integridad acrosomal en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

Dilutor	n	Media (%)	± DS	(%) CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
Dilutor 1	16	71,38 ^a	6,32	8,86	81,3	60,9
Dilutor 2	16	69,91 ^a	6,63	9,49	79,3	59,3
Dilutor 3	16	69,11 ^a	6,39	9,25	79,0	59,2
Dilutor 4	16	70,49 ^a	6,63	9,40	80,7	60,8

Leyenda: N: número de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad.

Letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Nota: Número de animales utilizados 8 con 2 repeticiones.

No se encontraron diferencias significativas entre los cuatro dilutores, no se tiene ningún reporte en llamas, pero si en alpacas mostrando que el dilutor 3 DMFA al 7 % muestra resultado superior al reporte de Quispe (2018) de 65,45 % ± 13,62 %; aplicando el método de colección de vagina artificial.

e. Morfometría espermática

Los valores obtenidos de longitud, ancho, área, perímetro, porcentaje acrosomal, elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad, de espermatozoides de llamas mantenidas en refrigeración, se observan en la Tabla 36.

Para las variables como longitud, ancho, área, perímetro, porcentaje acrosomal, elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad no se hallaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los dilutores. No se tiene ningún reporte en llamas ni en alpacas.

Tabla 36. Porcentaje de parámetros morfométricos de la cabeza y forma de cabeza en semen refrigerado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

Parámetros Morfométricos		Dilutor							
		1		2		3		4	
		Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS
Cabeza	Longitud (µm)	5,57 ^a	0,25	5,57 ^a	0,26	5,62 ^a	0,26	5,61 ^a	0,29
	Ancho (µm)	3,15 ^a	0,10	3,15 ^a	0,11	3,18 ^a	0,10	3,17 ^a	0,12
	Área (µm ²)	14,70 ^a	0,89	14,70 ^a	0,91	14,98 ^a	0,86	14,85 ^a	1,10
	Perímetro (µm)	16,57 ^a	1,19	16,46 ^a	0,94	16,92 ^a	1,07	16,90 ^a	1,23
	Acrosoma (%)	47,87 ^a	5,55	48,59 ^a	5,47	49,29 ^a	4,24	49,83 ^a	3,44
Forma de la cabeza	Elipticidad	1,78 ^a	0,08	1,78 ^a	0,08	1,78 ^a	0,09	1,78 ^a	0,08
	Rugosidad	0,69 ^a	0,07	0,70 ^a	0,04	0,67 ^a	0,06	0,74 ^a	0,29
	Elongación	0,28 ^a	0,02	0,28 ^a	0,02	0,28 ^a	0,02	0,28 ^a	0,02
	Regularidad	0,94 ^a	0,01	0,94 ^a	0,01	0,94 ^a	0,01	0,94 ^a	0,01

Leyenda: D.S: Desviación estándar; µm: Micrómetros.

Letras distintas en la misma fila muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$); Longitud; Ancho; Área; Perímetro; Porcentaje de acrosoma; Elipticidad; Rugosidad; Elongación; Regularidad.

5.3. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN DESCONGELADO

a. Motilidad total

Los resultados de motilidad total en el proceso de descongelado, se observan en la Tabla 37, no se fueron halladas diferencias ($p > 0,05$) entre los dilutores.

Tabla 37. Porcentaje de motilidad total en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

Dilutor	n	Media (%)	± DS	(%) CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
Dilutor 1	16	10,01 ^a	5,34	53,34	23,6	4,0
Dilutor 2	16	11,54 ^a	7,41	64,20	30,3	4,6
Dilutor 3	16	8,28 ^a	2,50	30,20	12,4	5,2
Dilutor 4	16	7,66 ^a	4,05	52,91	16,0	2,3

Leyenda: N: Numero de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente de variabilidad.

Letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Nota: Número de animales utilizados 8 con 2 repeticiones.

Los resultados muestran que el dilutor 2 (glicerol 7 %) fue superior a lo reportado por Carretero y Giuliano (2014) GLI 7 % de 0,80 – 1,80 %; pero el resultado del dilutor 3 (DMFA al 7 %) fue inferior al reporte del autor anteriormente mencionado (22,00 – 11,70). En cuanto a los dilutor 1 (glicerol al 5 %) y dilutor 4 (DMFA al 9 %) no se encontraron reportes en llamas, pero si en alpacas mostrando que el dilutor 4 (DMFA 9 %) muestra resultado inferior a lo reportado por Ciprian (2019) de 8,85 % ± 5,86 %. La diferencia podría ser al método de evaluación realizado, tiempo de descongelado (días), método de colecta, especie, tipo de dilutor, crioprotector utilizado.

b. Parámetros de la motilidad

Los valores de VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, ALH y BCF obtenido en espermatozoides de llamas luego de ser descongelados, se observan en la Tabla 38.

Para VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, ALH y BCF no se hallaron diferencias entre los dilutores ($p > 0,05$).

Tabla 38. Parámetros de la motilidad en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

VARIABLE	Dilutor							
	1		2		3		4	
	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS
VCL (µm/s)	34,68 ^a	6,43	32,82 ^a	4,91	32,22 ^a	4,59	32,10 ^a	4,49
VSL (µm/s)	10,57 ^a	1,36	10,72 ^a	1,24	10,79 ^a	1,88	10,00 ^a	1,18
VAP (µm/s)	20,45 ^a	2,99	19,98 ^a	2,06	20,09 ^a	3,05	19,31 ^a	2,29
STR (%)	37,89 ^a	5,88	40,87 ^a	5,50	40,69 ^a	5,42	39,36 ^a	5,38
LIN (%)	55,98 ^a	6,34	58,23 ^a	3,99	57,66 ^a	5,76	55,77 ^a	6,59
WOB (%)	64,51 ^a	4,22	66,64 ^a	6,71	67,05 ^a	4,26	66,19 ^a	5,37
ALH (µm)	2,16 ^a	0,29	2,01 ^a	0,24	1,98 ^a	0,22	1,98 ^a	0,23
BCF (Hz)	2,41 ^a	0,60	2,54 ^a	0,53	2,29 ^a	0,57	2,34 ^a	0,83

Leyenda: DS: Desviación estándar; µm/s: Micrómetros por segundo; VCL: Velocidad curvilínea; VSL: Velocidad rectilínea; VAP: Velocidad promedio de desplazamiento; STR: Índice de rectitud; LIN: Porcentaje de linealidad; WOB: Índice de oscilación; ALH: Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza; BCF: Frecuencia de batida.

Letras distintas en la misma fila muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

No se tiene ningún reporte en llamas, pero si en alpacas mostrando que el dilutor 2 glicerol al 7 % muestra resultados superiores a lo reporte por Ciprian (2019); VCL de 19,44 µm/s ± 13,10 µm/s; VSL de 4,72 µm/s ± 3,39 µm/s; VAP de 8,39 µm/s ± 5,78 µm/s, ALH de 0,09 µm ± 0,17 µm; BCF de 0,28 Hz ± 0,58 Hz y también dilutor 3 DMFA al 7 % y dilutor 4 DMFA al 9 % muestra resultado inferiores al reporte del mismo autor ya mencionado (VCL de 38,54 µm/s ± 17,10 µm/s; superior VSL de 8,99 µm/s ± 4,63 µm/s; VAP de 16,30 µm/s ± 6,71 µm/s; ALH de 0,38 µm ± 0,73 µm; BCF de 0,96 Hz ± 1,93 Hz), (VCL de 38,64 µm/s ± 20,30 µm/s; superior VSL de 9,68 µm/s ± 5,53 µm/s; VAP de 17,77 µm/s ± 8,52 µm/s; ALH de 0,48 µm ± 0,43 µm; BCF de 1,09 Hz ± 1,10 Hz), también el dilutor 3 es superior al reporte de Quispe (2018); VCL de 29,90 µm/s ± 13,63 µm/s; inferior VSL de 16,28 µm/s ± 25,27 µm/s; superior VAP de 17,18 µm/s ± 4,51 µm/s; LIN de 29,38 % ± 3,99 %; inferior STR de 52,55 % ± 5,10 %; superior WOB de 56,05 % ± 6,49 %; ALH de 0,81 µm ± 0,62 µm y BCF de 0,99 Hz ± 0,93 Hz; aplicando el método de colección por EE y VA. La diferencia probablemente se da por

el tipo de crioprotector utilizado y según los resultados podría indicarse que el glicerol protege de mejor manera a las células espermáticas en la etapa de criopreservación.

c. Vitalidad espermática

Los resultados de espermatozoides vivos existentes después del proceso de congelamiento, se observa en la Tabla 39, estos resultados muestran diferencias ($p < 0,05$) entre los dilutores.

Tabla 39. Vitalidad espermática en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

Dilutor	n	Media (%)	± DS	(%) CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
Dilutor 1	16	37,23 ^a	5,36	14,40	45,4	28,1
Dilutor 2	16	34,31 ^b	5,03	14,66	42,9	26,6
Dilutor 3	16	33,20 ^c	4,86	14,65	39,8	25,4
Dilutor 4	16	35,05 ^b	4,77	13,62	42,9	26,7

Leyenda: N: Numero de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente variabilidad.

Letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Nota: Número de animales utilizados 8 con 2 repeticiones.

Los valores obtenidos de la vitalidad espermática colectado por electroeyaculación con una curva rápida, donde se muestra que el dilutor 1 con glicerol al 5 % es superior al dilutor 2 glicerol al 7 %; 3 DMFA al 7 % y 4 DMFA al 9 %, no se tiene ningún reporte en llamas, pero si en alpacas mostrando que el dilutor 2 glicerol al 7 %; dilutor 3 DMFA al 7 % y dilutor 4 DMFA al 9 % muestra resultados inferiores al reporte de Ciprian (2019); glicerol 7 % de 46,52 % ± 9,36 %; DMFA al 7 % de 48,27 % ± 7,07 %; DMFA al 9 % de 48,62 % ± 10,78 %; también el resultado obtenido es inferior a lo reportado por Quispe (2018); DMFA al 7 % de 44,97 % ± 9,43 %, aplicando el método de colección por EE y VA, en cuanto al dilutor 1 glicerol al 5 % no se tiene reporte en llamas ni en alpacas. La diferencia del protocolo 1 con los demás protocolos se debe probablemente a que menor porcentaje de glicerol protege de mejor manera la membrana de los espermatozoides.

d. Integridad acrosomal

Los resultados de integridad acrosomal de llamas en el proceso de descongelado, no se encontraron diferencias ($p > 0,05$) entre los dilutores (Tabla 40).

Tabla 40. Integridad acrosomal en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

Dilutor	n	Media (%)	± DS	(%) CV	Máximo (%)	Mínimo (%)
Dilutor 1	16	68,38 ^a	6,60	9,66	78,8	58,7
Dilutor 2	16	66,73 ^a	6,46	9,68	76,4	56,6
Dilutor 3	16	66,24 ^a	6,64	10,02	76,2	55,5
Dilutor 4	16	67,40 ^a	6,67	9,90	77,4	56,9

Leyenda: N: Numero de colecta; DS: Desviación estándar; CV: Coeficiente variabilidad.

Letras distintas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Nota: Número de animales utilizados 8 con 2 repeticiones.

Los valores obtenidos de la integridad acrosomal congelados con una curva rápida, no mostraron diferencias entre los cuatro dilutores planteados esto se debe posiblemente a que cuando se somete a diferentes porcentajes de crioprotector la reacción acrosomal es menor. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, dilutor 2 glicerol al 7 % y dilutor 3 DMFA al 7 % son superiores a lo reportado por Carretero y Giuliano (2014) GLI 7 % de 22,4 % ± 10,0 %; DMFA 7 % de 24,2 % ± 13,00 %; este estudio se realizó en semen de llamas con muestras colectadas por el método de electroeyaculación en Argentina. Del mismo modo que el dilutor 3 DMFA al 7 % también muestra superior al reporte de Quispe (2018) de 53,79 % ± 8,94 % en alpacas por VA, en cuanto a los dilutores 1 glicerol 5 % y 4 DMFA al 9 %, no se tiene ningún reporte en llamas ni en alpacas.

e. Morfometría espermática

Los valores de longitud, ancho, área, perímetro, porcentaje acrosomal, elipticidad, rugosidad y elongación no se hallaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los cuatro dilutores, se observa en la Tabla 41, pero en regularidad si se encontró diferencia.

Tabla 41. Porcentaje de parámetros morfométricos de la cabeza y forma de cabeza en semen descongelado de llamas colectado por electroeyaculación, utilizado dos niveles de glicerol y DMFA.

Parámetros Morfométricos		Dilutor							
		1		2		3		4	
		Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS	Media	± DS
Cabeza	Longitud (µm)	5,63 ^a	0,24	5,58 ^a	0,25	5,71 ^a	0,28	5,66 ^a	0,27
	Ancho (µm)	3,15 ^a	0,13	3,16 ^a	0,12	3,22 ^a	0,13	3,19 ^a	0,15
	Área (µm ²)	14,94 ^a	1,08	14,81 ^a	1,03	15,35 ^a	1,18	15,10 ^a	1,18
	Perímetro (µm)	16,14 ^a	0,75	16,09 ^a	0,87	16,64 ^a	0,90	16,53 ^a	0,88
	% de Acrosoma	48,92 ^a	4,44	48,29 ^a	3,64	49,03 ^a	4,13	49,02 ^a	3,18
Forma de la cabeza	Elipticidad	1,80 ^a	0,06	1,78 ^a	0,07	1,78 ^a	0,07	1,78 ^a	0,07
	Rugosidad	0,72 ^a	0,03	0,72 ^a	0,04	0,70 ^a	0,03	0,70 ^a	0,03
	Elongación	0,28 ^a	0,02	0,28 ^a	0,02	0,28 ^a	0,02	0,28 ^a	0,02
	Regularidad	0,93 ^b	0,01	0,94 ^{ab}	0,01	0,94 ^a	0,01	0,94 ^{ab}	0,01

Leyenda: DS: Desviación estándar; µm: Micrómetros.

Letras distintas en filas muestran diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$); Longitud; Ancho; Área; Perímetro; % de acrosoma; Elipticidad; Rugosidad; Elongación; Regularidad.

No se tiene ningún reporte en llamas, pero si en alpacas mostrando que el dilutor 2 (glicerol al 7 %) muestra resultados similares a lo reporte por Ciprian (2019); longitud de $5,50 \mu\text{m} \pm 0,49 \mu\text{m}$; ancho de $3,09 \mu\text{m} \pm 0,30 \mu\text{m}$; área de $14,14 \mu\text{m}^2 \pm 1,81 \mu\text{m}^2$; perímetro de $16,56 \mu\text{m} \pm 1,44 \mu\text{m}$; inferior acrosoma de $50,08 \% \pm 7,26 \%$; similar elipticidad de $1,79 \% \pm 0,22 \%$; rugosidad de $0,65 \% \pm 0,07 \%$; elongación de $0,27 \% \pm 0,05 \%$; regularidad de $0,94 \% \pm 0,04 \%$; y también dilutor 3 (DMFA al 7 %) y dilutor 4 (DMFA 9 %) muestran resultados similares al reporte del mismo autor ya mencionado (largo de $5,56 \mu\text{m} \pm 0,48 \mu\text{m}$, ancho de $3,10 \mu\text{m} \pm 0,29 \mu\text{m}$; superior área de $14,36 \mu\text{m}^2 \pm 1,85 \mu\text{m}^2$; inferior perímetro de $16,56 \mu\text{m} \pm 1,41 \mu\text{m}$; porcentaje acrosomal de $49,07 \% \pm 7,62 \%$; elipticidad $1,80 \% \pm 0,20 \%$; rugosidad de $0,66 \% \pm 0,07 \%$; elongación de $0,28 \% \pm 0,05 \%$ y regularidad de $0,94 \% \pm 0,04 \%$), (largo de $5,45 \mu\text{m} \pm 0,49 \mu\text{m}$; ancho de $3,15 \mu\text{m} \pm 0,34 \mu\text{m}$; superior área de $14,24 \mu\text{m}^2 \pm 1,84 \mu\text{m}^2$; similar perímetro de $16,52 \mu\text{m} \pm 1,40 \mu\text{m}$; porcentaje acrosomal de $49,17 \% \pm 7,23 \%$; elipticidad de $1,80 \% \pm 0,21 \%$; rugosidad de $0,65 \% \pm 0,06 \%$; elongación de $0,28 \% \pm 0,05 \%$ y regularidad de $0,94 \% \pm 0,05 \%$), también el dilutor 3 DMFA al 7 % es similar al reporte de Flores (2015); largo de $5,68 \mu\text{m} \pm 0,68 \mu\text{m}$; ancho de $3,10 \mu\text{m} \pm 0,45 \mu\text{m}$; superior área de $14,50 \mu\text{m}^2 \pm 2,70 \mu\text{m}^2$; similar perímetro de $16,89 \mu\text{m} \pm 2,42 \mu\text{m}$; elipticidad de $1,82 \% \pm 0,33 \%$; rugosidad de $0,63 \% \pm 0,13 \%$; elongación de $0,29 \% \pm 0,08 \%$; regularidad de $0,96 \% \pm 0,07 \%$; aplicando el método de colección por EE.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

1. Dentro de las características macroscópicas del semen fresco; el volumen seminal tuvo una media de $3,69 \text{ ml} \pm 0,75 \text{ ml}$; color seminal (blanco cristalino 75 % y blanco lechoso 25 %); pH seminal tiene una media de $7,34 \pm 0,24$; filancia de $3,53 \text{ cm} \pm 0,54 \text{ cm}$; la motilidad total fue de $43,28 \% \pm 15,15 \%$; concentración de $72,92 (10^6/\text{ml}) \pm 35,33 (10^6/\text{ml})$; vitalidad de $68,44 \% \pm 4,56 \%$; integridad acrosomal de $77,31 \% \pm 6,13 \%$; HOST de $65,84 \% \pm 7,09 \%$; parámetros de la morfometría (longitud $5,90 \mu\text{m} \pm 0,35 \mu\text{m}$; ancho $3,30 \mu\text{m} \pm 0,12 \mu\text{m}$; área $16,04 \mu\text{m}^2 \pm 1,02 \mu\text{m}^2$; perímetro $17,58 \mu\text{m} \pm 0,71 \mu\text{m}$; porcentaje acrosomal $40,85 \% \pm 3,82 \%$; elipticidad $1,80 \pm 0,11$; rugosidad $0,66 \pm 0,03$; elongación $0,28 \pm 0,03$; regularidad $0,96 \pm 0,01$).
2. Se hallaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para las características microscópicas de motilidad total, vitalidad y para los parámetros cinéticos de VCL, VSL, VAP, WOB, ALH, BCF; mientras que para STR y LIN, integridad acrosomal y morfometría, no se encontró diferencias ($p > 0,05$) de muestras refrigeradas en los cuatro dilutores propuestos, siendo el Dilutor 1 (glicerol 5 %) el que presentó mejores resultados.
3. En las muestras congeladas, se observaron que los parámetros cinéticos (VCL, VSL, VAP, WOB, ALH, BCF, STR y LIN), vitalidad y de morfometría (regularidad) presentaron diferencias ($p < 0,05$) entre tratamientos, pero la motilidad total, integridad acrosomal y para las variables morfométricas (largo, ancho, área, perímetro, porcentaje de acrosoma, elipticidad y elongación) no fueron afectadas por los dilutores evaluados, pero en general los mejores resultados se obtuvieron con el dilutor 1 (glicerol 5 %), siendo superior a los Dilutor 2 (glicerol 7 %), Dilutor 3 (DMFA 7 %) y Dilutor 4 (DMFA 9 %).

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar trabajos complementarios a este estudio, donde se puede evaluar más características microscópicas como funcionalidad de la membrana espermática y fragmentación de ADN espermático en semen refrigerado y descongelado, usando glicerol y dimetilformamida.
- Se recomienda realizar repeticiones de esta investigación con los dilutores glicerol al 5 % y 7 %, dimetilformamida al 7 % y 9 %, utilizando el método colecta de vagina artificial y post copula puesto que muchos investigadores indican que estos métodos son mejores y no afectan el bienestar animal.
- Se recomienda realizar trabajos de inseminación artificial en llamas con semen descongelado aplicando el dilutor 1 (glicerol 5 %) y determinar la tasa de preñez, puesto que los resultados de motilidad, vitalidad e integridad acrosomal fueron relativamente superiores a los dilutor 2, 3 y 4, además estos parámetros nos indican que las células espermáticas no sufrieron daño.

CAPÍTULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALARCÓN, V. GARCÍA, W. & BRAVO, PW. 2012. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev. Inv. Vet. Perú*, 23(1): 58-64.
2. ALLER, JF. REBUFFI, GE. CANCINO, AK. & ALBERIO, RH. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec.* 52, 15–23.
3. ALVARENGA, MA; LANDIM-ALVARENGA, FC; MOREIRA, RM & CESARINO, MM. 2000. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Veterinary Journal*, 32(6), 541-545. <https://doi.org/10.2746/042516400777584749>.
4. ALVARENGA, MA; LEÃO, KM; PAPA, FO; LANDIM-ALVARENGA, FC; MEDEIROS, ASL. & GOMES, GM. 2005. Amides as an alternative cryoprotectors for freezing stallion semen: A review. *Anim. Reprod. Science* 89(1-4):105-13. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>.
5. AMANN, RP. 1999. Criopreservación de esperma. En: *Enciclopedia de Reproducción*. E Knobil y JD Neill (eds) Burlington, MA: Academic Press: 773-783.
6. ARGAÑARAZ, ME; APICHELA, SA; ZAMPINI, R; VENCATO, J. & STELLETTA, C. 2015. Biochemical and protein profile of alpaca (*Vicugna pacos*) uterine horn fluid during early pregnancy. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 50(1), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.013>.
7. AVILA, PLM; MADERO, JI; LÓPEZ, C; LEÓN, MF; ACOSTA, L; GÓMEZ, C; DELGADO, LG; LOZANO, JM. & REGUERO, MT. 2006. Basic points in cryopreservation. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*. Vol. 57, N° 4. Pág. 291-300.

8. AX, RLM; DALLY, BA; DIDION, RW; LENZ, CC; LOVE, DD; VARNER, B; HAFEZ & BELLIN, ME. 2000. Inseminación artificial, capítulo 25. Reproducción e inseminación artificial en los animales. Editorial Interamericana MC Graw Hill. México.
9. BACA, L. 1998. Evaluación del tiempo optimo del equilibrado con tres dilutores en el congelamiento de semen de alpacas (Doctoral dissertation, Thesis. Univ. Nac. San Antonio Abad, Cusco, Peru).
10. BEARDEN, & FUQUAY. 1980. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. México.: 2da ed, Ed. El Manual Moderno. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2003.tb02714.x>.
11. BRAVO, P; FLORES, D. & ORDOÑEZ, C. 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Biol. Reprod.*, 47: 619 – 626. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00020-4).
12. BRAVO, PW. 1995. Reproductive biology of the male South American camelid: A review. *Molecular Andrology VII*: 3-4.
13. BRAVO, PW; CCALLO, M. & GARNICA, J. 2000. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Rumin Res*; 38:91–5. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(00\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(00)00142-5)Get rights and content.
14. BRAVO, PW; ORDOÑEZ, C. & ALARCÓN, V. 1996. Processing and freezing of semen of.
15. BRAVO, PW; PACHECO, C; QUISPE, C; VILCAPAZA, L & ORDOÑEZ, C. 1999. Degelification of alpaca sêmen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Archives of Andrology 43*: 239-246.
16. 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. *Theriogenoly*, 57:1207 - 1218. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00724-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00724-5).

17. BUSTINZA, V. 2001. La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje, Universidad Nacional del Altiplano.
18. CARBALLO, DM. 2009. Comparación de los diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo.
19. CÁRDENAS, N. 2002. Inseminación artificial con espermatozoides congelados colectados de los conductos deferentes en alpacas. Tesis pregrado. FMVZ-UNA, Puno.
20. 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.
21. CARRETERO, M; GIULIANO, S; GAMBAROTTA, M; NEILD, D; ARRAZTOA, C. & LOMBARDO, D. 2012. Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Anim. Reprod. Sci.*, 131 (1-2): 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.02.008>.
22. CARRETERO, MI; CHAVES, MG; ARRAZTOA, CC; FUMUSO, FG; GAMBAROTTA, MC; NEILD, DM. 2020. Air-Drying Llama Sperm Affects DNA Integrity. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires Argentina.
23. CARRETERO, MI; FUMUSO, FG; NEILD, DM; GIULIANO, SM; CÉTICA, P. & MIRAGAYA, MH. 2015. Evaluation of the acrosomal status in Lama glama sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Animal Reproduction Science*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.06.014>.
24. CARRETERO, MI; NEILD, DM; FERRANTE, A; CALDEVILLA, M; ARRASTOA, CC; FUMUSO, FG & GIULIANO, SM. 2014. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of Lama glama spermatozoa. *First International Journal Andrology*. <https://doi.org/10.1111/and.12319>.
25. CARRETERO, MI; NEILD, DM; FERRANTE, A; CALDEVILLA, M; ARRAZTOA, CC; FUMUSO, FG. & GIULIANO, SM. 2014. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of llama (*Lama glama*)

- spermatozoa. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires Argentina. <https://doi.org/10.1111/and.12319>.
26. CASARETTO, C; LOMBARDO, D; GIULIANO, S; GAMBAROTTA, M; CARRETERO, M. & MIRAGAYA, M. 2012. Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head. *Andrología*. 44:424-430. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01200.x>.
 27. CASARETTO, C; LOMBARDO, DM; GIULIANO, S; GAMBAROTTA, M; CARRETERO, MI. & MIRAGAYA, MH. 2011. Morphometric Analysis of llama (*Lama glama*) Sperm head. Cátedra de Teriogeneología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01200.x>.
 28. CAYO, S. 2013. Inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen fresco, refrigerado y congelado colectado por el método de electro eyaculación. Tesis pregrado. FAZ – UNSAAC, Cusco.
 29. CAYO, S; ORDÓÑEZ, C; CUCHO, H; AMPUERO, E. & ANTEZANA, W. 2012. inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. *Spermova*. 2013; 3(1): 65 – 66.
 30. CCOISO, R. 2019. Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de llama (*Lama glama*). Tesis pregrado. FCA – UNSAAC. Cusco.
 31. CHOEZ, AK. 2010. Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos - SIRIVS, UNMSM. Lima.
 32. CIPRIAN, R. 2019. Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis pregrado. FCA – UNSAAC. Cusco.
 33. CUBA, Y. 2000. Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas del semen de alpaca (*Lama pacos*) antes y después del proceso de congelado. Tesis pregrado. FAZ – UNSAAC, Cusco.

34. DIRECTOR, A; GIULIANO, S; TRASORRAS, V; CARRETERO, I; PINTO, M. & MIRAGAYA, M. 2007. Electroejaculation in llama (*Lama glama*). Journal of Camel Practice and Research. 14(2): 203-206. Argentina.
35. ESCOBAR, CJ. 2011. Técnicas de congelación y sexado del semen bovino y su importancia en reproducción.
36. FERNÁNDEZ BACA, S. & CALDERÓN, M. 1966. Métodos de colección de semen de la alpaca. Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM. 18-20: 13-26.
37. FERNÁNDEZ, BS. & NOVOA, C. 1968. Primer ensayo de inseminación Artificial en Alpacas (*Lama pacos*) con semen de Vicuña (*Vicugna vicugna*). Revista. Med. Vet. UNMSM-Perú, 22. 9-17.
38. FERNÁNDEZ-BACA, S. & CALDERÓN, W. 1965. Métodos de colección de semen de la alpaca. Rev Fac Med Vet Perú. 18-19-20: 13-17.
39. Fisher PD; Fairfull RW. 1984. El efecto de la concentración de glicerol y la velocidad de enfriamiento en la criosupervivencia de espermatozoides de carnero congelados en pajuelas. Criobiología. 21:542–51.
40. FLORES, N; GIULIANO, S; QUISPE, A; ORDÓÑEZ, C; CARRETERO, M; MIRAGAYA, M. & CUCHO, H. 2014. Test de endósmosis en espermatozoides de alpaca. Cuartas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal – INITRA. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, Argentina.
41. FLORES, NH; CUCHO, H; CARRETERO, MI; CIPRIAN, R; QUISPE, HA; CALDERÓN, N; MIRAGAYA, MH. & GIULIANO, SM. 2015. Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la movilidad de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS®. Spermova 5(1):47-50.
42. FOWLER, M. 1989. Medicine and Surgery of South American camelids:llama, alpaca, vicuña, guanaco. Iowa state University Press, Iowa.

43. FOWLER, M. 1998. *Medicine and Surgery of South American Camelids*. Second Edition. Iowa State University Press/Amer:391.
44. FRANCO, E. 2015. Criopreservación de semen de alpaca (*Lama pacos*) en pellets. Tesis pregrado. FAZ – UNSAAC, Cusco.
45. FUMUSO, FG; CARRTERO, MI; NEID, D; GONZALES, L; MIRAGAYA, M. & GIULIANO, S. 2014. Utilización del Sistema Integrado de Análisis de Semen (ISAS)® para evaluar movilidad en espermatozoides de llama. Cátedra de Teriogenología, 2 Cátedra de Física Biológica, 3 Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. 4 CONICET, Argentina.
46. FUMUSO, FG; CHAVES, G; NEILD, DM; MIRAGAYA, MH; MARIANA LUCIA BERTUZZI, ML. & CARRETERO, MI. 2020. Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires Argentina.
47. FUMUSO, FG; GIMÉNEZ, ML; NEILD, DM; GIULIANO, SM; CHAVES, MG. & CARRETERO MI. 2014. Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova*, 4 (1):50-53.
48. FUMUSO, FG; GIULIANO, SM; CHAVES, MG; NEILD, DM; MIRAGAYA, MH; GAMBAROTTA, MC. & CARRETERO, MI. 2018. Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires Argentina.
49. GALLEGOS, ML. 2019. Determinación de las características macroscópicas, microscópicas y subpoblaciones espermáticas del semen de la llama (*Lama glama*) colectado por electroeyaculación y vagina artificial. Tesis pregrado. FCA – UNSAAC. Cusco.
50. GARNICA, J; ACHATA, R. & BRAVO, P. 1993. *Physical and biochemical characteristic of alpaca semen*. *Animal Reproduction Science* 32: 85-90. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90059-Z](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90059-Z).

51. GIULIANO, S. 2012. *Extracción y Evaluación de Semen de Camélidos Sudamericano*. Spermova 2(1): 6 - 9. <http://spermova.pe/site/files/revista2012/06-9-Giuliano-camelido.pdf>.
52. GIULIANO, S; CARRETERO, M; GAMBAROTTA, M; NEILD, D; TRASORRAS, V; PINTO, M. & MIRAGAYA, M. 2010. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science*.
53. GIULIANO, S; DIRECTOR, A; GAMBAROTTA, M; TRASORRAS, V. & MIRAGAY, M. 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science*, 359–369.
54. GIULIANO, SM. & SANTA CRUZ, CR. 2011. Métodos de recuperación de espermatozoides en camélidos. *Spermova*, 1(1): 58-59.
55. GIULIANO, SM; BISIAU, C. & CARRETERO, MI. 2012. Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet*, 14(1): 279.
56. GÓMEZ, WR. 1984. Inseminación artificial, Capítulo 10. Reproducción de los animales domésticos. España. Editorial Acribia S.A.
57. GONZÁLEZ, R. 2000. Contratación seminal. Edit. Redondo BBAA-Argentina; pp:56-60.
58. Hammerstedt RH; Graham JK. 1992 Criopreservación de espermatozoides de aves: el enigma del glicerol. *Criobiología*. 29:26–38.
59. HARRISON, R. 1998. Sperm evaluation. what should be testing In: 6th MAFF International Workshop on Genetic Resources. Tsukuba, Japón.
60. HUANCA, W; CORDERO, A; HUANCA, T. & ADAMS, GP. 2007. Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim. Vol. 15 (Supl. 1)*.
61. INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática, PE). 2012. IV Censo Nacional Agropecuario.

62. JEYENDRAN, RS; VAN DER VEN, HH; PEREZ PELAEZ, M. 1984. Development of an Assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. J Reprod Fertil.
63. KERSHAW-YOUNG, CM. & MAXWELL, WM. 2012a. Advancing artificial insemination in camelids, particularly the alpacas. RIRDC Publication 12/016.
64. KERSHAW-YOUNG, CM. & MAXWELL, WM. 2012b. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. Reproduction in Domestic Animals. 47:369-375. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02100.x>.
65. KUNDU, CN; CHAKRABORTY, J; DUTTA, P; BHATTACHARYYA, D; GHOSH, A Y MAJUMDER. GC. 2000. Desarrollo de un modelo simple de criopreservación de espermatozoides usando un medio químicamente definido y espermatozoides del epidídimo de cauda de cabra. Criobiología 40: 117- 125.
66. LA RAYA. 1995. Estación meteorológica del CICAS.
67. LARUTA LIMACHI, F; LOZA, MG. & DELGADO CALLISAYA, PA. 2016. Evaluación de características microscópicas de semen de llama (*Lama glama*). Selva Andina animal science, 8-21.
68. LÓPEZ, KRF; COSTA LLM; LIMA, GL; SOUZA, ALP. & SILVA, AR. 2009. Dimethylformamide is no better than glicerol for cryopreservation of canine semen. Theriogenology 2009; 72:650-654.
69. LUBOS, H. 1983. Bases de la reproducción bovina, Primera Edición, Editorial Diana, México.
70. 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.
71. MARTÍ, JI; APARICIO, IM. & GARCÍA, H. 2011. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. Theriogenology 75: 473–481. España. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.09.015>.

72. MCEVOY, TG; KYLE, CE; SLATER, D; ADAM, CL. & BOURKE, DA. 1992. Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *Journal of Reproduction and Fertility*. 9:48.
73. MEDEIROS, CM; FORELL, F; OLIVEIRA, AT. & RODRIGUES, JL. 2002. current status of sperm cryopreservation. *Theriogenology* 57. Pag. 327-344.
74. MORTON, KM. & MAXWELL, WMC. 2006. The continued development of artificial insemination technologies in alpacas. *ReproGen – RIRDC*. University of Sydney, NSW, Australia.
75. MORTON, KM; VAUGHAN, JL & MAXWELL, WM. 2008. The continued development of artificial insemination technology in Alpacas. *Rural Industries Research and Development Corporation*. 205p.
76. ORDOÑEZ, C; CUCHO, H; AMPUERO, E; ANTEZANA, W. & CAYO, S. 2013. Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. *Spermova* 1: 65-66.
77. PACHECO, M. 1996. Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma del espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca, Tesis FMVZ UCSM, Arequipa - Perú.
78. PATRAT, C; SERRES, C. & JOUANNET, P. 2000. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* .92: 255-266. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(00)01072-8).
79. PAUCAR, AD. 2011. Evaluación de cuatro dilutores comerciales en la congelación de semen de alpacas colectados con vagina artificial y post copula. Tesis pregrado. FAZ – UNSAAC, Cusco.
80. PROISER (Projects I Serveis R+D S.L). 2010. Manual del ISAS® - Integrated Semen Analysis System. Projectes I Serveis R+D S.L., España.
81. 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 pregrado. FMVZ-UNA. Puno.

82. QUINTEROS MORENO, AA. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, conejo y cerdo. Tesis doctoral Universidad Autónoma de Barcelona Fac. de Veterinaria. España.
83. QUISPE, CH. & DELGADO, PA. 2012. Desarrollo de tres protocolos de colección de semen de llama (*Lama glama*). En: Resumen VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Arica. Pg. 157.
84. QUISPE, D. 2015. Evaluación reproductiva del plantel de reproductores del banco de germoplasma de alpacas de color del CICAS - La Raya. Tesis pregrado. FAZ-UNSAAC, Cusco.
85. QUISPE, F. 1987. Evaluación de Las Características Físicas del semen de la Alpaca (*Lama pacos*) Durante la Época de Empadre. Tesis FMVZ-UNA, PUNO. PERU.
86. QUISPE, WY. 2018. Comparación del efecto de dos curvas de congelación en semen de alpaca (*Vicugna pacos*) colectada por vagina artificial y post cópula. Tesis pregrado. FCA - UNSAAC. Cusco.
87. RAMALHO-SANTOS, J; SCHATTEEN, G. & MORENO, R. 2002. Control of membrane function during spermiogenesis and the acrosome reaction. Biol Reprod 67(4): 1043-51. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.4.1043>.
88. RASUL, Z; AHMED, N. & ANZAR, M. 2007. Antagonist effect of DMSO on the cryoprotection ability of glicerol during cryopreservation of buffalo sperm. Theriogenology 68: 813-819. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.06.014>.
89. RODRÍGUEZ CAPCHA, M. 2013. Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de llamas (*Lama glama*) utilizando el integrated sperm analysis sistema (ISAS). Tesis en Centro experimental Cicas "La Raya" Facultad de Ciencias Agrarias, Cusco.
90. SALAMON, M. & MAXWELL, WM. (2000). Storage of ram semen. Animal reproduction sciene 62(1-3):77-111.

91. SALISBURY, G; VANDERMACK, L. & LODGE, J. 1982. Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bóvidos, traducido por José María Torzona Vilas, Segunda Edición, Editorial Acribia, Zaragoza – España.
92. SANTIANI, A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magíster en Ciencias mención en Biología de la reproducción. Facultad de Medicina-Universidad de la Frontera. Temuco-Chile. 95p.
93. SANTIANI, A; HUANCA, W; SAPANA, R; HUANCA, T; SEPÚLVEDA, N. & SÁNCHEZ, R. 2005. Effects on the quality of frozen thawed alpaca semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl* 7: 303-309.
94. SOLER, C; GADEA, B; SOLER, AJ; FERNÁNDEZ, MR. & NÚÑEZ, J. 2005. Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology* 64: 1236–1243. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.018>.
95. SOLER, C; SANCHO, M; GARCIA, A; FUENTES, M; NUÑEZ, J. & CUCHO, H. 2014. Ejaculate Fractioning Effect on Llama Sperm Head Morphometry as Assessed by the. *Reproduction in domestic animals*. <https://doi.org/10.1111/rda.12226>.
96. SOLIS, R. 1997. Producción de camélidos sudamericanos. Imprenta Ríos. Huancayo Perú.
97. SORENSEN, A. 1991. Evaluación de la aptitud reproductiva. En: Sorensen A, ed. *Reproducción animal, principios básicos y prácticas*. 1ª ed. McGraw-Hill. p 124-143.
98. SOUZA, T. 2009. Tesis Magister Scientiae. Universidad Federal de Viçosa. Viçosa. Brasil.
99. SUMAR, J. & LEYVA, V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). En: *Resumen IV Conv. Int. Sobre Camélidos Sudamericanos*, Punta Arenas,3.

100. SUMAR, J. 1991. Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. En: FAO, Oficina de la FAO para América Latina y el Caribe.
101. THEMES, U. 2017. Anatomy and physiology of reproduction in the female llama and alpaca. Veterian Key. <https://veteriankey.com/anatomy-and-physiology-of-reproduction-in-the-female-llama-and-alpaca/>.
102. TRIBULO, H. 2009. Curso de congelado de semen bovino. Argentina. Instituto de Reproducción Animal Córdoba IRAC. Guía práctica. P 31-33.
103. UGARELLI, A; EVANGELISTA, S; CHOEZ, K; PACHECO, J. & SANTIANI, A. 2015. Evaluación de diferentes concentraciones de FITC-PSA y FITC-PNA para la valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca. Spermova 5: 87-92. <http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.20>.
104. VALLE ZAPATA, EM. 2013. "Evaluación de dos técnicas de colección de semen en llamas (*Lama glama*)" en la estación experimental de Choquenaira. Tesis en La Paz, Bolivia.
105. VASQUEZ, J; FLORENTINI, EA. & VALDIVIA, M. 2012. Hypoosmotic swelling test in alpaca (*Vicugna pacos*) epididymal spermatozoa. Animal Reproductive Physiology Laboratory, Antonio Raimondi Biological Sciences Research Institute, Biology Faculty. UNMSM- Lima- Peru. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01988.x>.
106. VAUGHAN, JL; GALLOWAY, D. & HOPKINS, D. 2003. Artificial insemination in Alpacas (*Lama pacos*). Australia government. 1(1) hallado en: www.rirdc.gov.au/reports/RNF/03-104sum.html.
107. VON BAER, L. & HELLEMANN, C. 1999. Cryopreservation of llama semen. Reproduction in Domestic Animals. 34:95-96. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1999.tb01390.x>.
108. WATSON PF. 1995. Desarrollos y conceptos recientes en la criopreservación de espermatozoides y la evaluación de su función post-descongelación. Reprod Fertil Dev 7:871-91.

109. WOODS, EJ; BENSON, JD; AGCA, Y. & CRITSER, JK. 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*; 48:146-56. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002>.
110. 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 pregrado. FMV-UNMSM. Lima, Perú.

ANEXOS

Anexo 1. Serie fotográfico del sitio y materiales del laboratorio del centro experimental CICAS La Raya.



Figura 1. Centro Experimental CICAS – La Raya.



Figura 2. Especies vegetales dominantes del Centro Experimental CICAS “La Raya”.

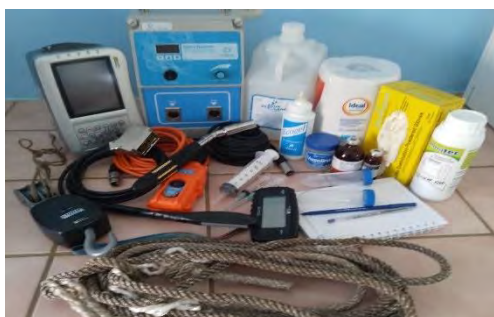


Figura 3. Materiales para la colección de semen por el método de EE.



Figura 4. Materiales de laboratorio utilizando para la evaluación, criopreservación y almacenado de semen de llamas.



Figura 5. Microscopio de contraste de fases - fluorescencia, platina térmica, videocámara y computadora ejecutando el programa ISAS v.1.2.



Figura 6. Insumos para la evaluación y criopreservación de semen de llama.

Anexo 2. Reactivos para la preparación de dilutor base tris.

Preparación de dilutor base tris (dilutor A).

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

Fracción	Cantidad
tris (g)	3,028
ácido cítrico (g)	1,7
Fructuosa (g)	1,25
yema de huevo (ml)	25
agua bidestilada (ml)	75
Total (ml)	100

Preparación de dilutor base tris (dilutor B).

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

Fracción	Nivel de crioprotector			
	5 % GLI	7 % GLI	7 % DMFA	9 % DMFA
Dilutor A (ml)	9,5	9,3	9,3	9,1
Dimetilformamida (ml)	-	-	0,7	0,9
Glicerol (ml)	0,5	0,7	-	-
Total (ml)	10	10	10	10

Anexo 3. Análisis de varianza y prueba de medias de las características microscópicas en muestra de semen refrigerado de llamas colectadas por electroeyaculación EE.

ANVA de motilidad total espermática en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	2940.916094	420.130871	6.77	<.0001
Protocolo	3	828.170469	276.056823	4.45	0.0074
Error	53	3290.060781	62.076619		
Total, corregido	63	7059.147344			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.533929	46.71989	7.878872	16.86406

Prueba de medias de motilidad espermática

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	62.07662
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	7.3887

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	20.762	16	1
A	20.000	16	2
B	14.344	16	4
B	12.350	16	3

ANVA de VCL en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	3817.232344	545.318906	8.66	<.0001
Protocolo	3	2821.072969	940.357656	14.93	<.0001
Error	53	3338.385781	62.988411		
Total, corregido	63	9976.691094			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.665381	19.20877	7.936524	41.31719

Prueba de medias de VCL

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	62.98841
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	7.4428

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	48.294	16	2
A	47.556	16	1
B	35.544	16	3
B	33.875	16	4

ANVA de VSL en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	107.4648438	15.3521205	5.53	<.0001
Protocolo	3	101.2642188	33.7547396	12.15	<.0001
Error	53	147.2645313	2.7785761		
Total, corregido	63	355.9935938			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.586328	14.04265	1.666906	11.87031

Prueba de medias de VSL

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	2.778576
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	1.5632

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	13.4563	16	1
A	12.7500	16	2
B	10.6500	16	3
B	10.6250	16	4

ANVA de VAP en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	878.8998438	125.5571205	10.52	<.0001
Protocolo	3	418.6079688	139.5359896	11.70	<.0001
Error	53	632.350781	11.931147		
Total, corregido	63	1929.858594			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.672333	14.42516	3.454149	23.94531

Prueba de medias de VAP

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	11.93115
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	3.2392

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	26.756	16	1
A	26.213	16	2
B	21.744	16	3
B	21.069	16	4

ANVA de STR en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	1783.603594	254.800513	6.63	<.0001
Protocolo	3	238.799219	79.599740	2.07	0.1151
Error	53	2036.794531	38.430085		
Total, corregido	63	4059.197344			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.498227	17.42037	6.199200	35.58594

ANVA de LIN en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	1580.559844	225.794263	6.07	<.0001
Protocolo	3	78.875469	26.291823	0.71	0.5524
Error	53	1972.390781	37.214920		
Total, corregido	63	3631.826094			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.456915	11.44373	6.100403	53.30781

ANVA de WOB en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	845.7018750	120.8145536	4.51	0.0005
Protocolo	3	402.7456250	134.2485417	5.01	0.0039
Error	53	1420.386875	26.799752		
Total, corregido	63	2668.834375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.467788	8.151313	5.176848	63.50938

Prueba de medias de WOB

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	26.79975
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	4.8548

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	protocolo
A	66.119	16	4
A	65.694	16	3
B	62.138	16	1
B	60.088	16	2

ANVA de ALH en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	6.84734375	0.97819196	7.21	<.0001
Protocolo	3	6.50921875	2.16973958	15.99	<.0001
Error	53	7.18953125	0.13565153		
Total, corregido	63	20.54609375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.650078	15.39633	0.368309	2.392188

Prueba de medias de ALH

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	0.135652
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	0.3454

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	2.7375	16	2
A	2.6812	16	1
B	2.1125	16	3
B	2.0375	16	4

ANVA de BCF en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	39.67484375	5.66783482	9.13	<.0001
Protocolo	3	8.98171875	2.99390625	4.82	0.0048
Error	53	32.90953125	0.62093455		
Total, corregido	63	81.56609375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.596529	24.56484	0.787994	3.207813

Prueba de medias de BCF

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	0.620935
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	0.739

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	3.6750	16	1
B	3.4563	16	2
B	2.9625	16	3
B	2.7375	16	4

ANVA de vitalidad espermática en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	987.2625000	141.0375000	48.65	<.0001
Protocolo	3	140.7337500	46.9112500	16.18	<.0001
Error	53	153.653750	2.899127		
Total, corregido	63	1281.650000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.880113	2.970874	1.702682	57.31250

Prueba de medias de vitalidad

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	2.899127
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	1.5967

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
B	59.3063	16	1
B	57.9125	16	4
B	56.7563	16	2
B	55.2750	16	3

ANVA de integridad acrosomal en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	2173.412344	310.487478	46.13	<.0001
protocolo	3	43.965469	14.655156	2.18	0.1015
Error	53	356.745781	6.731052		
Total, corregido	63	2574.123594			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.861411	3.694696	2.594427	70.22031

ANVA de largo en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	3.24442213	0.46348888	21.83	<.0001
Protocolo	3	0.03961541	0.01320514	0.62	0.6039
Error	53	1.12528470	0.02123179		
Total, corregido	63	4.40932224			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.744794	2.606704	0.145711	5.589869

ANVA de ancho en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.22896448	0.03270921	3.52	0.0035
Protocolo	3	0.01020497	0.00340166	0.37	0.7775
Error	53	0.49204226	0.00928382		
Total, corregido	63	0.73121172			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.327086		3.043406	0.096353	3.165945	

ANVA de área en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	26.87490606	3.83927229	7.86	<.0001
Protocolo	3	0.77797396	0.25932465	0.53	0.6630
Error	53	25.88659492	0.48842632		
Total, corregido	63	53.53947494			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.516495		4.717575	0.698875	14.81428	

ANVA de perímetro en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	48.85882605	6.97983229	14.37	<.0001
Protocolo	3	2.28328959	0.76109653	1.57	0.2082
Error	53	25.73973791	0.48565543		
Total, corregido	63	76.88185355			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.665204		4.167767	0.696890	16.72094	

ANVA de acrosoma % en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	515.7894818	73.6842117	4.29	0.0008
Protocolo	3	33.7438348	11.2479449	0.66	0.5831
Error	53	909.448841	17.159412		
Total, corregido	63	1458.982157			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.376655		8.441815	4.142392	49.06992	

ANVA de elipticidad en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.34005108	0.04857873	33.62	<.0001
Protocolo	3	0.00150234	0.00050078	0.35	0.7917
Error	53	0.07657937	0.00144489		
Total, corregido	63	0.41813280			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.816854		2.139630	0.038012	1.776558	

ANVA de rugosidad en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.18791422	0.02684489	1.15	0.3488
Protocolo	3	0.05184495	0.01728165	0.74	0.5339
Error	53	1.24049946	0.02340565		
Total, corregido	63	1.48025863			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.161971		21.89825	0.152989	0.698636	

ANVA de elongación en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.02199907	0.00314272	31.97	<.0001
Protocolo	3	0.00008938	0.00002979	0.30	0.8230
Error	53	0.00521040	0.00009831		
Total, corregido	63	0.02729885			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.809135		3.595567	0.009915	0.275759	

ANVA de regularidad en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.00304957	0.00043565	3.97	0.0015
Protocolo	3	0.00010395	0.00003465	0.32	0.8140
Error	53	0.00581947	0.00010980		
Total, corregido	63	0.00897299			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.351446		1.114913	0.010479	0.939859	

Anexo 4. Análisis de varianza y prueba de medias de las características microscópicas en muestra de semen descongelado de llamas colectadas por electroeyaculación EE.

ANVA de motilidad total espermática en semen descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	568.3643750	81.1949107	4.21	0.0009
Protocolo	3	148.3831250	49.4610417	2.56	0.0645
Error	53	1023.141875	19.304564		
Total, corregido	63	1739.889375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.411950	46.88172	4.393696	9.371875

Prueba de media de motilidad total

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	19.30456
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	4.1203

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	11.544	16	2
A	10.013	16	1
A	8.275	16	3
A	7.656	16	4

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

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	359.2648438	51.3235491	2.19	0.0496
Protocolo	3	67.8542187	22.6180729	0.97	0.4157
Error	53	1241.099531	23.416972		
Total, corregido	63	1668.218594			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.256033	14.68413	4.839109	32.95469

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

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	7.85500000	1.12214286	0.51	0.8246
Protocolo	3	6.14125000	2.04708333	0.93	0.4345
Error	53	117.1212500	2.2098349		
Total, corregido	63	131.1175000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.106746	14.13240	1.486551	10.51875

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

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	90.69484375	12.95640625	2.11	0.0578
Protocolo	3	10.83921875	3.61307292	0.59	0.6245
Error	53	324.7620313	6.1275855		
Total, corregido	63	426.2960938			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.238177	12.40314	2.475396	19.95781

ANVA de STR en semen descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	436.7773438	62.3967634	2.35	0.0365
Protocolo	3	91.6779688	30.5593229	1.15	0.3377
Error	53	1409.013281	26.585156		
Total, corregido	63	1937.468594			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.272756	12.98607	5.156080	39.70469

ANVA de LIN en semen descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	547.9523438	78.2789063	2.87	0.0128
Protocolo	3	71.2179688	23.7393229	0.87	0.4620
Error	53	1444.415781	27.253128		
Total, corregido	63	2063.586094			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.300046	9.173526	5.220453	56.90781

ANVA de WOB en semen descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	263.4943750	37.6420536	1.44	0.2092
Protocolo	3	59.9331250	19.9777083	0.76	0.5192
Error	53	1385.411875	26.139847		
Total, corregido	63	1708.839375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.189267	7.735183	5.112714	66.09688

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

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	1.00000000	0.14285714	2.87	0.0129
Protocolo	3	0.34000000	0.11333333	2.28	0.0902
Error	53	2.63750000	0.04976415		
Total, corregido	63	3.97750000			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.336895	10.98234	0.223079	2.031250

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

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	10.45484375	1.49354911	5.56	<.0001
Protocolo	3	0.55671875	0.18557292	0.69	0.5617
Error	53	14.23703125	0.26862323		
Total, corregido	63	25.24859375			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.436126	21.63763	0.518289	2.395313

ANVA de vitalidad espermática en semen descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	1434.951094	204.993013	150.15	<.0001
Protocolo	3	138.927969	46.309323	33.92	<.0001
Error	53	72.360781	1.365298		
Total, corregido	63	1646.239844			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.956045	3.343381	1.168460	34.94844

Prueba de media de vitalidad

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	1.365298
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	1.0958

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	37.2313	16	1
B	35.0500	16	4
B	34.3125	16	2
C	33.2000	16	3

ANVA de integridad acrosomal en semen descongelado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	2308.461094	329.780156	58.37	<.0001
Protocolo	3	41.055469	13.685156	2.42	0.0761
Error	53	299.460781	5.650203		
Total, corregido	63	2648.977344			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.886952	3.537966	2.377016	67.18594

Prueba de media de integridad

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	5.650203
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	2.2291

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	68.3750	16	1
A	67.4000	16	4
A	66.7313	16	2
A	66.2375	16	3

ANVA de largo en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	2.60653420	0.37236203	13.89	<.0001
Protocolo	3	0.12966230	0.04322077	1.61	0.1974
Error	53	1.42043645	0.02680069		
Total, corregido	63	4.15663296			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.658272	2.900763	0.163709	5.643658

ANVA de ancho en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.62913015	0.08987574	11.14	<.0001
Protocolo	3	0.04932243	0.01644081	2.04	0.1196
Error	53	0.42748078	0.00806568		
Total, corregido	63	1.10593336			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.613466	2.823240	0.089809	3.181066

ANVA de área en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	49.31710700	7.04530100	14.47	<.0001
Protocolo	3	2.57082549	0.85694183	1.76	0.1661
Error	53	25.80989799	0.48697921		
Total, corregido	63	77.69783048			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.667817	4.636747	0.697839	15.05018

ANVA de perímetro en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	24.41360552	3.48765793	9.73	<.0001
Protocolo	3	3.66121840	1.22040613	3.41	0.0241
Error	53	18.99429808	0.35838298		
Total, corregido	63	47.06912199			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.596459		3.661160	0.598651	16.35140	

ANVA de acrosoma % en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	200.1148367	28.5878338	2.16	0.0527
Protocolo	3	5.9971316	1.9990439	0.15	0.9285
Error	53	701.0753755	13.2278373		
Total, corregido	63	907.1873438			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.227199		7.450311	3.637009	48.81688	

ANVA de elipticidad en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.13313531	0.01901933	6.92	<.0001
Protocolo	3	0.00304329	0.00101443	0.37	0.7755
Error	53	0.14558889	0.00274696		
Total, corregido	63	0.28176749			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.483301		2.937309	0.052411	1.784336	

ANVA de rugosidad en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.02711553	0.00387365	5.09	0.0002
Protocolo	3	0.00874303	0.00291434	3.83	0.0149
Error	53	0.04036571	0.00076162		
Total, corregido	63	0.07622427			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.470435		3.870698	0.027597	0.712983	

ANVA de elongación en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.00896008	0.00128001	6.72	<.0001
Protocolo	3	0.00020586	0.00006862	0.36	0.7821
Error	53	0.01010235	0.00019061		
Total, corregido	63	0.01926829			
R-cuadrado		Coef Var	Raíz MSE	Y Media	
0.475701		4.961286	0.013806	0.278278	

ANVA de regularidad en semen refrigerado de llama colectadas por EE.

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Animal	7	0.00367081	0.00052440	6.11	<.0001
Protocolo	3	0.00094425	0.00031475	3.67	0.0178
Error	53	0.00454599	0.00008577		
Total, corregido	63	0.00916106			

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	Y Media
0.503770	0.987200	0.009261	0.938148

Prueba de media de regularidad

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	53
Error de cuadrado medio	0.000086
Valor crítico del rango estudentizado	3.75114
Diferencia significativa mínima	0.0087

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tukey Agrupamiento	Media	N	Protocolo
A	0.942206	16	3
B	0.941288	16	4
B	0.936394	16	2
B	0.932706	16	1