Criopreservación de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) utilizando N, N-dimetilformamida al 4 y 7%

Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires, Área Producción Animal

Nils Herber Flores Huarco

Ingeniero Zootecnista, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, 2011

UNSAAC, La Raya - Marangani

Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano

Facultad de Agronomía - Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad de Buenos Aires

COMITÉ CONSEJERO

Directora de Tesis
Susana María Giuliano
Médica Veterinaria (Universidad de Buenos Aires)
Doctora de la Universidad de Buenos Aires, Área Reproducción Animal

Co-Director de Tesis
Hernán Carlos Cucho Dolmos
Ingeniero Zootecnista, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco
Magister Scientiae en Producción Animal, Universidad Nacional Agraria La Molina

Consejero de Estudios
Marcelo Horacio Miragaya
Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires)
M.Sc. in Veterinary Science, University of Idaho USA
Ph.D. in Animal Physiology, University of Idaho USA

JURADO DE TESIS

JURADO

María Alejandra Stornelli
Médica Veterinaria (Universidad Nacional de La Plata)
Doctora en Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO

Mariana Córdoba
Médica Veterinaria (Universidad de Buenos Aires)
Doctora de la Universidad de Buenos Aires

JURADO

Jorge Federico Suhevic
Médico Veterinario (Universidad de Buenos Aires)
Magister de la Universidad de Buenos Aires en Biotecnología-UBA

Fecha de defensa de la tesis: 22 de Marzo de 2018

Agradecimientos

A los directores y consejero de tesis Dra. María Susana Giuliano, M.Sc. Hernán Cucho Dolmos y Ph.D. Marcelo Miragaya, por su orientación y contribución en mi formación.

Al Ministerio de Educación, Programa Nacional de Becas del Perú, por la subvención otorgada para la realización de la maestría en Producción Animal.

A las autoridades de la Facultad de Agronomía y Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires por el apoyo recibido desde mi llegada.

A todos los integrantes de la Catedra de Nutrición Animal de la FAUBA por brindarme su constante apoyo, orientación y sugerencias en el tema académico. Especialmente a los doctores Gustavo Jaurena, Gabriel Capitelli, y Patricia Luna por su constante atención en los trámites y su predisposición de una buena amistad.

A los integrantes del INITRA y la Catedra de Teriogenología de la Facultad de Veterinaria, por las facilidades brindadas y en especial a la Dra. Ignacia Carretero y Vet. Fernanda Fumuso por su apoyo.

A los investigadores del CICAS: Enrique Ampuero y Cesar Ordoñez por el apoyo a través del proyecto de Investigación "Estudio, Validación y Aplicación de Biotecnologías Reproductivas en el Proceso de Mejoramiento y Valoración Genética de Alpacas de la Región Cusco" de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

Al MVZ. Virgilio Alarcón, director del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos – La Raya, por las facilidades brindadas y su personal técnico de campo.

A René Ciprián, Abel Quispe y Noemí Calderón, por su apoyo y compromiso en la etapa de análisis de las muestras del laboratorio de biotecnologías reproductivas del CICAS.

A todos mis compañeros de la maestría, especialmente a Franco León, Sonia Villamar, Christiaan Ruiz, Roció Martínez, Francisco Vinelli, Guillermo Tejada, Mariana Avila, Rubén Giménez, Soledad Ruolo, Edwaldo Villanueva, Alfonso Flores, Ezequiel Pacente, José Ferrer, Cecilia Sardiña, Abimael Ortiz, Luciano Benjamín entre otros con quienes es un placer conversar, debatir y compartir mates.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

Nils Herber Flores Huarco

Publicaciones derivadas de la tesis

Flores, N.H.; Cucho, H.; Ciprian, R.; Calderón, N.; Ordoñez, C.; Carretero, M.; Miragaya, M., Giuliano, S. 2014. Uso de Dimetiformamida al 4 y 7% como crioprotector para congelar semen de Alpaca. Resultados preliminares. IV Jornadas del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Buenos Aires - Argentina, InVet pag. 154.

Flores, N.H.; Giuliano, S.; Quispe, A.; Ordoñez, C.; Carretero, M.; Miragaya, M.; Cucho, H. 2014. Test de Endosmosis en Espermatozoides de Alpaca. IV Jornadas del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Buenos Aires – Argentina, InVet pag 155.

Flores, N.H.; Cucho, H.; Carretero, M.; Ciprian, R.; Quispe, A.H.; Calderón, N.; Miragaya, M.; Giuliano, S. 2015. Dimethylformamide Cryoprotectant Effect on Cryopreserved Alpaca Sperm Motility (*Vicugna pacos*) Evaluated by Analysis System ISAS®. SPERMOVA. Pag. 5(1):47-50.

Índice general

Índice de tablas III
Índice de figuras IV
Índice de gráficos VII
Siglas y Abreviaturas VIII
Resumen X
Abstract XII

Capítulo I 1
1. Introducción general y objetivos 1
1.1. Distribución de camélidos sudamericanos en el mundo 1
1.2. Producción de alpacas en la República del Perú 2
1.3. Anatomía y fisiología de la alpaca macho 4
1.3.1. Testículos 4
1.3.2. Pene, prepucio y glándulas anexas 5
1.4. Pubertad en la alpaca macho 6
1.5. Métodos de recolección de semen en camélidos sudamericanos 7
1.5.1. Vagina artificial 7
1.5.2. Fístula uretral y desviación de los conductos deferentes 8
1.5.3. Aspiración post coital 8
1.5.4. Electroeyaculación 9
1.6. Características y evaluación del semen de camélidos sudamericanos 9
1.6.1. Determinación de la calidad seminal mediante el sistema ISAS PROISER 11
1.6.2. Subpoblaciones espermáticas en el eyaculado seminal 11
1.7. Morfología y morfometria espermática 15
1.8. Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos 19
1.8.1. Criopreservación de espermatozoides de Alpaca 21
1.9. Agentes crioprotectores permeables 22
1.10. Agentes crioprotectores no permeables 22
1.11. Planteo del problema 23
1.11.1. Objetivo general 25
a. Objetivo específico 1 25
b. Objetivo específico 2 25
Capítulo II 26

2. Materiales y métodos 26
2.1. Animales y locación 26
2.2. Equipos y materiales para la recolección de semen 27
2.2.1. Laboratorio 29
2.3. Selección de los machos de alpaca 29
2.4. Procedimiento para la extracción de semen en alpacas 30
2.5. Evaluación de las muestras seminales 31
2.5.1. Determinación de las características macroscópicas del semen 31
2.5.2. Estudio de las características microscópicas del semen 32
2.6. Procesamiento del semen 37
2.6.1. Objetivo particular 1 37
2.6.2. Objetivo particular 2 37
2.6. Flujograma resumen de evaluación y procesamiento del semen 40
2.7. Diseño Estadístico 41
Capítulo III 43
3. Resultados 43
3.1. Movilidad espermática 43
3.2. Vitalidad espermática 46
3.3. Parámetros morfométricos 48
3.4. Funcionalidad de la membrana espermática 51
3.6. Integridad del acrosoma 54
Capítulo IV 56
4. Discusión 56
Capítulo V 63
5.1. Conclusiones 63
5.2. Proyecciones futuras 64

Índice de tablas

Tabla: 1. Población de camelidos sudamericanos según los países sudamericanos 1
Tabla: 2. Parámetros de movilidad espermática que evalúa el ISAS 14
Tabla: 3. Características morfométricas de los espermatozoides de alpaca 16
Tabla: 4. Parámetros de morfometria espermática de alpacas según el ISAS 17
Tabla: 5. Criopreservación de espermatozoides en camélidos sudamericanos..... 21
Tabla: 6. Porcentaje de espermatozoides por subpoblación y tipo de movilidad 44
Tabla: 7. Porcentaje de vitalidad espermática según etapas de análisis..... 46
Tabla: 8. Morfometria de espermatozoides según etapas de análisis 48
Tabla: 9. Porcentaje de funcionalidad de la membrana espermática 52
Tabla: 10. Porcentaje de espermatozoides con integridad de acrosoma 53

Índice de figuras

Figura: 1. 1A: Alpaca Suri. 1B: alpaca Huacaya 3
Figura: 2. Diagrama de la vista lateral de los genitales de un camélido macho 5
Figura: 3. Representación gráfica según WHO, 2010. Diferentes parámetros de movilidad espermática obtenidos por el sistema ISAS PROISER 13
Figura: 4. Parámetros de evaluación morfométrica del espermatozoide de llama 18
Figura: 5. Representación morfológica de la cabeza del espermatozoide de alpaca 18
Figura: 6. Representación morfológica de la cabeza del espermatozoide de llama 19
Figura: 7. Ubicación del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos. 26
Figura: 8. Ámbito del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del CICAS 27
Figura: 9. 9A: Microscopio de contraste de fases y de fluorescencia (UOP – UB200i e ISAS PROISER V 1.1). 9B: Electroeyaculador (E*lectroJac 5* 19/32 V). 28
Figura: 10. 10A. Materiales para criopreservación. 10B: Materiales para sedación y extracción de semen. 28
Figura: 11. 11A: Tinciones para morfometria. 11B: Crioprotector N, N-Dimetilformamida 28
Figura: 12. 12A: Registro del peso corporal. 12B: Ubicación de la distancia ano próstata mediante ecógrafo Agroscan L-10. 29
Figura: 13. 13A: Grupo de alpacas machos del estudio. 13B: Proceso de sedación según peso corporal de cada alpaca (HalatalKT, Dormi -Xyl®2) 30
Figura: 14. 14A: Suministro con solución fisiológica al prepucio. 14B: Extracción del lado de la solución fisiológica del prepucio 31
Figura: 15. 15A: Proceso de (EE) para la extracción de semen. 15B: Movimiento sigmoideo del pene de la alpaca previo al inicio de la expulsión de semen 31
Figura: 16. 16A: Descarga de 5 µl de semen sobre la lámina. 16B: Correcta dispersión de los 5 µl de semen sobre la placa temperada a 37°C 34
Figura: 17. 17A: Captura de micro imágenes para la señal de video de la cámara Proiser 782C. 17B: Captura del micro video del módulo Movilidad ISAS – PROISER 34

Figura: 18. Trayectoria de los patrones de movilidad del espermatozoide realizados por el ISAS - PROISER 35
Figura: 19. 19A: Proceso de secado y rotulado de muestras de vitalidad. 19B: Muestras listas para su evaluación en el ISAS - PROISER..... 35
Figura: 20. 20A: Preparado del frotis en la lámina con 5 µl de semen. 20B: Proceso de secado de la tinción con el kit de Hemacolor..... 35
Figura: 21. 21A: Cabeza y pieza intermedia (PI) del espermatozoide, diferenciados según color. 21B: Morfometria de la cabeza, (PI) y ángulo de inserción de la (PI) 36
Figura: 22. 22A: Incubación de 50 µl de semen en 200 µl de solución durante 20 minutos. 22B: Proceso de captura de imágenes para determinar la funcionalidad de la membrana espermática..... 37
Figura: 23. 23A: Fijación de la lámina con muestra seminal en paraformaldehído al 4%. 23B: Proceso de tinción con el Coomasie Blue G 250 37
Figura: 24. 24A: Proceso de descenso de la temperatura en un vaso de precipitado. 24B: Alícuota de semen para evaluar los parámetros en el periodo de equilibrio 38
Figura: 25. 25A: Periodo de estabilización las pajuelas. 25B: Refrigeración de las pajuelas en el balón de Nitrógeno 38
Figura: 26. 26A: Preparación de agua temperada a 37°C para descongelar las pajuelas. 26B: Proceso de descongelado durante 60 segundos..... 39
Figura: 27. Resultados del Módulo Movilidad ISAS -PROISER con identificación de los espermatozoides según su movilidad, color amarillo espermatozoides (E), color azul espermatozoides (MNP), color verde espermatozoides (MP) y color rojo espermatozoides con alta progresividad (MAP)..... 45
Figura: 28. Identificación de la vitalidad, A: Espermatozoide vivo; B: Espermatozoide muerto; C: Espermatozoides vivos de muestra fresca, D: Espermatozoides en fase de equilibrio; E: Espermatozoides descongelados..... 47
Figura: 29. 29A: Variación morfométrica de los espermatozoides de alpaca. 29B: Identificación en gris de la captura manual del espermatozoide y en color procesado por el software del ISAS - PROISER..... 50
Figura: 30. Espermatozoides de alpaca incubados con solución hipoosmótica 50 y 125 mOsm/l..... 53

Figura: 31. Espermatozoides de alpaca con acrosoma intacto, figuras A y B; espermatozoides sin acrosoma figuras C y D 55

Índice de gráficos

Gráfico: 1. Porcentaje de la movilidad espermática según etapas de análisis 45
Índice de gráficos
Gráfico: 2. Porcentaje de espermatozoides vivos según etapas de análisis 47
Gráfico: 3. Variación morfométrica de la cabeza de espermatozoides según etapas de análisis..... 49
Gráfico: 4. Porcentaje de variación para el acrosoma de la cabeza del espermatozoide durante un proceso de criopreservación..... 50
Gráfico: 5. Porcentaje de la funcionalidad de la membrana según las etapas de análisis y concentraciones de la solución..... 53
Gráfico: 6. Porcentaje de la integridad del acrosoma según etapas de análisis 55

Siglas y Abreviaturas

ASMA:	Assisted Sperm Mophology Analisys.
ALH:	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide.
BCF:	Frecuencia de batida de la cabeza.
CASA:	Computer Assisted Sperm Analysis.
CSA:	Camélidos Sudamericanos.
CICAS:	Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos.
CICUAL:	Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.
CV:	Coeficiente de Variabilidad.
DCD**:**	Desviación de los conductos deferentes.
DMF:	Dimetilformamida.
DMA:	Dimetilacetamida.
EE**:**	Electroeyaculación.
FIA:	Fundación para la Innovación Agraria.
FAO:	Food and Agriculture Organization.
FIV:	Fertilización in Vitro.
HOST:	HypoOsmotic swelling Test.
IA:	Inseminación Artificial.
ICSI:	Intracytoplasmic Sperm Injection.
INEI:	Instituto Nacional de Estadística e Informática.
INITRA:	Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal.
ISAS:	Integrated Semen Analysis System.
LIN:	Índice de Linealidad.
MP:	Movilidad progresiva.
MNP:	Motilidad no progresiva.
PBS:	Phospate Buffered Saline.
PVP:	Polivinil-pirrolidona.
PI:	Pieza intermedia.
SAS:	Statistical Analysis System.
STR:	Índice de Rectitud.

TALP:	Tirodes Albumen Lactate Pyruvate.
UNSAAC:	Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
µm:	Micrómetros.
VA:	Vagina artificial.
VCL:	Mean Curvilinear Velocity.
VSL:	Straight Line Velocity.
VAP:	Average Path Velocity.
WOB:	Índice de Oscilación.

Resumen

La aplicación de biotecnologías reproductivas en los camélidos sudamericanos (CSA) permitiría acortar los tiempos generacionales, en favor de avanzar con la propagación del valor genético de individuos superiores, y permitiría promover la implementación de un banco genético de germoplasma, mediante la criopreservación de sus gametas. El objetivo general del presente estudio fue diseñar un protocolo de criopreservación que preserve la movilidad, vitalidad y funcionalidad de membrana espermática, morfología e integridad del acrosoma de los espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). Se procesaron un total de 25 eyaculados provenientes de 5 alpacas (n=5; r= 5) del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos La Raya a 4130 msnm. Cada eyaculado se incubó 4 minutos a 37 ºC con una solución de colagenasa al 0,1%. Posteriormente, las muestras se diluyeron 1:1 en un diluyente a base TRIS; fructosa y yema de huevo (25%) y se las enfrió hasta alcanzar los 5 °C. Luego, se dividieron en dos alícuotas y se les adicionó 4% o 7% de DMF. Se equilibraron a 5 °C durante 1h y posteriormente se realizó el congelamiento profundo. El descongelamiento se realizó en un baño María a 37 ºC durante 1 minuto. Las evaluaciones se realizaron en semen fresco, tratado con colagenasa al 0,1 %, durante la etapa de equilibrado (DMF 4% y/o 7%) y luego del congelado-descongelado (DMF 4% y/o 7%). Se realizó un análisis de varianza con un diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA) para las alpacas macho y el número de colecta como fuentes de variabilidad. La comparación de medias se realizó con la prueba de Duncan. Los resultados (medias±DS) de las características macroscópicas fueron: volumen (2,15±0,79 ml) y pH (7,94±0,24). En la variable movilidad espermática no hubo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos (MNP) y móviles progresivos (MP) entre el semen descongelado con 4% de DMF y el semen descongelado con 7% de DMF ($P>0,05$). El porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos (MNP) fue significativamente mayor ($p<0,05$) en el semen equilibrado (con 4% o 7% DMF) respecto del semen descongelado (con 4% o 7% DMF). No se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en el porcentaje de MNP y MP entre el semen fresco y el semen descongelado (con 4% o 7% de DMF) ($P>0,05$). La vitalidad de los espermatozoides luego del congelado – descongelado no mostraron diferencias significativas ($p<0,05$) en el porcentaje de espermatozoides vivos entre el semen descongelado con 4% de DMF y el semen

descongelado con 7% de DMF (P>0,05). Pero se encontró una diferencia significativa (p<0,05) de espermatozoides vivos entre el semen fresco y el semen descongelado (con 4% o 7% de DMF). Al evaluar la morfometría espermática se encontró diferencias significativas (p<0,05) luego de evaluarlos del congelado-descongelado, respecto a la longitud de espermatozoides evaluados en fresco y tratados con colagenasa, respecto al ancho de la cabeza del espermatozoide no mostro diferencias significativas entre frescos, tratados con colagenasa y los congelados-descongelados de (DMF 4% y 7%), mientras que para el perímetro de la cabeza de los espermatozoides no mostró diferencias significativas en las diferentes etapas de análisis del proceso de la criopreservación.

En la variable funcionalidad de la membrana espermática no se observaron diferencias significativas (p<0,05) en el porcentaje de espermatozoides con endósmosis entre el semen fresco y el semen tratado con la enzima colagenasa. Pero se observó que las muestras que tuvieron una incubación del semen tanto en frescos y tratados con colagenasa en una solución de 50 mOsm/l produjeron una mayor cantidad de espermatozoides con endósmosis que los incubados con en una solución de 125 mOsm/l teniendo diferencias significativas al ((p<0,05). Cuando se estudió la integridad de acrosoma del espermatozoide se encontró diferencias significativas (p<0,05) en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto entre el semen tratado con colagenasa y el semen descongelado con (4% de DMF y 7% de DMF). En la morfometría también se evidencia una influencia de las medidas por someter al espermatozoide a un proceso de criopreservación utilizando (DMF). Se resalta que al comparar el porcentaje de acrosoma de la cabeza de los espermatozoides de muestras frescas frente al porcentaje de acrosoma de espermatozoides que fueron congelados-descongelados, presentaron una diferencia significativa que no estuvo correlacionada con las otras variables de su morfometría. En conclusión: 1. la incubación del semen de alpaca con colagenasa al 0,1% disminuye la filancia del plasma seminal y preserva las características seminales de alpaca. 2. La concentración de 7% del crioprotector N, N-Dimetilformamida sería de elección para criopreservar semen de alpaca. 3. La concentración de 50 mOsm/l de la solución de fructosa-citrato de sodio es de elección para realizar el test de endósmosis.

Abstract

Sperm cryopreservation Alpaca (*Vicugna pacos*) using N, N-Dimethylformamide 4% and 7%

The application of reproductive biotechnologies in South American Camelids (CSA) would shorten generational times, in favor of advancing with the propagation of the genetic value of superior individuals, and would allow to promote the implementation of a genetic bank of germplasm, through the cryopreservation of its gametes. The general objective of the present study was to design a cryopreservation protocol that preserves the mobility, vitality and functionality of sperm membrane, morphology and integrity of the acrosome of alpaca spermatozoa (*Vicugna pacos*). A total of 25 ejaculates from 5 alpacas (n = 5; r = 5) were processed from the La Raya South American Camelids Research Center at 4130 masl. Each ejaculate was incubated 4 minutes at 37 °C with a 0.1% collagenase solution. Subsequently, the samples were diluted 1: 1 in a TRIS-based diluent; fructose and egg yolk (25%) and cooled to 5 °C. Then, they were divided into two aliquots and 4% or 7% of DMF were added. They were equilibrated at 5 ° C for 1 h and then the deep freezing was performed. The thawing was carried out in a bath at 37 ° C for 1 minute. The evaluations were carried out in fresh semen, treated with 0.1% collagenase, during the equilibration stage (DMF 4% and / or 7%) and after freeze-thawing (DMF 4% and / or 7%). An analysis of variance was carried out with a design of Completely Random Blocks (BCA) for male alpacas and the number of collection as sources of variability. The comparison of means was made with the Duncan test. The results (means±SD) of the macroscopic characteristics were: volume (2,15±0,79 ml) and pH (7,94±0,24). In the sperm motility variable, there were no significant differences in the percentage of mobile non-progressive sperm (NPM) and progressive mobile sperm (MP) between thawed semen with 4% DMF and thawed semen with 7% DMF (P>0,05). The percentage of non-progressive mobile sperm (NPM) was significantly higher (p<0,05) in the balanced semen (with 4% or 7% DMF) compared to the thawed semen (with 4% or 7% DMF). There were no significant differences (p<0,05) in the percentage of MNP and MP between fresh semen and thawed semen (with 4% or 7% DMF) (P>0,05). The vitality of the sperm after freeze-thaw did not show significant differences (p<0,05) in the percentage of live sperm between the thawed semen with 4% DMF and the thawed semen with 7% DMF

(P>0,05). But a significant difference (p<0,05) of live sperm was found between fresh semen and thawed semen (with 4% or 7% DMF). When evaluating the sperm morphometry, significant differences were found (p<0,05) after evaluating the frozen - thawed, regarding the length of spermatozoa evaluated in fresh and treated with collagenase, with respect to the width of the head of the spermatozoid showed no significant differences between fresh, treated with collagenase and frozen - defrosted (DMF 4% and 7%), while for the perimeter of the head of the sperm showed no significant differences in the different stages of analysis of the cryopreservation process. In the variable functionality of the sperm membrane no significant differences were observed (p<0,05) in the percentage of spermatozoa with endosmosis between the fresh semen and the semen treated with the collagenase enzyme. But it was observed that the samples that had a semen incubation both fresh and treated with collagenase in a solution of 50 mOsm/l produced a greater amount of spermatozoa with endosmosis than those incubated with a solution of 125 mOsm/l having significant differences al (p<0,05) When sperm acrosome integrity was studied, significant differences were found (p<0,05) in the percentage of spermatozoa with intact acrosome between semen treated with collagenase and semen thawed with (4% of DMF and 7% of DMF) In the morphometry there is also evidence of an influence of the measurements by subjecting the spermatozoon to a cryopreservation process using (DMF) It is emphasized that when comparing the percentage of acrosome of the head of the spermatozoa of fresh samples versus the percentage of sperm acrosome that were frozen-thawed, presented a significant difference that was not correlated with the other variables of its morphometry. In conclusion: 1. incubation of alpaca semen with 0.1% collagenase decreases the filament of seminal plasma and preserves the seminal characteristics of alpaca. 2. The concentration of 7% of the cryoprotectant N, N-Dimethylformamide would be of choice to cryopreserve alpaca semen. 3. The concentration of 50 mOsm / l of the fructose-sodium citrate solution is the choice for the endosmosis test.

Keywords: Alpaca, mobility, morphometry, acrosome, vitality and functionality of the spermatozoon.

CAPÍTULO I

1. Introducción general y objetivos

1.1. Distribución de camélidos sudamericanos en el mundo

Las alpacas, llamas, guanacos y vicuñas habitan la zona alto andina de Perú, Bolivia, Argentina y Chile. Estos ambientes incluyen mesetas (Altiplanos) y laderas cordilleranas con baja calidad de pastos naturales, alta incidencia de heladas y precaria disponibilidad de agua. Los guanacos habitan predominantemente zonas más bajas y desérticas, como la Patagonia Argentina y Chilena. Las alpacas y llamas también fueron exportadas a otros países, donde son criadas en condiciones más favorables que las de su ambiente de origen, principalmente como mascotas, como productoras de fibra o animales de experimentación. La existencia en los Estados Unidos es de 120,000 ejemplares, Australia 100,000 ejemplares como también en, Canadá, Nueva Zelanda y países Europeos (Lupton *et al.*, 2006). Bustinza (2001), señala que los camélidos sudamericanos (CSA) comprenden cuatro especies, dos domesticas: la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*); y dos en estado silvestre: la vicuña (*Vicugna vicugna*) y el guanaco (*Lama guanicoe*), todas estas especies están presentes en el Perú.

En Perú se concentra la mayor cantidad de alpacas y vicuñas de Sudamérica, en Bolivia la mayor concentración de llamas y en Argentina la mayor población de guanacos.

Tabla: 1 población aproximada de CSA en los países sudamericanos.

País	Llama	Alpaca	Guanaco	Vicuña	Porcentaje
Argentina	161,402[1]	---	600,000[1]	127,072[7]	10,8%
Bolivia	2 398,572[2]	416,952[2]	1,000[2]	61,000[7]	35%
Chile	50,132[3]	28,551[3]	27,150[3]	15,553[7]	1,5%
Ecuador	10,356[4]	6,685[4]	---	2,455[7]	0,2%
Perú	1 104,000[5]	3 036,181[6]	3,810[5]	161,450[7]	52,4%
Total	**3 724,462**	**3 488,369**	**631,960**	**367,530**	**100%**

Fuente: FAO[a] (2005)[1]; FAO[b] (2005)[2]; FIA (2001)[3]; FAO[c] (2005)[4]; FAO[d] (2005)[5]; INEI (2012)[6]; Reunión Convenio de la Vicuña (2013)[7].

1.2. Producción de alpacas en la República del Perú

La alpaca pertenece al orden *Artiodactyla* y de la familia *Camelidae*, esta especie fue clasificada como *Vicugna pacos* luego de demostrarse mediante el estudio del ADN mitocondrial que la vicuña es el antecesor de la alpaca, Sin embargo investigaciones en curso, sugieren que en realidad desciende del guanaco, por lo tanto su origen todavía está en discusión. El proceso de domesticación se inició en los Andes Centrales de Sudamérica hace 6000 años según (Kadwell *et al.*, 2001, Marin *et al*., 2007). La alpaca es el camélido sudamericano más numeroso en la actualidad. Un ejemplar adulto mide aproximadamente entre 81 a 99 cm de altura y su peso oscila de 48 a 84 kg. Tiene orejas puntiagudas, su cuerpo es delgado y sobresale su largo cuello angosto que es más perceptible cuando no está cubierto por su fibra. Se postula que la producción de fibra de las alpacas deriva de un proceso de selección practicado desde épocas precolombinas (Wang *et al*., 2003). Existen dos razas de alpacas, la Huacaya y la Suri (*Figura 1*). La alpaca Huacaya se caracteriza por tener un vellón compacto, esponjoso y similar al vellón del ovino Corriedale, el cual le confiere una apariencia más voluminosa. La alpaca Suri presenta fibras de gran longitud organizadas en rizos colgantes, de un modo similar a los rizos del ovino Lincoln, lo cual confiere al animal una apariencia angulosa (Hoffman y Fowler, 1995; Antonini *et al.*, 2004 y FAO, 2005). La alpaca Huacaya representa el 85% de la población de alpacas en el Perú.

Las fibras de estas especies exhiben alta resistencia a la tracción, con valores mayores a 40 N/ktex, siendo una condición muy importante para el proceso industrial (Xungai *et al*., 2003). A su vez, la capacidad de estas fibras de absorber humedad ambiental es baja (máximo 10% a 15%), por lo tanto su aspecto no sea afecta en condiciones de humedad ambiental alta. Otra característica de las fibras de estas especies, es que contienen "bolsillos" microscópicos de aire en la médula que posibilitan que los artículos confeccionados con fibra de alpaca puedan ser usados en un amplio rango de climas ya que permiten mantener la temperatura corporal (Schmid *et al*., 2006). La industria textil clasifica a las fibras de alpaca como fibras especiales y los artículos confeccionados con ellas, están clasificados como artículos de lujo (Wang *et al.*, 2003). Como todas las fibras especiales, las fibras de alpaca son flexibles y suaves al tacto, poco inflamables y poco alergénicas. Además, los tejidos de estas fibras son proclives a la confección de vestidos con excelentes pliegues, apariencia, caída y lustrosidad, que en su conjunto confieren la apariencia de ser nuevos no obstante el tiempo que puedan

haber sido usados. En este contexto los tejidos elaborados con alpaca son comparables a los elaborados con lana ovina pero con un diámetro promedio 3 a 4 micras menor (*Inka - Alpaca,* 2009). Contrastando con los vellones de ovinos, los rendimientos en limpio de los vellones de alpaca son altos (87% a 95%), lo cual permite un procesamiento industrial menos oneroso. El procesamiento de tejidos varía desde tweeds gruesos a gabardinas finas, las cuales no se rompen, deshilachan, manchan o producen estática.

El mejoramiento de la crianza de alpacas a través del uso de la selección es de interés de los criadores y de la industria textil. El criador busca mejorar sus ingresos vía el incremento de la cantidad de fibra por animal esquilado y disminuyendo el diámetro de fibra de calidad fina a extrafina para destinarlas a la producción de textiles de mayor valor económico en el mercado. Asimismo, la alpaca es considerando un animal de doble propósito, por la producción de fibra fina de gran valor textil y por la producción de carne de excelente calidad nutritiva para la alimentación humana por su contenidos bajo en colesterol y alto en proteínas, Bustinza (2001).

Figura: 1A. Alpaca de la raza Suri y 1B. Alpaca de la raza Huacaya.

1.3. Anatomía y fisiología de la alpaca macho

1.3.1. Testículos

En un macho adulto los testículos se encuentran en la región perineal dentro de una bolsa escrotal no pendulosa y sin cuello definido. Son relativamente pequeños para su tamaño y peso corporal, tal como sucede en los carnívoros, roedores y porcinos. Al nacimiento, los testículos son de tamaño pequeño, casi del tamaño del garbanzo y muchas veces no están localizados en las bolsas escrotales. A los seis meses todos los tuis (crías), ya deben tener los testículos en el escroto y al año de edad deben medir aproximadamente de 2 a 2,5 cm de largo por 1 a 1,5 cm de ancho. Los pesos testiculares en promedio son de 18 g cada uno, variando estos entre 0,02 a 0,03 % en relación a su peso corporal. Habría una relación directa entre el tamaño del testículo y la capacidad de producción de espermatozoides (Sumar J., 1994). En la alpaca y en la llama no hay reportes de variaciones estacionales de tamaño y forma testicular (Tibary y Vaughan, 2006). En la vicuña se han observado variaciones de tamaño según la estación. En verano el tamaño es 3,3 x 1,69 cm y en invierno 2,64 x 1,50 cm (Urquieta *et al*., 1994 citado por Tibary y Vaughan, 2006). La espermatogénesis ocurre durante todo el año pero no se conoce bien la incidencia de las estaciones en la producción espermática en los CSA (Tibary y Vaughan, 2006). Delhon y Von Lawzewitsch (1987) estudiaron el ciclo del epitelio de los túbulos seminíferos de llama y determinaron que presenta 8 fases cuyas frecuencias relativas difieren de las descriptas en el dromedario. Las fases 1-4 constituyen la primera etapa del ciclo y representan el 54% de la actividad celular caracterizada por la generación de espermátidas. El diámetro de los túbulos seminíferos fijados histológicamente fue de 223,07±19,8 µm (media±DE) (Delhon y von Lawzewitsch, 1987). Smith *et al.*, (1994) observaron que la producción de espermatozoides comenzó a los 10-12 meses en algunas alpacas y llamas, y que a la edad de 2 años ya estaban presentes los espermatozoides en los túbulos seminíferos.

En alpacas entre 2 a 5 años se observa en los túbulos seminíferos un epitelio germinativo distribuido ordenadamente en estratos, con diferenciación de las células germinales en espermatogonias de forma redondeada en la membrana basal, espermatocitos primarios y secundarios en mayor cantidad de forma triangular alargadas y espermatozoides en dirección a la luz del túbulo, mientras que las células de Sertoli se encuentran intercaladas en el epitelio germinal (Rojas, 1998). Entre los 6-12 meses de edad, las células germinales empiezan a

organizarse en el túbulo seminífero, desplazándose hacia la membrana basal, mientras que las células de Sertoli se elongan y se distancian entre ellas. Las células germinales comienzan a ocupar los espacios entre las células de Sertoli y se organizan en estratos (Pasco M. 2001). En machos de 18 meses ya es posible observar espermatozoides maduros, pero en baja concentración.

1.3.2. Pene, prepucio y glándulas anexas

El pene es fibroelástico, su diámetro es de 0,8 a 1 cm en distal y de 1,2 a 2 cm a nivel del arco isquiático y presenta una flexura sigmoidea preescrotal. Su largo promedio sin erección es de 35 a 46 cm (del arco isquiático a la punta del pene) (Johnson, 1989 y Fowler, 1998). No se expande considerablemente durante la erección (Sumar J., 1991).

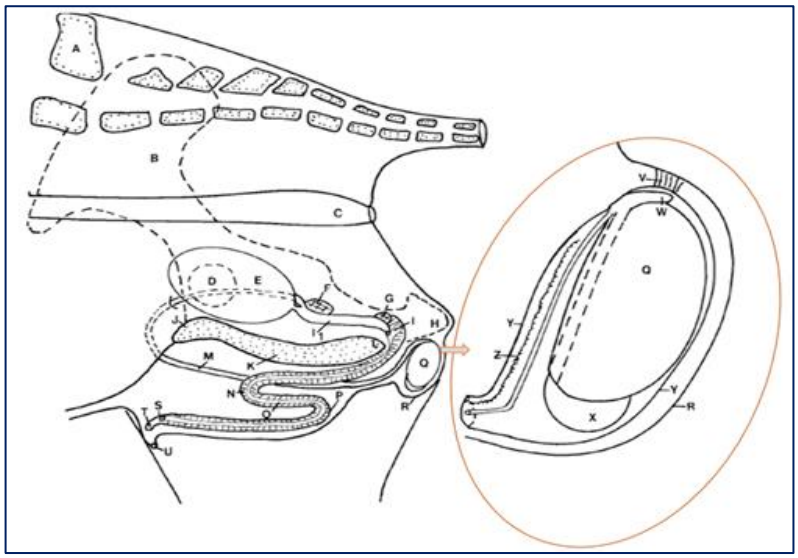


Figura: 2. Diagrama de la vista lateral de los genitales de un camélido macho, adaptado de Fowler., (1998). (A) Columna vertebral, (B) Íleon, (C) Recto, (D) Acetábulo, (E) Vejiga, (F) Glándula prostática, (G) Glándula bulbouretral, (H) Tuberosidad isquiática, (I) uretra dorsal, (J) Ala de la pelvis, (K) Hueso púbico, (L) Arco isquiático, (M) Conducto deferente, (N) Cuerpo cavernoso del pene, (O) Uretra peneana, (P) Glándula sigmoidea del pene, (Q) Testículo, (R) Escroto, (S) Orificio uretral, (T) Punta cartilaginosa del pene, (U) Orificio prepucial, (V) Ligamento escrotal, (W) Cola del epidídimo, (X) Cabeza del epidídimo, (Y) Túnica vaginal communis, (Z) Plexo pampiniforme.

La punta del glande, que es una proyección cartilaginosa firme, tiene la forma de un gancho curvado ligeramente en sentido horario, que sobrepasa a una proyección cónica rígida llamada “proceso uretral” de aproximadamente 1 cm de largo. El orificio uretral está situado en la base del proceso cartilaginoso (Bravo y Johnson, 1994). La anatomía y los movimientos

de rotación y de empuje del glande, le permiten al pene penetrar los anillos del cérvix y depositar el semen en el extremo de los cuernos uterinos en la unión útero-tubárica.

El prepucio es de forma triangular. Se encuentra ubicado en la región inguinal con el orificio prepucial localizado hacia caudal, lo cual le confiere adoptar una posición similar a la de las hembras durante la micción. Durante la erección el orificio prepucial es dirigido hacia adelante por la acción de los músculos retractores del pene (Sumar 1983).

En los CSA las únicas glándulas anexas presentes son la próstata y las glándulas bulbouretrales. Carecen de glándulas seminales (Agüero *et al*., 1997; Tibary y Anouassi, 1997; Fowler, 1998; Giuliano *et al*., 2002a).

1.4. Pubertad en la alpaca macho

En los CSA la edad de la pubertad es variable y está afectada por factores genéticos, nutricionales, climáticos y por la estación en la cual se produce el nacimiento (Sumar, 1988; Tibary y Vaughan, 2006). En la llama y alpaca, cuando nacen, el pene se encuentra totalmente adherido al prepucio y no puede protruir. A medida que el animal crece y se acerca a la pubertad, la liberación de hormonas, induce la desaparición gradual de las adherencias prepuciales. Al año de vida el 8% de la población no presenta adherencias prepuciales, a los dos años el 70% y a los 3 años el 100% esta liberado de las adherencias (Sumar J. 1985). En alpacas, el inicio del comportamiento sexual se observa a partir del primer año de edad (Fernández Baca *et al.*, 1972; Carpio *et al.*, 1999). Los niveles de testosterona en alpacas de menos de 1 año varían entre 0,5 a 1ng/ml, mientras que en machos adultos, la testosterona presenta valores entre 1 a 5 ng/ml (Carpio *et al.,* 1999; Chuna *et al.,* 2000). Se ha descrito que mayores niveles testosterona sérica se relacionan con machos que liberan prematuramente sus adherencias pene-prepuciales (Chuna *et al.,* 2000), siendo confirmado mediante la administración exógena de testosterona (San Miguel C., 2001).

1.5. Métodos de recolección de semen en camélidos sudamericanos

La recolección de semen en camélidos es uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de biotecnologías reproductivas como inseminación artificial tanto en alpacas como en llamas, así como para la evaluación de la capacidad reproductiva de los machos (Novoa y Leyva, 1996). Las características reproductivas, anatómicas y fisiológicas de estas especies tales como el tiempo de cópula prolongado, la conducta sexual, la posición de cópula, la eyaculación intracornual y la extrema viscosidad del semen, determinan que la extracción de semen sea difícil. A continuación, se describen los principales métodos desarrollados para colectar semen en camélidos sudamericanos.

1.5.1. Vagina artificial

Esta técnica la desarrollaron e implementaron Sumar y Leyva (1981), quienes emplearon un maniquí con la forma de una hembra colocada en posición de cópula, basándose en el hecho de que los machos de camélidos montan a toda hembra que adopte la posición de decúbito esternal, simulando una copula normal. Luego de este primer trabajo se realizaron varios estudios con el objetivo de mejorar este método de recolección de semen. Bravo *et al*., (1997); Ferré *et al*., (1996); Lichtenwalner *et al*., (1996) desarrollaron modelos de vagina artificial (VA) termoestables. Dávalos y Olazábal, (2002) encontraron que el uso de la vagina artificial utilizando una hembra receptiva como súcubo, aumenta la calidad de los eyaculados, en comparación al uso del maniquí, incrementando también el tiempo de cópula.

Las desventajas de implementar esta técnica son las siguientes:

1. Si se usa un maniquí como súcubo es necesario adiestrar a los machos tanto para el uso del maniquí como para la vagina artificial. El entrenamiento dura en promedio 20 días y sólo es factible en machos dóciles y acostumbrados al manejo por el hombre (Giuliano *et al*., 2012).
2. La carencia parcial o total de libido y la indocilidad de algunos machos han provocado porcentajes de rechazo (10 al 40 %) a la maniobra de recolección con (VA) (Giuliano *et al*., 2012).

3. El uso de una hembra como súcubo presenta las mismas dificultades que el uso de un maniquí en cuanto al adiestramiento.
4. El eyaculado suele contener espuma y/o impurezas (pasto, semillas, tierra) arrastradas por el pene o el prepucio, siendo una de las mayores desventajas de esta técnica. Tanto la contaminación con material extraño como la espuma pueden tener un efecto deletéreo sobre los espermatozoides impidiendo de esta manera una correcta evaluación de la calidad del eyaculado. Por otra parte la presencia de espuma ha dificultado la evaluación del volumen (Von Baer y Hellemann, 1998, Giuliano *et al*., 2012).

1.5.2. Fístula uretral y desviación de los conductos deferentes

Estas dos técnicas son de índole quirúrgicas y estarían indicadas solamente para realizar investigaciones ya que inutilizan al camélido para su posterior uso reproductivo.
La desviación de los conductos deferentes (DCD), consiste en el desvío quirúrgico de los conductos deferentes hacia la cara interna del muslo o la región ventral del camélido intentando así, colectar espermatozoides sin que estos tengan contacto con las secreciones de las glándulas anexas. A través de la fístula permanente se colectan los espermatozoides una vez por semana durante la época reproductiva. Este método de recolección tiene como ventajas el hecho de prescindir de una hembra receptiva para la colecta y de contar con muestras sin plasma seminal viscoso y por lo tanto de fácil manejo (Paricahua, 2001).

1.5.3. Aspiración post coital

Este método de colección de semen consiste en que el macho monte a una hembra receptiva y luego de terminar la copula, inmediatamente se procede a la aspiración del semen del fondo de la vagina, mediante la colocación de una pipeta adosada a una jeringa. Este método no es invasivo, pero se observa que la muestra de semen es incompleta, contaminada y diluida con las secreciones del tracto genital de la hembra y con gran presencia de eritrocitos. Este método se puede utilizar para evaluar parámetro espermático como morfología. La utilización de este tipo de semen para evaluar la fertilidad del macho es muy cuestionada (Pacheco, 2008). Neely y Bravo (1997), utilizaron este método en forma intensiva durante cinco años obteniendo datos de movilidad y morfología de los espermatozoides.

1.5.4. Electroeyaculación

Hasta la actualidad el único método con el que se ha podido extraer semen de CSA silvestres es mediante electroeyaculación (EE) (Giuliano *et al*., 2002; Pacheco *et al*., 2010; Giuliano *et al*., 2009). Giuliano *et al*., 2008, al comparar eyaculados de llama obtenidos con EE versus VA, obtuvieron eyaculados con mayor volumen, movilidad espermática e integridad espermática y con menor porcentaje de cabezas sueltas al utilizar EE que con VA. Mediante electroeyaculación se pueden obtener eyaculados potencialmente fértiles sin necesidad de la cooperación del macho. Con esta metodología se han obtenido preñeces con semen refrigerado (Giuliano *et al*., 2012) y embriones *in vitro* (Trasorras *et al*., 2014). Mediante esta tecnología se pueden obtener eyaculados sin espuma y limpios de calidad igual o superior a los obtenidos mediante VA (Giuliano *et al*., 2008). Su mayor desventaja es que se necesitan profesionales y equipo especializado para realizar anestesia general y el protocolo correcto de preparación y estimulación eléctrica.

Teniendo en cuenta las características, ventajas y desventajas de los métodos de extracción de semen, los métodos de electroeyaculación y de vagina artificial serían los adecuados para implementar protocolos de evaluación, de investigación, de inseminación artificial y de producción de embriones *in vitro*.

1.6. Características y evaluación del semen de camélidos sudamericanos

La particularidad del plasma seminal de los camélidos sudamericanos, radica en que el mismo es filante y muy viscoso (Casaretto *et al*., 2011a). Por lo tanto cuando el eyaculado se pipetea con una micropipeta se observa que forma un hilo de extensión variable (Bravo *et al*., 1999 y 2000b; Giuliano *et al*., 2010). Garnica *et al*., (1993) incubaron semen de alpaca a 37 ºC y observaron que el tiempo requerido para disminuir la viscosidad fue de 23±1,2 h (promedio ±DS) con un rango de 8 a 48 h. Se determinó que al incubar el semen de llama con una solución de colagenasa en Hepes-TALP, se podía disminuir la filancia de las muestras, separar los espermatozoides del plasma seminal e inducir movilidad progresiva manteniendo la vitalidad de los espermatozoides y así obtener embriones mediante las técnicas de ICSI y FIV (Giuliano *et al*., 2010; Trasorras *et al*., 2012; 2013). Por lo tanto para optimizar el semen y poder trabajar adecuadamente es que se ha hecho necesario utilizar un

método enzimático antes de la preservación del mismo (Carretero *et al*., 2012; Kershaw-Young *et al*., 2013; Carretero *et al*., 2014). Otra característica a tener en cuenta con respecto al plasma seminal de llama y alpaca es la presencia de espuma en el eyaculado (Ferré *et al*., 1996; Von Baer y Hellemann, 1998; Aller *et al*., 2003; Giuliano *et al*., 2008).

Con respecto a la movilidad espermática, es característico de los eyaculados de llama y alpaca que los espermatozoides sólo presenten movilidad en el lugar u oscilatoria, o que carezcan por completo de movilidad (Lichtenwalner *et al*., 1996; Von Baer y Hellemann, 1998; Bravo *et al*., 1999, Vaughan *et al*., 2003; Giuliano, *et al*., 2008; 2010). Con respecto a la evaluación del semen de los CSA, al estudiar el factor individuo, se determinó que cada macho presentó características diferentes para cada variable (Giuliano *et al*., 2008). Es de conocimiento que la evaluación de las características del semen es necesaria para implementar planes de manejo reproductivo y que los métodos tradicionales de estimación de la calidad de los eyaculados de diferentes especies se han basado principalmente en la evaluación de la movilidad individual, la morfología espermática y el número total de espermatozoides. Debido a que estas características han tenido una capacidad limitada para predecir la fertilidad de los eyaculados se han desarrollado métodos para la evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática. Debido a que los espermatozoides de CSA no presentan movilidad progresiva se han puesto a punto otros test para evaluar el semen. El test de endósmosis en la llama fue puesto a punto por Giuliano *et al*., (2002b). Estos autores determinaron que en el eyaculado de llama existe una población de espermatozoides inmóviles con las membranas funcionales e íntegras (Giuliano *et al*., 2008). El test de endósmosis ha sido reportado también en espermatozoides de alpaca (Vázquez *et al*., 2012; Flores *et al*., 2014; Zirena *et al*., 2015).

Con respecto a la evaluación de la morfología espermática de los CSA, se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre machos en el porcentaje de espermatozoides normales y que esta variabilidad también se vio reflejada en el rango de los coeficientes de variación de cada macho (Giuliano *et al*., 2008). Asimismo debido al gran polimorfismo que presentan los espermatozoides de estas especies no ha sido posible detectar un solo patrón morfológico al realizar mediciones morfométricas objetivas a 8000 cabezas de espermatozoides de llama mediante un analizador digital de imágenes (Casaretto *et al*., 2011b).

1.6.1. Determinación de la calidad seminal mediante el sistema ISAS PROISER

Los primeros intentos de medir objetivamente el movimiento espermático se basaron en exposiciones fotográficas múltiples o en video-microfotografías. Estos métodos son tediosos, por lo que disminuyó su utilización, (Boyers *et al.,* 1989). La aparición de los sistemas informáticos de digitalización de imágenes abrió un nuevo campo en el estudio de la movilidad de los espermatozoides. Estos sistemas denominados genéricamente sistemas CASA (Computer Assited Motility Analysis), han automatizado y simplificado el proceso. El análisis computarizado de la movilidad espermática fue propuesto por primera vez para su uso por (Dott y Foster 1979), y es usado en la actualidad por centros de investigación en andrología y centros de reproducción asistida. Este sistema permite evaluar varios parámetros incluyendo concentración, vitalidad, morfometría y movimiento espermático. Mediante el sistema CASA se pueden determinar de una manera objetiva medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides (Montimer, 2000). Con este tipo de análisis se espera obtener medidas correctas de movilidad espermática que proporcionen información precisa acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas.

1.6.2. Subpoblaciones espermáticas en el eyaculado seminal

Es de conocimiento a existencia de espermatozoides con características funcionales y de movilidad diferentes dentro de un eyaculado (Chang y Hunter, 1975; Bedford, 1983; Renard *et al.,* 1996; Holt, 1996; Abaigar *et al.,* 1999 y 2001; Rigau *et al.,* 2001). Sin embargo el rol que pueden tener los grupos de espermatozoides con características de movilidad similares, en la calidad seminal global de un eyaculado, no ha sido bien estudiado hasta el momento. El principal problema que existía para el estudio de subpoblaciones de espermatozoides es su caracterización, porque aún no existían herramientas suficientemente eficaces para lograrlo. Esta situación viene cambiando con la implementación del sistema CASA, que permite diferenciar a los espermatozoides de una manera individual por sus características de movilidad (Rodríguez Gil, 2000). Esto resalta la importancia de estudiar los espermatozoides en un eyaculado no como un conjunto homogéneo, sino como el resultado de la combinación de diversas subpoblaciones heterogéneas que no son evidentes a simple vista. En los últimos años se ha demostrado la existencia de subpoblaciones

espermáticas con distintos patrones de movimiento en los eyaculados de todas las especies estudiadas, como en el cerdo, caballo o el perro (Holt, 1996; Abaigar *et al.*, 1999; Thurston *et al.,* 2001; Rivera *et al.,* 2002; Quintero *et al.,* 2003).

El sistema CASA permite identificar la existencia de subpoblaciones espermáticas con distintos patrones de movimiento en una misma muestra de semen (Davis *et al.,* 1995; Holt 1996; Quintero *et al.,* 2003). También se ha observado que espermatozoides pertenecientes a distintas subpoblaciones responden de forma diferente a procesos como la criopreservación, Abaigar *et al.*, (1999). En la Figura 3 se puede observar la representación gráfica de los diferentes parámetros de movilidad espermática obtenidos por el Sistema ISAS PROISER y en la Tabla 2 se puede observar la descripción de los diferentes parámetros de movilidad espermática obtenidos por el Sistema ISAS PROISER.

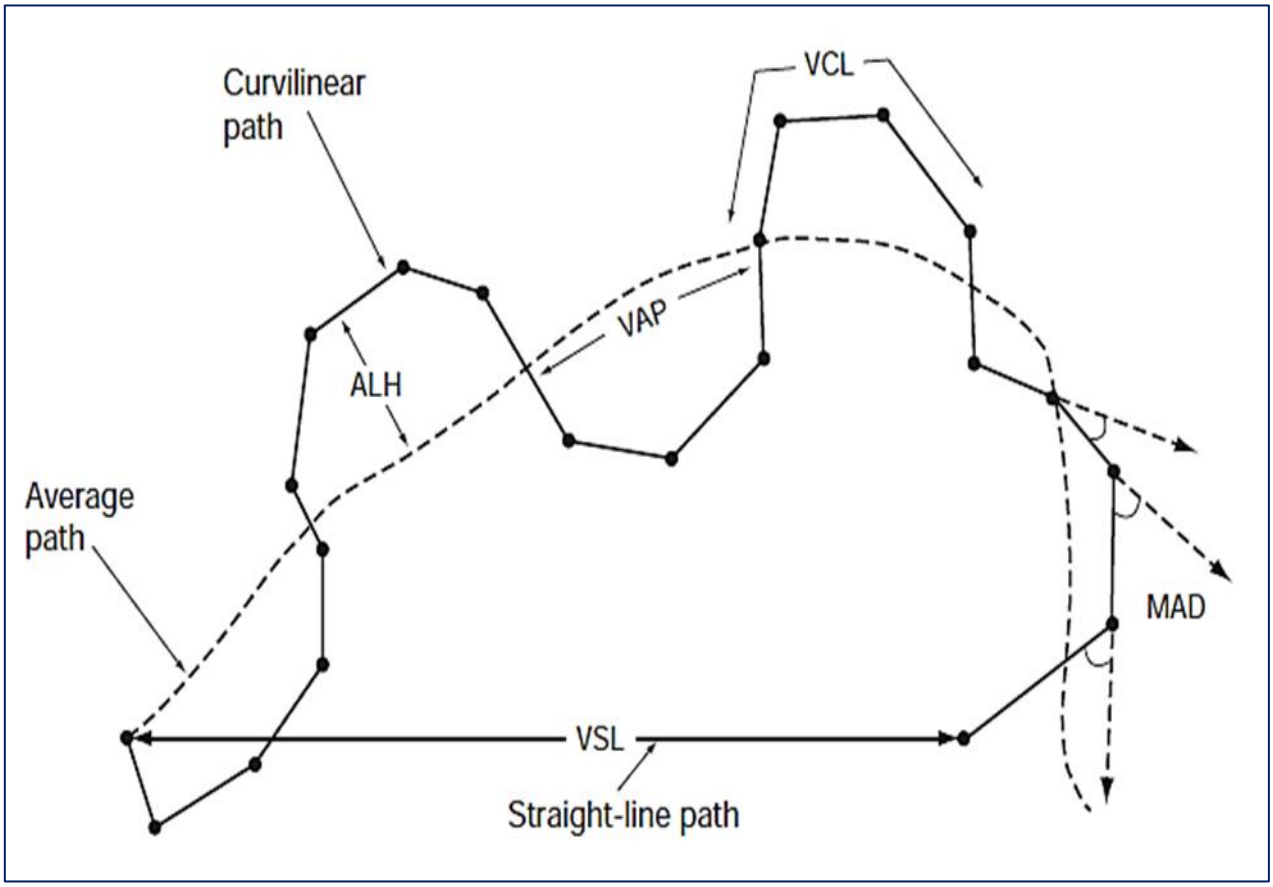


Figura: 3 Representación gráfica según WHO, 2010. Diferentes parámetros de la movilidad espermática obtenidos por el Sistema ISAS PROISER. VCL: Velocidad Curvilínea, VSL: Velocidad Rectilínea, VAP: Velocidad Media.

Tabla: 2. Parámetros de movilidad espermática ISAS PROISER (2010), Quinteros *et al*., (2003).

Parámetro	Unidad	Descripción
Según el tipo de movilidad del espermatozoide		
Estáticos	% o 10^6 /ml	Son todos los espermatozoides que no muestran movimiento alguno.
Estáticos no progresivos	% o 10^6 /ml	Son todos los espermatozoides que muestran movimiento pero no es progresivo.
Estáticos progresivos	% o 10^6 /ml	Son todos los espermatozoides que muestran movimiento progresivo.
Parámetros que mide el ISAS		
Velocidad Curvilínea (VCL)	µm /s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
Velocidad Rectilínea (VSL)	µm /s	Distancia recorrida por el espermatozoide del primer punto al último punto de su trayectoria.
Velocidad Media (VAP)	µm /s	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media.
Índice de Linealidad (LIN)	%	Relación porcentual entre la VSL y VCL.
Índice de Rectitud (STR)	%	Relación porcentual entre la VSL y VAP.
Índice de Oscilación (WOB)	%	Relación porcentual entre la VAP y VCL.
Amplitud del Desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH)	µm	Desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
Frecuencia de batida de la cabeza (BCF)	Hz	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo.

1.7. Morfología y morfometria espermática

El estudio de la morfología del espermatozoide es un análisis de laboratorio de rutina para evaluar la calidad de un eyaculado. En varias especies, una disminución en el porcentaje de los espermatozoides normales está correlacionada con una disminución en la fertilidad del reproductor. Giuliano *et al*., 2008 determinaron que la morfología y morfometria en llamas presentan diferencias significativas entre machos en los parámetros estudiados. Buendía *et al*., (2002); Martí *et al*., (2011); Casaretto *et al*., (2011b), mencionan que los análisis de morfometría asistido por computadora con sistema CASA, se permiten medir en forma objetiva la forma y dimensiones de la cabeza de espermatozoide. Este programa puede revelar diferencias sutiles entre individuos que no pueden ser detectados con métodos subjetivos. La morfología del espermatozoide es un componente esencial de la evaluación seminal, en muchas especies la disminución del porcentaje de espermatozoides normales esta correlacionado con una disminución de la fertilidad (Ordoñez *et al*., 2012). El análisis morfométrica que realiza el ISAS, 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).

Tabla: 3. Caracterización morfométrica de los espermatozoides de alpacas

Variable	Media + DS	% CV	Asimetría	Curtosis
Tamaño de la cabeza				
Largo (µm)	5,89±0,62	10,51	0,95	2,03
Ancho (µm)	3,50±0,33	9,33	0,06	-0,34
Área (µm)	15,02± 1,81	12,01	0,03	-0,41
Perímetro (µm)	17,52±1,44	8,24	0,11	0,07
Forma de la cabeza				
Elipticidad*	1,70±0,24	13,83	0,69	0,96
Rugosidad*	0,62±0,07	12,14	0,97	5,87
Elongación*	0,25±0,06	24,84	0,12	0,05
Regularidad*	1,08±0,11	10,38	1,66	6,68
Acrosoma (%)	46,58±9,96	21,39	-0,45	-0,57
Tamaño pieza intermedia				
Área (μm^2)	3,66±0,99	27,26	0,07	-0,46
Ancho (µm)	1,77±0,47	26,38	0,04	-0,58
Inserción pieza intermedia				
Distancia(µm)	0,24±0,20	81,97	1,46	1,45
Angulo(grados)	7,85±5,81	73,98	1,07	1,21

Leyenda: *No dimensionales DS: desviación estándar CV: coeficiente de variabilidad. Adaptación de Ordoñez *et al*., (2012).

Tabla: 4. Parámetros de morfometría espermática que determina el ISAS.

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

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

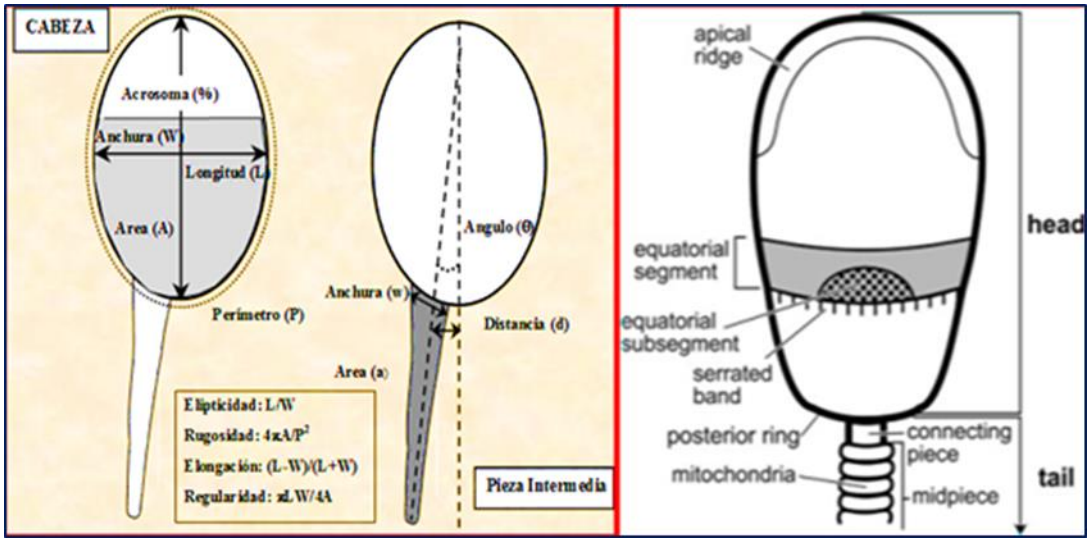


Figura: 4. Parámetros de evaluación morfométrica del espermatozoide de llama (cabeza y pieza intermedia). Fuente: Soler *et al*., (2005).

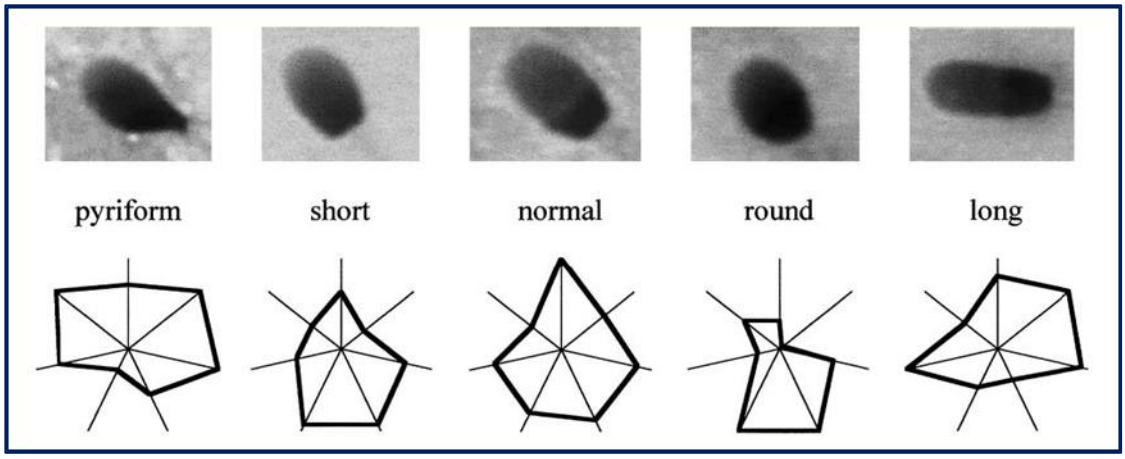


Figura: 5. Representación de la morfología de la cabeza de espermatozoide de alpaca: piriforme, corto, normal, redondeado y largo. Fuente: Buendia *et al.*, (2002).

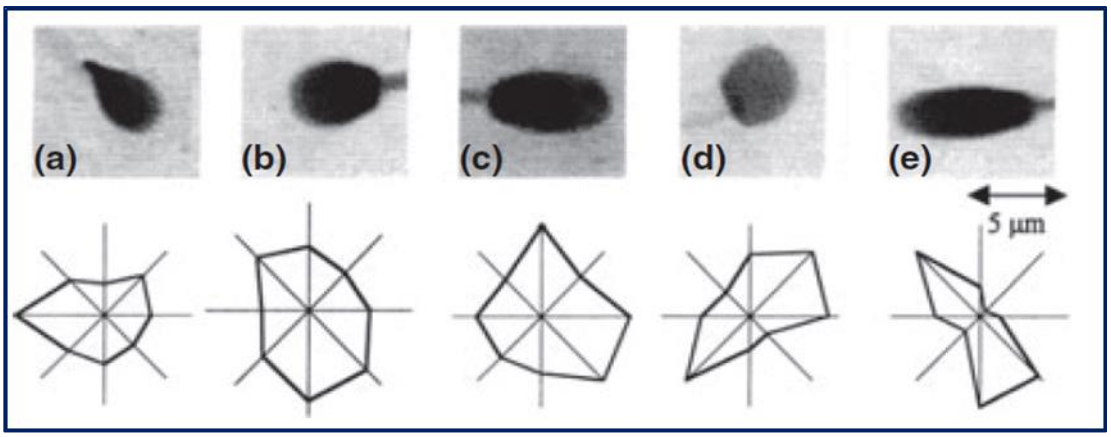


Figura: 6. Representación de la morfología de la cabeza del espermatozoide de llama: (a) piriforme; (b) normal; (c) largo; (d) redondeado; (e) estrecho. Fuente: Soler *et al*., (2013).

1.8. Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos

El desarrollo de la inseminación artificial (IA) en los CSA, está limitada al uso de semen fresco con una tasa de preñez máxima de 77%, en centros experimentales, y de no más de 50% en criaderos particulares (Huanca *et al.,* 2007). Utilizando semen congelado de llama y alpaca se ha obtenido hasta el momento una tasa máxima de preñez del 26% (Bravo *et al.,* 2000a; Aller *et al.,* 2003; Vaughan *et al.,* 2003). Los reportes sobre el efecto del congelamiento de los espermatozoides de CSA, y referentes a IA con semen congelado son exiguos. Bravo *et al.,* (2000a) obtuvieron, en alpacas, un 26% de preñez utilizando un diluyente a base de citrato de sodio - yema de huevo y un 7% de glicerol. Aller *et al.,* (2003), obtuvieron un 7% de preñez, en llamas, utilizando un diluyente que contenía citrato de sodio - yema de huevo - glucosa, glicerol y DMSO. Vaughan *et al.,* (2003), obtuvieron resultados negativos luego de inseminar alpacas con semen congelado utilizando el diluyente Green/clear camel buffer® y utilizando Biladyl® A y B. En un estudio más reciente sobre los efectos del congelamiento sobre la movilidad espermática e integridad de la cromatina de espermatozoides de alpaca, Santiani *et al*., (2013), concluyeron que es necesario realizar más estudios sobre el efecto especie específico de los crioprotectores. Debido a las características particulares del semen Morton *et al.,* (2010), congelaron espermatozoides provenientes de epidídimo, para evitar la filancia del plasma seminal, con diluyentes a base de citrato, Tris o lactosa obteniendo el mayor porcentaje de movilidad y de acrosomas intactos con el diluyente a base de lactosa. Por otra parte, Maxwell *et al*., (2008), no obtuvieron preñeces inseminando

con espermatozoides de epidídimo criopreservados. Esta situación ha conducido a que actualmente no se practiquen campañas de IA, con semen congelado de CSA, en los establecimientos que producen llamas y/o alpacas con el consiguiente atraso en el aprovechamiento de esta biotecnología.

Con respecto a los protocolos de criopreservación en los CSA, el glicerol al 7% ha sido prácticamente el único crioprotector empleado (Bravo *et al.,* 2000a; Aller *et al*., 2003; Vaughan *et al.,* 2003; Santiani *et al.,* 2005; Morton *et al.,* 2010). En menor medida se ha probado etilenglicol en alpacas (Santiani *et al.,* 2005; 2013). En semen de llama, se ha observado que el agregado del crioprotector N, N-Dimetilformamida conservó la movilidad, vitalidad, integridad funcional de la membrana plasmática espermática y a su vez conservó la integridad y la condensación de la cromatina de los espermatozoides de llama. No lográndose el mismo resultado utilizando glicerol al 7%, en cuyas muestras se obtuvo muy baja movilidad espermática y entre un 87-100% de espermatozoides con el ADN dañado según Carretero *et al*., (2014).

1.8.1. Criopreservación de espermatozoides de Alpaca

Tabla: 5. Criopreservación de espermatozoides en Alpacas

Autor	Año	Especie	Origen de muestra	Diluyente/Crioprotector	Movilidad %	
					Fresco	Congelado
Vaughan *et al*	2012	Alpaca	Semen	Tris - Citrato - Fructosa	50	10
Morton *et al*	2010	Alpaca	Epidídimo	Lactosa - Glicerol 2%	52,7	16,1
				Lactosa - Glicerol 3 %		20,5
				Lactosa - Glicerol 4%		18,5
				Biladyl	53,0	14,4
				Biladyl - Equex		21,5
Banda *et al*	2010	Alpaca	Epidídimo	Leche	31,0	17,0
Rodríguez	2009	Alpaca	Epidídimo	Tes - DMA	21,2	13,59
				Tes - DMA - plasma seminal		16,31
Morton *et al*	2007	Alpaca	Epidídimo	Citrato	46,9	6,9
				Lactosa		18,2
				Tris		11,3
Santiani *et al*	2005	Alpaca	Semen	Leche - etilenglicol	72,0	20,0
				Leche - glicerol		15,3
				Tris - glicerol		4,0
				Tris - etilenglicol		1,0
Bravo *et al*	2000b	Alpaca	Semen	Citrato - yema	80,0	30 - 40
Valdivia *et al*	2000	Alpaca	Semen	Glicerol - yema	60 - 98	15 - 20

En estudios realizados en espermatozoides de alpacas obtenidos de un eyaculado, la movilidad espermática, luego de ser criopreservados, varió o disminuyó a valores que se encuentran entre el 10% a 20% (Morton *et al.*, 2007, 2010; Santiani *et al.*, 2005) mientras que Valdivia *et al.*, (2000) y Bravo *et al.*, (2000b), reportaron resultados ligeramente superiores frente a los otros autores, las diferencias pueden ser atribuidas a diferentes metodología de criopreservación. Es interesante destacar que según Rodríguez (2009), si bien la movilidad post descongelamiento varían o bajan a un valor del 20%, los porcentajes de vitalidad pueden alcanzar un rango de 40% a 50%. Asimismo, se puede observar que el acrosoma no experimenta un daño importante durante el proceso de criopreservación

(Morton *et al.*, 2007, 2010; Santiani *et al.*, 2005). Estos resultados indicarían que las muestras espermáticas cuando son sometidos a los diferentes procesos de criopreservación y descongelamiento, presentan bajos porcentajes de movilidad, pero no causándole la muerte del espermatozoide.

1.9. Agentes crioprotectores permeables

Los agentes crioprotectores permeables son sustancias de bajo peso molecular y por ello pueden ingresar a la célula a través de la membrana plasmática. Estos agentes al ingresar a la célula, evitan los efectos nocivos de la deshidratación excesiva causada por la congelación lenta. Asimismo, los crioprotectores que atraviesan la membrana plasmática reemplazan el volumen de agua que sale al medio extracelular. Consecuentemente, los crioprotectores también mantienen el volumen celular, evitando el colapso de los espermatozoides por una deshidratación excesiva (Medeiros *et al.*, 2002). Los más utilizados son glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido y propanediol (Boiso, 2001). Los agentes crioprotectores penetrantes, dependiendo de su concentración, pueden ser tóxicos para los espermatozoides, induciendo alteraciones en la membrana plasmática y disminuyendo la movilidad espermática (Medeiros *et al.*, 2002).

1.10. Agentes crioprotectores no permeables

Los agentes crioprotectores no permeables son sustancias de alto peso molecular que ejercen su acción crioprotectora por inducción osmótica debido a la rápida deshidratación celular, provocando una disminución del contenido hídrico intracelular, evitando la formación de cristales de hielo en la célula criopreservada (Medeiros *et al*., 2002). También aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas. Por lo tanto, reducen la formación de cristales de hielo (De Leeuw *et al.*, 1993). Además se ha encontrado que los azúcares interactúan con la membrana plasmática al formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los azúcares con los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana. Al reemplazar el agua alrededor de los fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw *et al.*, 1993). Estos agentes suelen usarse en asociación con los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil-pirrolidona (PVP), dextrano, polietilenglicol.

1.11. Planteo del problema

Las características particulares del semen de los CSA, han condicionado el desarrollo de protocolos de IA con semen criopreservado (Tibary y Vaughan, 2006; Maxwell *et al*., 2008; Giuliano *et al*., 2012; Kershaw Young *et al*., 2013; Carretero *et al*., 2014). Las características reológicas (alta viscosidad y filancia) han dificultado mucho el manejo del semen de CSA, en el laboratorio, obstaculizando la evaluación de los eyaculados, la separación de los espermatozoides del plasma seminal, el fraccionamiento de los eyaculados en alícuotas, la dilución y el envasado de las pajuelas (Tibary y Vaughan, 2006; Huanca W. *et al*., 2007; Giuliano *et al*., 2012; Kershaw Young *et al*., 2013; Carretero *et al*., 2014). También, se ha postulado que podrían impedir la interacción de los crioprotectores con la membrana plasmática de los espermatozoides (Kershaw Young *et al*., 2013). Diferentes enzimas (tripsina, colagenasa, fibrinolisina, hialuronidasa, papaína) se han utilizado para disminuir la viscosidad del plasma seminal en CSA, con resultados variables (Bravo *et al*., 1999; 2000b; Giuliano *et al*., 2010; Kershaw Young *et al*., 2013). Giuliano *et al*., (2010), demostró que al incubar el semen de llama con una solución de colagenasa en Hepes-TALP, se modificó la filancia de las muestras, separando los espermatozoides del plasma seminal e induciendo la movilidad espermática progresiva manteniendo la vitalidad de los espermatozoides y así procedieron a obtener embriones mediante las técnicas de ICSI y FIV, (Giuliano *et al*., 2010; Trasorras *et al*., 2012; 2013). Para optimizar y determinar las características seminales de las alpacas macho y poder trabajar adecuadamente es que se ha hecho fundamental utilizar un método enzimático antes de la preservación del mismo, según (Carretero *et al*., 2012; Kershaw Young *et al*., 2013; Carretero *et al*., 2014)

Debido a que, hasta el momento, en los protocolos de criopreservación en los CSA el glicerol al 7% ha sido prácticamente el único crioprotector empleado, sin resultados repetibles, es que se ha buscado reemplazarlo por otros crioprotectores. Las amidas son crioprotectores penetrantes de menor peso molecular comparado con el glicerol, característica que les permite penetrar la membrana plasmática espermática más rápido disminuyendo su toxicidad (Squires *et al*., 2004). En llamas, se observó que el equilibramiento a 5º C y el agregado de N, N-Dimetilformamida al 7% conservó la movilidad, vitalidad e integridad funcional de los espermatozoides de llama, no obteniéndose el mismo resultado utilizando glicerol al 7% (Giuliano *et al*., 2012; Carretero *et al*., 2014).

Además, se observó que el glicerol al 7% inducía de un 87% a 100% de fragmentación de la cromatina espermática (Carretero *et al*., 2014).

Como ya fue mencionado, las características particulares que tiene el plasma seminal en los CSA no permiten un buen manejo del semen, dificultando la interacción de los espermatozoides con los crioprotectores y el envasado de las pajuelas, por lo tanto se hace necesario un tratamiento enzimático que posibilite el manejo de las muestras a criopreservar. Por otra parte, el uso de glicerol como crioprotector penetrante, podría tener un efecto tóxico en los espermatozoides de CSA (Carretero *et al*., 2014). Consecuentemente, es de interés desarrollar un protocolo de criopreservación de espermatozoides de alpaca que incluya un tratamiento enzimático y la utilización de otro crioprotector penetrante como la N, N-Dimetilformamida.

1.11.1. Objetivo general

De los antecedentes expuestos se desprende la necesidad de continuar con investigaciones y estudios tendientes a obtener protocolos de criopreservación de semen de alpaca que preserve la movilidad, funcionalidad, morfología y vitalidad espermáticas. Consecuentemente el objetivo general del presente estudio fue diseñar un protocolo de criopreservación que preserve la movilidad, vitalidad y funcionalidad de membrana espermática, morfometría e integridad del acrosoma de los espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). Los objetivos específicos son:

a. Objetivo específico 1

Determinar si la incubación con colagenasa al 0,1% disminuye la filancia del plasma seminal preservando la movilidad, vitalidad, funcionalidad de membrana espermática e integridad del acrosoma de los espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*).

b. Objetivo específico 2

Determinar si el crioprotector penetrante N, N-Dimetilformamida al 4 y/o al 7% preserva la movilidad, vitalidad, integridad funcional de la membrana plasmática, morfometría e integridad del acrosoma de los espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*).

CAPÍTULO II

2. Materiales y métodos

2.1. Animales y locación

El estudio en su fase experimental, se realizó durante el año 2014, en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS), La Raya, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), situado en el distrito de Marangani, Provincia de Canchis, departamento de Cusco, República del Perú y en el Instituto de Investigaciones y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), en la cátedra de Teriogenología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, República Argentina. Se utilizaron 5 alpacas macho (*Vicugna pacos*), de la raza Huacaya de 4 a 6 años. Los animales tuvieron una alimentación de pastura natural y contaron con agua ad libitum. Ubicación del CICAS - La Raya, se halla comprendido entre:

Latitud Sur: 14°28'.15°45''

Longitud Oeste: 69°00'.75°00''; Altitud: 4,130 msnm.

Promedio de precipitación pluvial: 965 mm.

Temperatura promedio anual: 6,54 °C - 13.5 °C.

UTM: 19L 279476,09m E 398848,92m S

Fuente: Estación meteorológica del CICAS - La Raya (1995).

Figura: 7. Ubicación del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS).

Figura: 8A. Ámbito del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del CICAS-La Raya de la Facultad de Ciencias Agrarias - (UNSAAC) y 8B. Alimentación de las alpacas con pastura natural.

2.2. Equipos y materiales para la recolección de semen

Durante el desarrollo de la tesis se utilizaron los siguientes equipos e insumos: Microscopio de contraste de fases y de fluorescencia (UOP – UB200i y cámara con software ISAS V 1.1), un electroeyaculador (E*lectrojac 5* manual/automático 19/32 V- Ideal Instruments, EE.UU), un ecógrafo Agroscan L-10-France, Termómetros digitales (Multi-thermometer, -50°C a +300°C), Thermocouple (OaktonTemp 10K), un Peachimetro Mettler Toledo InLab® Expert Pro - ISM pH, Balanza digital de precisión (Highland-Adam Equiment - Max: 120g x 0,001g), un balón de nitrógeno, una heladera y Freezer.

También alcohol isopropilico, alcohol etílico de 70°, 96° y alcohol absoluto 100º, alcohol polivinílico, agua bidestilada (ABD). Además de los siguientes reactivos; N, N Dimetilformamida. Collagenasa from clostridium histolyticum for general use, Type I, 0,25-1.0 FALGPA units/mg solid ≥125 CDU /mg 100 MG. Brilliant blue G 250, For microscopy 25G. Ácido acético 50 ml. Metanol concentrado 50 ml. Solución de coloración kit Hemacolor. Solución de TALP. PBS. Formaldedeido al 4%. Solución hiposmótica: citrato de sodio, fructosa (HOS test). Dilutor compuesto por TRIS, fructosa y yema de huevo (25%). Solución de coloración-tinción Hemacolor. Colorante Hancock stain. Anestesicos: Ketamina y Xilacina (HalatalKT®, Dormi - Xyl®2).

Una Micro pipeta de 0,5 -10 µl y 10 - 100 µl (BOECO Germany SP Series), Termo descongeladora Tips de 0,5-10 µl y 10-100 µl. Pajuelas de 0,25 ml. Gobebets y porta gobelets, Portaobjetos y cubreobjetos, guantes quirúrgicos y barbijos, Tubos Ependorff (2 ml) y tubos falcon (50 ml). Jeringas descartables de 5 ml. Aceite de inmersión.

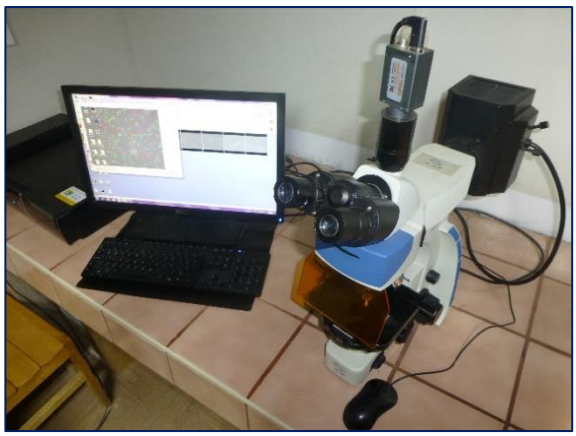


Figura: 9A. Microscopio de contraste de fases y de fluorescencia (UOP - UB200i y cámara con software ISAS V 1.1) y 9B. Electroeyaculador (E*lectrojac 5* 19/32 V).

Figura: 10A. Materiales para criopreservación y 10B. Materiales para sedación y extracción de semen.

Figura: 11A. Tinciones para morfometria y 11B. Crioprotector N, N-Dimetilformamida.

2.2.1. Laboratorio

Las características microscópicas del semen de alpaca (movilidad, concentración, morfometría, vitalidad, funcionalidad de la membrana espermática e integridad de acrosoma), fueron evaluados en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas, del CICAS, La Raya, el cual cuenta con el equipo Integrated Sperm Analysis System (ISAS v 1.1).

2.3. Selección de los machos de alpaca

Se preseleccionaron 10 machos del plantel de reproductores del CICAS - La Raya; se seleccionaron aquellos exentos de problemas reproductivos, de defectos congénitos y clínicamente sanos. Los animales preseleccionados presentaron pesos de 63±1,4 Kg. A estos 10 machos, se les extrajo semen durante 4 semanas mediante electroeyaculación (EE), seleccionándose 5 alpacas por su adaptación al método de extracción de semen para la colección.

Figura: 12A. Registro del peso corporal y 12B. Ubicación de la distancia ano-próstata mediante ecógrafo Agroscan L-10.

2.4. Procedimiento para la extracción de semen en alpacas

Para la extracción del semen, se utilizó la técnica de (EE), según técnica descrita por (Director *et al*., 2007); a. La medición de la distancia ano-próstata se realizó con un ecógrafo portátil. Se realizó tres veces en cada macho luego se determinó el promedio de la distancia ano-próstata para cada animal. Esta medición es necesaria para poder ubicar el vástago del electroeyaculador sobre la próstata durante la extracción del semen. b. Sedación y anestesia general: la EE se realizó en todos los casos con el animal anestesiado con Ketamina 10% (2.3 ml /100 kg/PV) y Xilazina 2% (1,4 ml / 20 kg/PV). c. Estimulación eléctrica: una vez anestesiado, el animal fue colocado en decúbito lateral y se le lavó el prepucio con agua destilada a 37° C. El vástago lubricado con gel se introdujo cuidadosamente en el recto, ubicando los electrodos sobre la próstata. Para realizar la electroestimulación se utilizó el electroeyaculador. El voltaje se incrementó en 0,2 V desde 2 V hasta los 14 V. El semen se recolectó en tubos falcón, protegidos por una funda externa que mantuvo una temperatura de 37 °C. Solamente se procesaron aquellas muestras con una concentración mínima de $30x10^6$ espermatozoides/ml. No se procesaron las muestras contaminadas con orina.

El protocolo de extracción de semen mediante EE, ha sido aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Ciencias Veterinarias (protocolo 2010/24).

Figura: 13A. Grupo de alpacas machos del estudio y 13B. Proceso de sedación según peso corporal de cada alpaca (HalatalKT®, Dormi -Xyl®2).

Figura: 14A. Suministro con solución fisiológica al prepucio y 14B. Lavado del prepucio con solución fisiológica .

Figura: 15A. Proceso de EE para la extracción de semen. 15B. Exteriorización del pene de la alpaca previo al inicio de la expulsión de semen.

2.5. Evaluación de las muestras seminales

2.5.1. Determinación de las características macroscópicas del semen

Inmediatamente después de la extracción del semen se procedió con la evaluación del volumen, grado de filancia del semen, pH, y color según protocolo del laboratorio del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos que se detallan a continuación:

Volumen: se medió utilizando un tubo graduado.

Filancia: se evaluó observando si las muestras forman o no un hilo al ser pipeteadas utilizando una pipeta Pasteur.

pH: se evaluó con el Peachimetro.

2.5.2. Estudio de las características microscópicas del semen

a. Movilidad espermática:

Se evaluó en el módulo del Integrated Sperm Analysis System (ISAS® v1.1) (Proiser R+D, Paterna, Valencia - España) usando un microscopio UOP-UB200i, equipado con un lente de 10x de contraste de fases negativo y platina atemperada a 37 °C Las diferentes muestras se evaluaron con una lente de 10X de contraste de fase negativo (equipo CASA). Se evaluaron 7 micro imágenes, cada señal de video fue adquirida con un video cámara Proiser 782C, que consta de la captura de 25 imágenes por segundo. El módulo de Movilidad del ISAS - PROISER® v1.1. evaluó automáticamente parámetros de motilidad espermática como espermatozoides: Estáticos, Móviles no progresivos (MNP), Móviles progresivos (MP) y otros Parámetros de movilidad: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad rectilínea (VSL), Velocidad media (VAP), Índice de linealidad (LIN), Índice de rectitud (STR), Índice de oscilación (WOB), Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH), Frecuencia de batida de la cabeza (BCF).

b. Concentración espermática

Se determinó mediante el módulo de Vitalidad del Integrated Sperm Analysis System (ISAS® v1.1) (Proiser R+D, Paterna, Valencia - España) usando un microscopio UOP-UB200i. Este Software del ISAS® v1.1 nos proporcionó la concentración espermática.

c. Morfología y morfometría espermática:

Se evaluó en el módulo del Integrated Sperm Analysis System (ISAS® v1.1) (Proiser R+D, Paterna, Valencia - España) usando un microscopio UOP - UB200i. El módulo de morfometría del ISAS v1.1, hace un análisis automático de la morfología y morfometría espermática. Mide parámetros de la morfometría espermática como: tamaño de la cabeza (área, perímetro, anchura, longitud, porcentaje de acrosoma), forma de la cabeza (Elipticidad, Rugosidad, Regularidad y Elongación), nivel de color de la cabeza, área de la pieza intermedia, anchura de la pieza intermedia, distancia de la inserción de la pieza intermedia y ángulo de inserción de la pieza intermedia. Para la evaluación de la morfometría, se realizó la tinción con el kit de Hemacolor. Primero se realizó un frotis empleando 5 µl de muestra,

una vez seca fue teñida por la coloración del kit de Hemacolor, que consistió en realizar 5 inmersiones de la muestra en una solución de fijación (Metanol 50%), 3 inmersiones en la primera solución de tinción (Eosina) y 6 inmersiones en la segunda solución (Azur) y se dejó secar. El análisis morfométrico se visualizó en el módulo de morfología del (ISAS), con el objetivo de 100X colocando una gota de aceite de inmersión se tomaron un promedio de 200 imágenes para la determinación de morfometría. La lectura de las láminas se realizó a un aumento de 100X más aceite de inmersión. Se procedió a la captura manual de 220 espermatozoides como promedio por colecta y por animal evaluado.

d. Test de endosmosis (HOS test):

Para obtener el porcentaje de espermatozoides con endósmosis se realizó el test de endósmosis según la técnica de Giuliano *et al*., (2008). Se incubaron a, 37 ºC, 50 µl de semen en 200 µl de solución hipoosmótica de fructosa-citrato de sodio a concentraciones de (50 mOsm/l y 150 mOsm/l) durante 20 minutos. Al término de la incubación se detuvo la reacción con solución hipoosmótica formolada. Luego se evaluaron las muestras con microscopio de contraste de fase a (40X) y se contaron 200 espermatozoides por cada lámina. Para evaluar la funcionalidad de la membrana en los espermatozoides de alpaca se capturaron las imágenes con el módulo del ISAS, luego se exportaron las capturas para su posterior análisis.

e. Espermatozoides vivos:

La vitalidad espermática se determinó por coloración vital de Hancock Stain, compuesto por Eosina y Negrosina. Procedimiento general de evaluación de las muestras: se colocó una gota de 5 µl de semen en un extremo de una lámina porta objeto pre calentada a 37 °C y luego se agregó 5 µl de colorante, pasado un tiempo de 30 segundos se realizó el frotis y se secó rápidamente en la platina térmica. La muestra coloreada fue observada en el módulo de vitalidad del (ISAS), con el objetivo de 40X, donde se tomaron 25 imágenes de distintos campos de la muestra, luego se contó un mínimo de 200 espermatozoides, considerándose espermatozoides vivos aquellos donde el colorante no fue absorbido a nivel de la cabeza (no teñidas), mientras las que si la hicieron (teñidas), fueron consideradas

muertas. Se realizó el conteo de las imágenes exportadas del software vitalidad del ISAS, en una computadora independiente, para luego hallar el porcentaje de vitalidad.

f. Integridad acrosomal:

Se realizó mediante la tinción de Coomassie Blue según (Giuliano *et al*., 2012; Fumuso *et al*., 2014). Dónde: se realizaron frotis los cuales se secaron al aire. Seguidamente se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos, se lavaron con PBS y se colorearon con tinción de Coomassie Blue (0,22%) durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada y una vez secos, se contaron 200 espermatozoides. Los espermatozoides se clasificaron en dos categorías: espermatozoides con acrosoma presente (acrosoma teñido de azul) y espermatozoides con acrosoma ausente (zona acrosomal sin teñir), luego se determinó el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto.

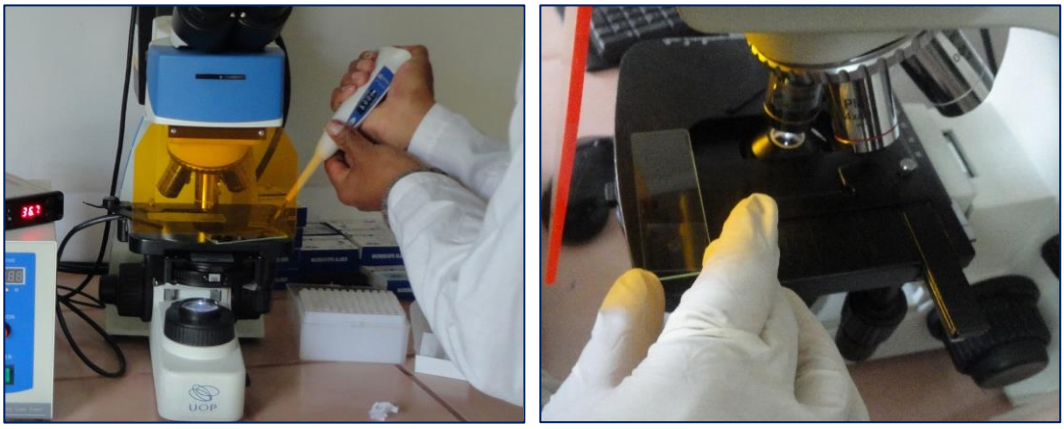


Figura: 16A.: Descarga de 5 µl de semen sobre la lámina y 16B. Correcta dispersión de los 5 µl de semen sobre la placa temperada a 37°C.

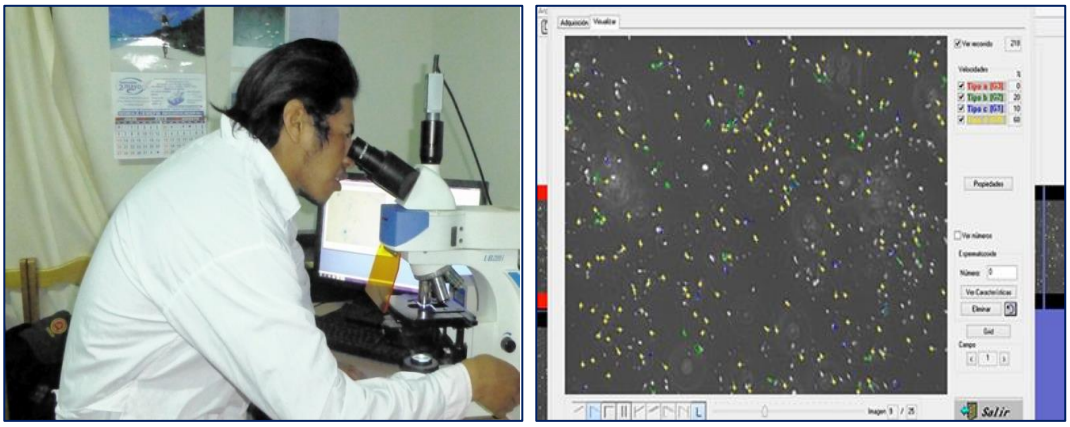


Figura: 17A. Captura de micro imágenes para la señal de video de la cámara Proiser 782C y 17B. Captura del micro video del módulo Movilidad ISAS - PROISER ® v 1.1.

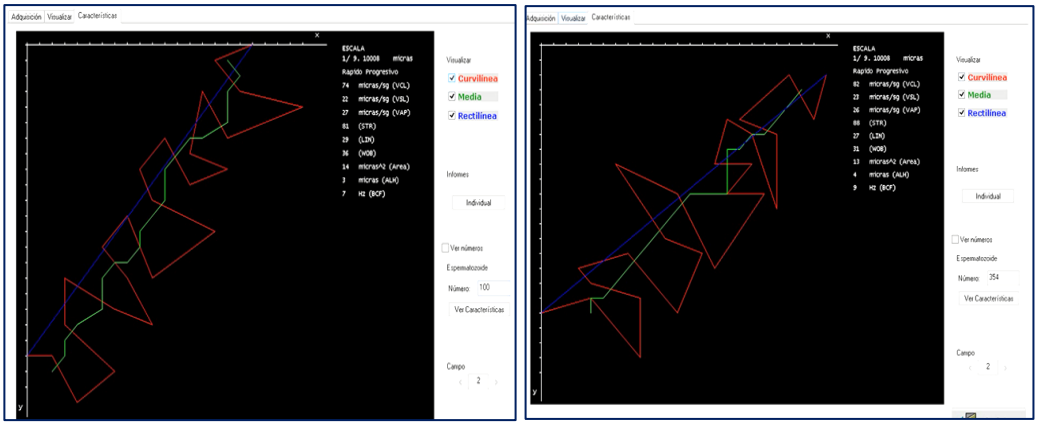


Figura: 18A y 18B. Trayectoria de los patrones de movilidad del espermatozoide detectados por el ISAS - PROISER ® v1.1.

Figura: 19A. Proceso de secado y rotulado de muestras de vitalidad y 19B. Muestras listas para su evaluación en el ISAS - PROISER ® v1.1.

Figura: 20A. Preparado del frotis en la lámina con 5 µl de semen y 20B. Proceso de secado de la tinción con el kit de Hemacolor.

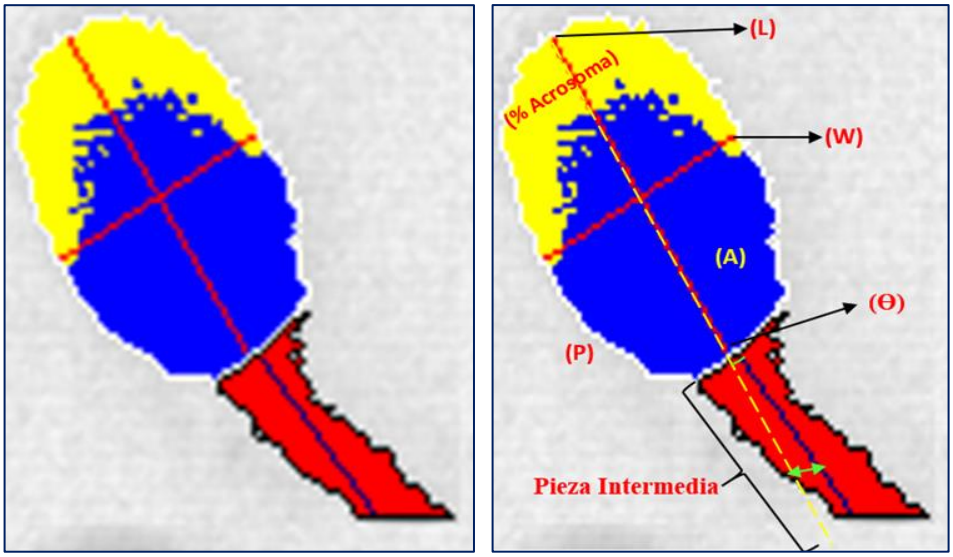


Figura: 21A. Cabeza y pieza intermedia (PI) del espermatozoide, diferenciados según color y 21B. Morfometría de la cabeza, (PI) y ángulo de inserción de la (PI).

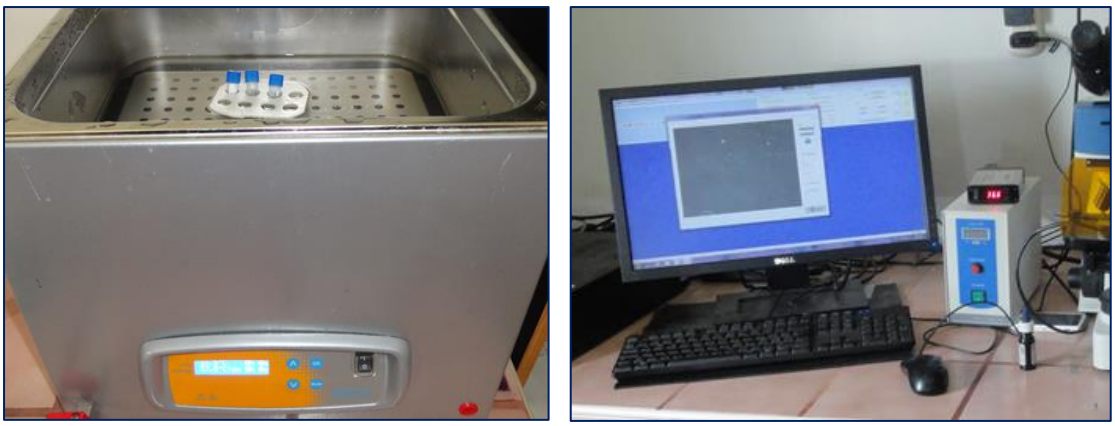


Figura: 22A. Incubación de 50 µl de semen en 200 µl de solución durante 20 minutos y 22B. Proceso de captura de imágenes para determinar la funcionalidad de la membrana espermática.

Figura: 23A. Fijación de la lámina con muestra seminal en paraformaldehído al 4% y 23B. Proceso de tinción con el Coomasie Blue G 250.

2.6. Procesamiento del semen

2.6.1. Objetivo particular 1

Para disminuir la filancia del plasma seminal, cada eyaculado se incubó durante 4 minutos a 37 °C en una solución de colagenasa al 0,1% según Giuliano *et al*., (2010) Luego de la incubación se evaluaron las características microscópicas según se describió en Materiales y Métodos.

2.6.2. Objetivo particular 2

Posteriormente a la incubación enzimática, las muestras se diluyeron 1:1 en un diluyente a base Tris; Fructosa y yema de huevo (25%). Luego se procedió a realizar la curva de enfriamiento según Ordoñez *et al*., (2012). Las muestras diluidas se colocaron en tubos falcon de 15 ml los cuales, a su vez, se colocaron en un vaso de precipitado con 150 ml de agua a 37°C, el cual se colocó en una heladera a 5 °C. De esta manera se alcanzó los 5 °C en 2 hs a una tasa de enfriamiento de 8 °C/30 minutos (0,3 °C - 0,5 °C/minuto). Una vez que las muestras estuvieron a 5 °C se les agregó el crioprotector Dimetilformamida a una concentración de 4% o de 7% para luego proceder a estabilizarlas a 5 °C durante 1 hora.

Luego de cada período de estabilización se realizó el envasado de las muestras en pajuelas de 0,25 ml. La curva de congelamiento profundo se realizó según Ordoñez *et al*., (2012). Las pajuelas se colocaron en forma horizontal en una caja de telgopol a una altura de 5,5 cm del nitrógeno líquido durante 15 minutos. Luego se transfirieron al tanque de nitrógeno líquido,

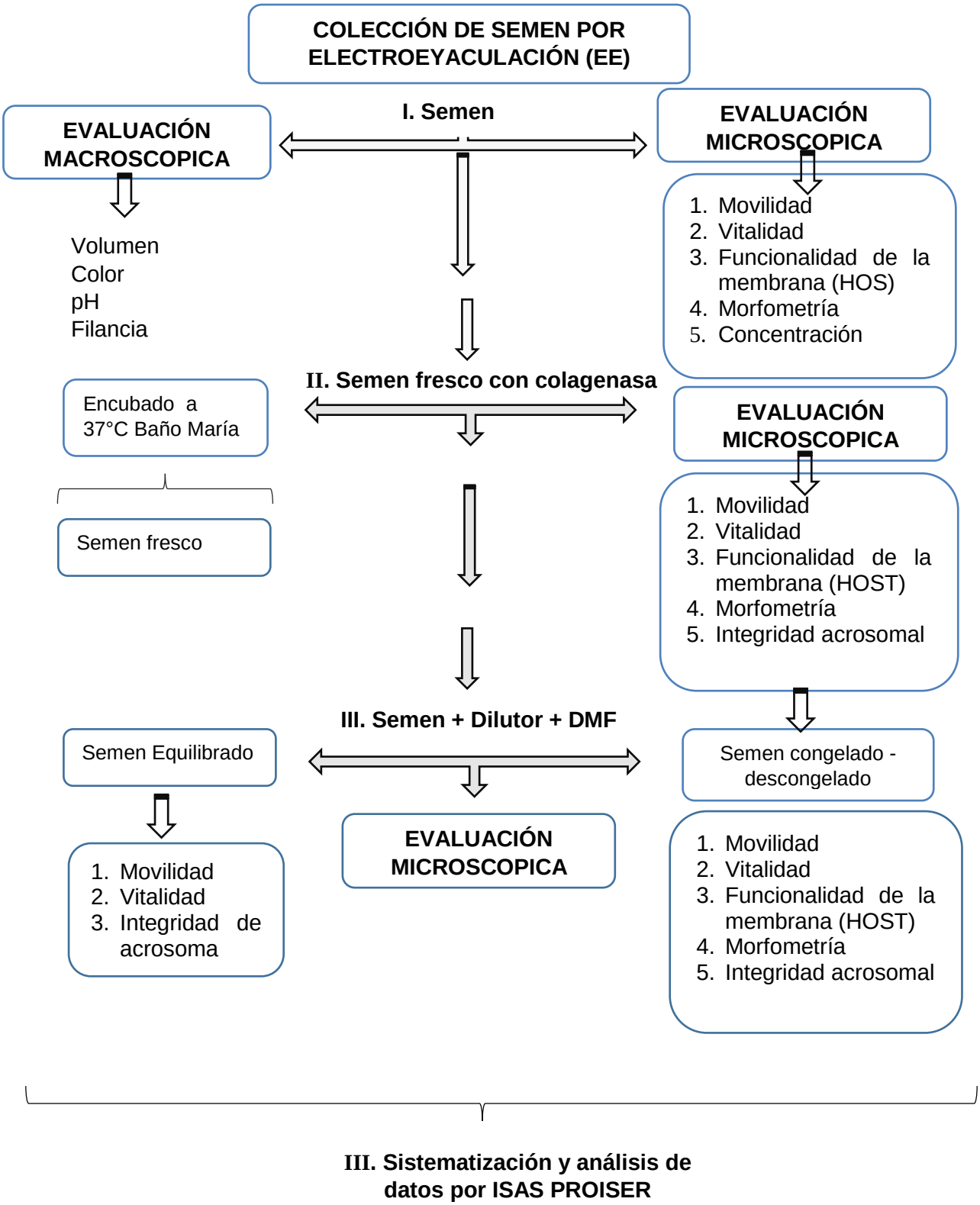
donde permanecieron a una temperatura de (-196 °C), hasta su descongelado. El descongelamiento se realizó a una temperatura de 37 °C durante 60 segundos. En todas las muestras congeladas descongeladas se realizaron las observaciones descritas. El diluyente base se preparó con 3,028 g de TRIS; 1,25 g de Fructosa; 1,7 g ácido cítrico; yema de huevo al (25%) y agua bidestilada correspondiente a 70 ml para alcanzar un volumen de 100 ml.

Figura: 24A. Proceso de descenso de la temperatura en un vaso de precipitado y 24B. Alícuota de semen para evaluar los parámetros en el periodo de equilibrio.

Figura: 25A. Periodo de estabilización de las pajuelas y 25B. Refrigeración de las pajuelas en el tanque de Nitrógeno.

Figura: 26A. Preparación de agua temperada a 37°C para descongelar las pajuelas y 26B. Proceso de descongelado durante 60 segundos.

2.6. Flujograma resumen de evaluación y procesamiento del semen



2.7. Diseño Estadístico

Todas las variables en estudio fueron sometidos a una prueba de la normalidad, para ver si los datos se ajustaban a una distribución normal para lo cual se utilizó el test de Shapiro - Wilk para datos menores a 100 y el test de Kolmogorov - Smirnov para datos mayores a 100. Se utilizó el software estadístico (Statistical Analysis System) SAS v 8.0.

Para la vitalidad e integridad de acrosoma espermático se transformaron los datos a su logaritmo natural. Los datos de la movilidad y funcionalidad de la membrana se ajustaron a una distribución normal, con las funciones trigonométricas Seno X y Ln X. Se realizó un análisis de varianza con un diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA) para las alpacas macho y el número de colecta como fuentes de variabilidad en un total de 25 eyaculados evaluados (n = 5, r = 5). La comparación de medias se realizó con la prueba de Duncan. El modelo aditivo lineal que se empleó fue el siguiente:

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

Donde: Y_{ijk} = Variable respuesta

μ = Media poblacional o constante común

T_i = Tratamientos, efecto alpaca

B_{ij} = Bloques, efecto colecta

e_{ijk} = Error experimental

Para determinar la morfometría de los espermatozoides mediante el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov, se observó que los datos de la morfometría espermática no se ajustaban a una distribución normal (excepto la elongación y área de cabeza), motivo por el cual se aplicó estadística no paramétrica determinada con la prueba de Kruskal – Wallis, el cual utiliza la tabla de distribución del Chi Cuadrado.

$$\boldsymbol{H = \frac{12}{N(N+1)} + \left(\frac{R^2{}_1}{n_1} + \frac{R^2{}_2}{n_2} + \cdots + \frac{R^2{}_k}{n_k}\right) - 3(N+1)}$$

Dónde:

H = prueba de H (Kruskal-Wallis)

N = número total de observaciones en todas las muestras combinadas

k = número de muestras

R_1 = suma de rangos de la muestra 1

n_1 = número de observación de la muestra 1

CAPITULO III

3. Resultados

Se recolectaron, evaluaron y procesaron un total de 25 eyaculados provenientes de 5 alpacas (n=5; r=5). Al realizar el análisis descriptivo de las variables macroscópicas del semen fresco se obtuvieron los siguientes resultados (media ±DE): volumen: 2,15±0,79 ml, con un rango de 1,20 ml a 4,20 ml. El color predominantemente de la muestra seminal fue de blanco claro (48% de las muestras), seguido del color blanco (32%) y en menor número se observó el color blanco opaco (20%). El pH fue (media ±DE) 7,94±0,24. La concentración de los espermatozoides presentó una media ± DE que fue de $100,24 \times 10^6 \pm 50,25 \times 10^6$.

3.1. Movilidad espermática

Los porcentajes de espermatozoides estáticos (E), móviles no progresivos (MNP) y móviles progresivos (MP) obtenidos en el semen fresco, luego de la incubación con una solución de colagenasa al 0,1% y en las muestras congeladas descongeladas, pueden observarse en la tabla 6 y en el gráfico 1.

No se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) en los porcentajes de MNP y MP, entre el semen fresco y el semen descongelado. No hubo diferencias significativas ($p>0,05$) en el porcentaje de MNP y MP entre el semen descongelado con 4% de DMF y el semen descongelado con 7% de DMF. El porcentaje de espermatozoides MNP fue significativamente mayor ($p< 0,05$) en el semen equilibrado (con 4% o 7% DMF), respecto del semen descongelado (con 4% o 7% DMF).

Tabla: 6. Porcentaje de espermatozoides por subpoblación y tipo de movilidad en muestras según etapa de análisis. Los valores son medias ± DS (n=5, r=5).

Subpoblación (%)	n	Semen fresco	Semen con Colagenasa	Equilibrado		Criopreservado*	
				DMF 4%	DMF 7%	DMF 4 %	DMF 7%
Estáticos	25	88,92±4,62^{abc}	80,83±8,33^{abc}	65,26±9,38^{bc}	61,99±11,89^{c}	89,58±2,21^{ab}	92,11±3,38^{a}
Móviles no progresivos	25	10,08±4,31^{ab}	17,92±8,00^{abc}	31,83±8,31^{b}	36,29±11,75^{c}	9,69±1,80^{a}	7,46±3,25^{a}
Móviles progresivos	25	0,98±0,82^{ab}	1,14±0,88^{ab}	2,92±2,57^{a}	1,72±1,21^{ab}	0,72±0,76^{b}	0,47±0,57^{b}

$^{a, b, c}$ letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas, *congelado-descongelado

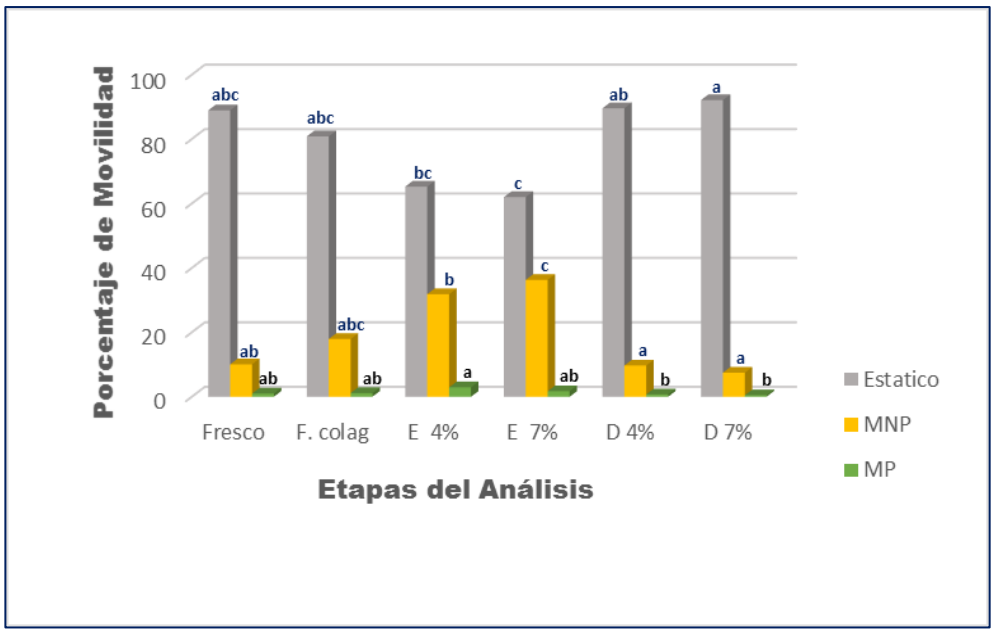


Gráfico: 1. Porcentaje de la movilidad espermática según etapas de análisis.

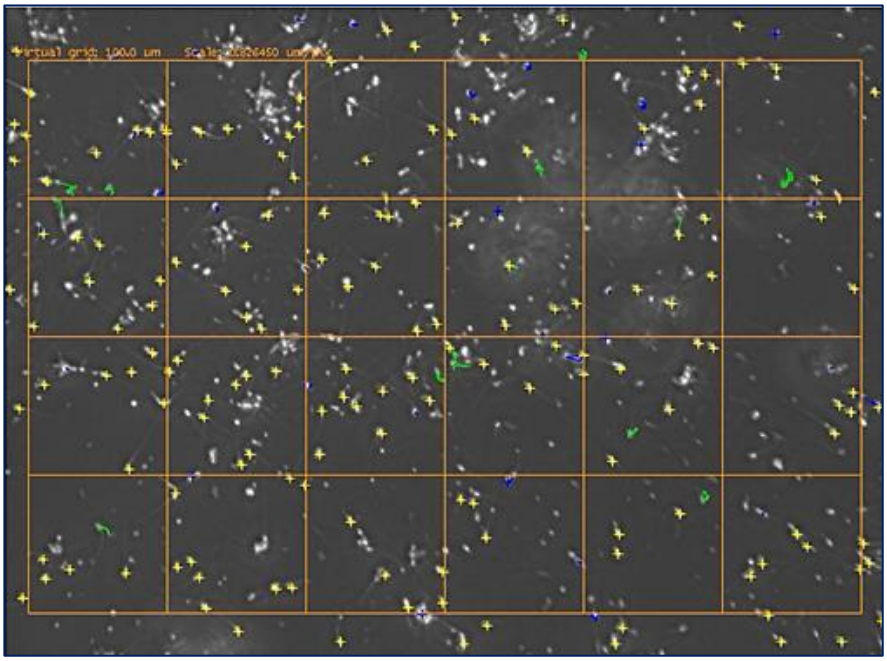


Figura: 27. Resultados del módulo Movilidad ISAS PROISER con identificación de los espermatozoides según su movilidad, color amarillo espermatozoides (E), color azul espermatozoides (MNP), color verde espermatozoides (MP) y color rojo espermatozoides con alta progresividad (MAP).

3.2. Vitalidad espermática

Los porcentajes de espermatozoides vivos obtenidos en el semen fresco, luego de la incubación con una solución de colagenasa al 0,1% y en las muestras congeladas, equilibradas y descongeladas, pueden observarse en la tabla 7 y en el gráfico 2.

Al comparar los valores obtenidos no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en los porcentajes de espermatozoides vivos entre el semen fresco, el semen incubado con colagenasa y las muestras equilibradas con DMF al 4%. Las muestras congeladas tanto con DMF al 4% como al 7% presentaron porcentajes de espermatozoides vivos significativamente menores ($p\leq0,05$) al del semen fresco. No hubo diferencias significativas ($P>0,05$) en los porcentajes obtenidos luego congelar con DMF al 4% o al 7%.

Tabla 7. Porcentaje de vitalidad espermática según etapa de análisis. Los valores son medias ± DS (n=5, r=5).

Alpaca	n	Semen fresco	Semen con Colagenasa	Equilibrado		Criopreservado*	
				DMF 4%	DMF 7%	DMF 4 %	DMF 7%
1	5	92,21±4,53	95,11±2,21	87,65±0,78	76,68±0,86	51,54±2,03	55,28±0,59
2	5	96,14±0,79	97,00±0,46	87,00 ±0,96	79,37±0,68	54,70±2,01	54,23±0,95
3	5	96,14±1,87	96,31±1,52	85,77±2,19	76,95±2,50	51,50±3,14	52,35±1,81
4	5	94,03±2,37	95,53±2,60	86,66±1,89	74,86±3,89	55,04±2,74	54,95±1,13
5	5	94,40±4,32	96,57±0,63	88,10 ±0,66	77,41±0,76	53,33±3,02	53,67±0,87
Total	25	94,58±3,23[a]	96,10±1,72[a]	87,04±1,55[a]	77,05±2,15[b]	53,22±2,70[c]	54,10±1,47[c]

[a, b, c] letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas, [*]congelado-descongelado

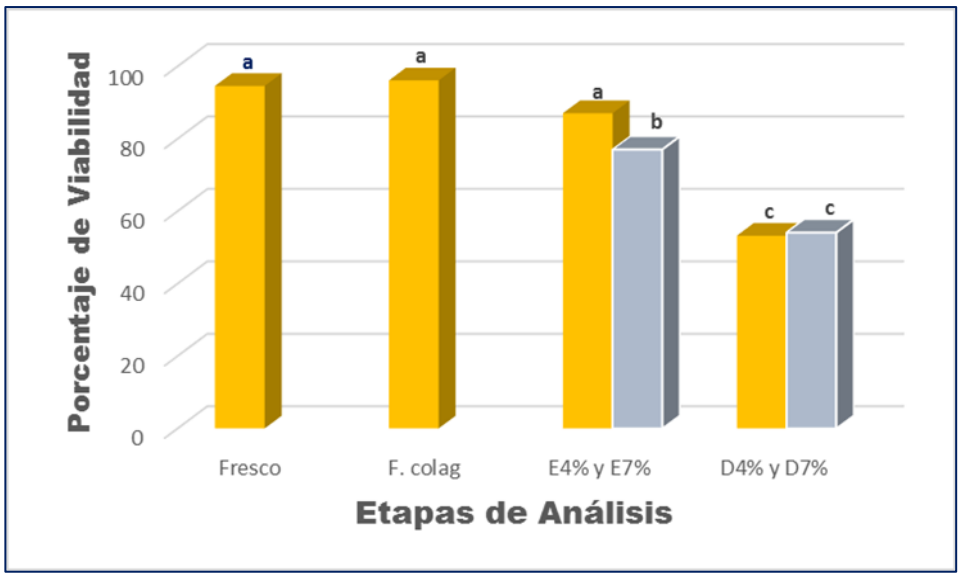


Gráfico: 2. Porcentaje de espermatozoides vivos según etapas de análisis.

Figura: 28. A: Espermatozoide vivo, B: Espermatozoide muerto; C: Espermatozoides vivos en semen fresco, D: Espermatozoides en fase de equilibrio; E: Espermatozoides congelados/descongelados.

3.3. Parámetros morfométricos

Los valores de los parámetros morfométricos, obtenidos mediante el sistema ISAS - PROISER® v 1.1, y determinados en el semen fresco, luego de la incubación con una solución de colagenasa al 0,1% en las muestras congeladas descongeladas, pueden observarse en la tabla 8 y en el gráfico 3.

Al comparar las medias de todos los parámetros de las cabezas de los espermatozoides en semen fresco y luego de cada tratamiento se observó lo siguiente: la longitud de la cabeza del espermatozoide mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) luego de pos congelado – descongelado con DMF al 4%, respecto de la longitud evaluada en espermatozoides de semen fresco y en las muestras de semen tratadas con colagenasa. Tanto el ancho como el perímetro de la cabeza del espermatozoide no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ninguna de las muestras. Con respecto al área de la cabeza espermática se encontró diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre las muestras tratadas con colagenasa y el congelado-descongelado con DMF 4%.

Se determinaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) al comparar el porcentaje de acrosoma de la cabeza espermática en muestras de semen fresco, con las muestras congelado-descongeladas tanto con DMF al 4% como al 7%.

Tabla: 08. Morfometria de espermatozoides en semen fresco, semen tratado con colagenasa, y semen descongelado con 4% y 7% de dimetilformamida. Los valores son medias ± DS (n=5, r=5).

Variable	**Fresco**	**Fresco con colagenasa**	**Criopreservado**	
			DMF 4%	**DMF 7%**
Tamaño de la cabeza				
Longitud (µm)	5,88±0,53[a]	5,85±0,51[a]	5,65±0,60[b]	5,72±0,61[ab]
Ancho (µm)	3,19±0,31[a]	3,22±0,32[a]	3,05±0,32[a]	3,13±0,33[a]
Área (μm^2)	15,07±1,92[ab]	15,20±1,98[a]	14,12±1,92[b]	14,45±1,95[ab]
Perímetro (µm)	16,72±2,17[a]	16,93±1,90[a]	16,53±3,02[a]	16,89±3,02[a]

Forma de la cabeza				
Elipticidad*	1,86±0,23[a]	1,81±0,22[a]	1,80±0,26[a]	1,86±0,27[a]
Rugosidad*	0,67±0,08[a]	0,68±0,08[a]	0,63±0,10[b]	0,64±0,61[b]
Elongación*	0,29±0,18[a]	0,29±0,05[a]	0,29±0,06[a]	0,29±0,06[a]
Regularidad*	0,98±0,06[a]	0,98±0,05[a]	0,96±0,24[b]	0,97±0,08[b]
Acrosoma del espermatozoide				
% de acrosoma	48,27±8,85[b]	46,65±8,74[b]	54,38±6,60[a]	54,68±6,37[a]
Tamaño pieza intermedia				
Ancho de PI (µm)	1,48±0,50[a]	1,46±0,52[a]	1,49±0,60[a]	1,52±0,60[a]
Área de PI (µm^2)	3,90±1,02[a]	3,89±0,95[a]	3,31±0,85[b]	3,40±0,85[b]
Inserción pieza intermedia				
Distancia de Inserción (µm)	0,25±0,19[ab]	0,24±0,19[b]	0,27±0,25[ab]	0,29±0,27[a]
Angulo de Inserción (grados)	14,03±15,54[a]	11,15±11,67[ab]	9,03±10,37[b]	11,53±16,87[ab]

[a, b, c] letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas, *No dimensionales.

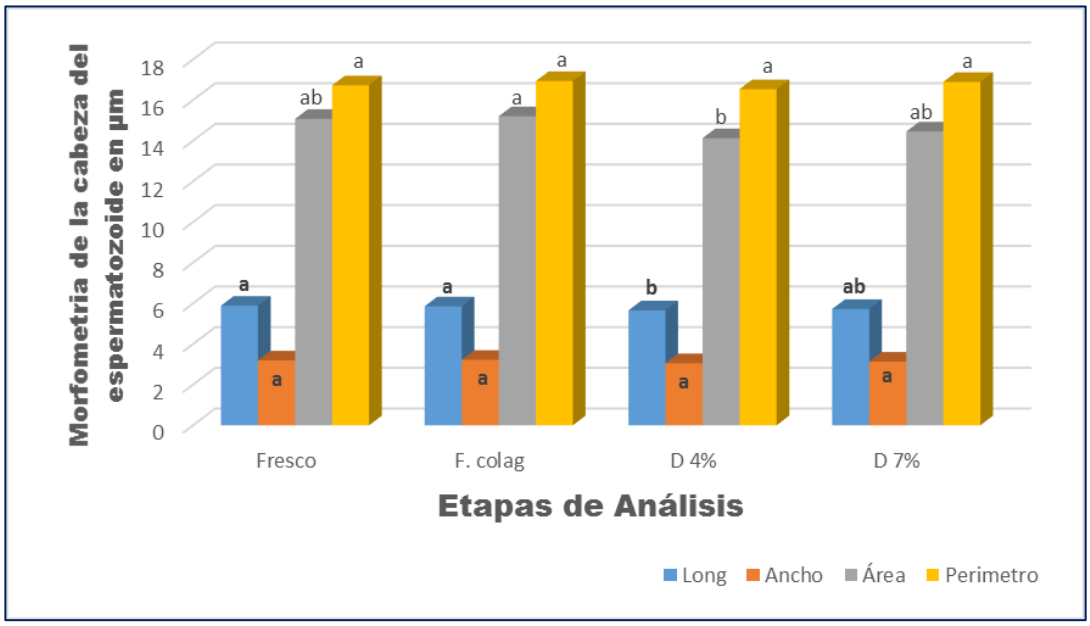


Gráfico: 3. Variación morfometría de la cabeza de espermatozoides según etapas de análisis.

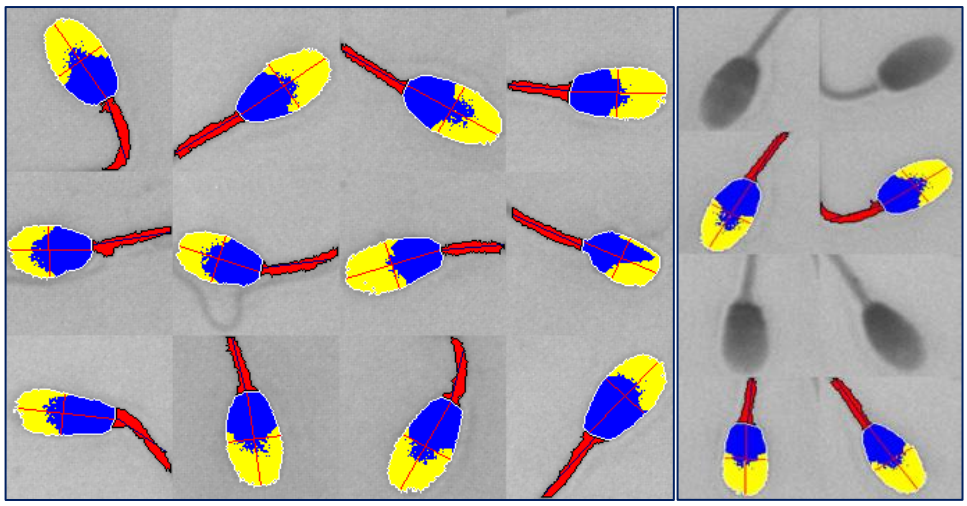


Figura: 29A. Espermatozoides de alpaca. 29B. Identificación en gris de la captura manual del espermatozoide y en color procesado por el software del ISAS - PROISER.

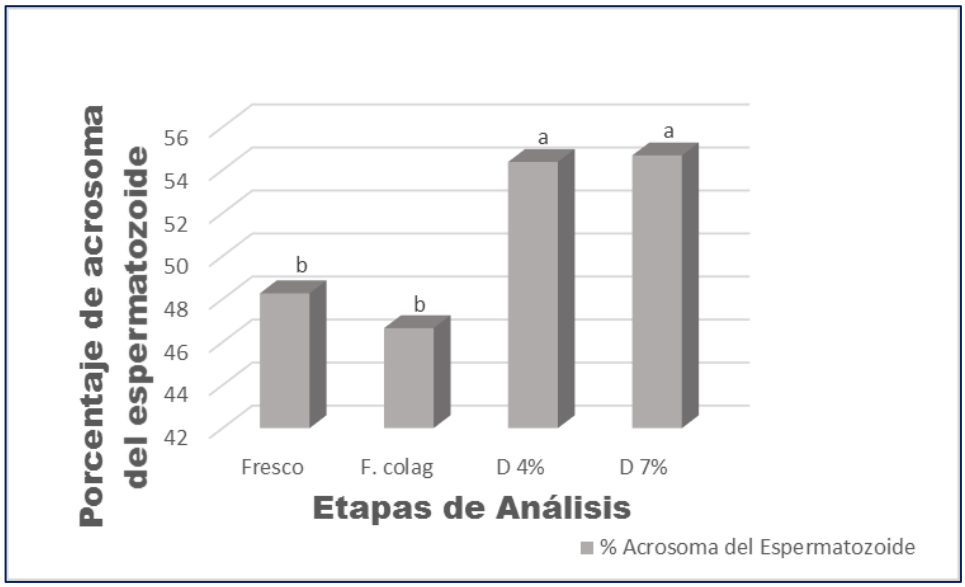


Gráfico: 4. Porcentaje de la proporción acrosoma/cabeza del espermatozoide durante un proceso de criopreservación.

3.4. Funcionalidad de la membrana espermática

Los porcentajes de espermatozoides con endósmosis obtenidos en el semen fresco, luego de la incubación con una solución de colagenasa al 0,1% y en las muestra congeladas descongeladas, pueden observarse en la tabla 9 y en el gráfico 5.

No se observó interacción entre el tratamiento del semen fresco y el tratado con colagenasa en las osmolaridades de (50 y 125 mOsmol/l) a una ($p>0,05$). No hubo diferencias significativas a la ($p\leq0,05$) en el porcentaje de espermatozoides con endósmosis entre el semen fresco y el tratado con colagenasa. El porcentaje de espermatozoides con endósmosis en todas las muestras de semen fresco o tratado con colagenasa e incubadas con 50 mOsm/l fueron significativamente mayores al obtenido con 125 mOsm/l a ($p>0,05$). No se observó interacción entre el semen descongelado con 4% o 7% de DMF a sus respectivas osmolaridades de 50 y 125 mOsmol/l a ($p>0,05$). No hubo diferencias significativas, luego de ser sometidas al equilibramiento y evaluadas después del congelado-descongelado tanto para las concentraciones de 4% y 7% de la DMF y su concentración en la incubación de osmolaridades de 50 mOsm/l y 125 mOsm/l a ($p\leq0,05$). El porcentaje de endósmosis del semen fresco fue significativamente superior al porcentaje obtenido en las muestras congeladas-descongeladas a ($p\leq0,05$).

Tabla: 09. Porcentaje de la funcionalidad de la membrana espermática de 50 y 125 mOsmo/l en semen fresco, semen tratado con colagenasa, y semen descongelado con 4% y 7% de (DMF). Los valores son medias ± DS (n=5, r=5).

Alpaca	n	Fresco		Fresco con colagenasa		Criopreservado			
						DMF 4%		DMF 7%	
		mOsm/l 50	mOsm/l 125	mOsm/l 50	mOsm/l 125	mOsm/l 50	mOsm/l 125	mOsm/l 50	mOsm/l 125
1	5	28,66±3,38	25,10±7,28	41,11±10,79	30,03±6,42	17,12±5,30	14,02±5,02	21,08±6,10	16,39±4,67
2	5	50,11±4,55	43,26±14,25	51,81±5,10	41,48±11,50	16,95±2,71	17,17±3,00	17,86±1,06	14,69±3,07
3	5	42,99±9,37	36,74±8,92	37,68±9,50	31,08±9,85	20,21±4,09	22,21±10,74	23,13±6,68	23,68±6,24
4	5	30,06±3,80	25,33±6,05	41,84±14,19	31,28±14,05	21,23±5,15	17,07±4,11	20,11±4,54	18,49±6,33
5	5	48,50±15,52	39,40±17,02	43,23±12,42	37,85±13,04	23,22±4,50	23,44±8,11	19,63±2,08	22,39±4,87
Total	25	40,06±12,17^{ab}	33,96±12,96^{b}	43,13±11,01^{a}	34,34±11,29^{b}	19,75 ±4,78^{c}	18,78 ±7,16^{c}	20,36±4,51^{c}	19,13±.5,78^{c}

$^{a, b, c}$ letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas.

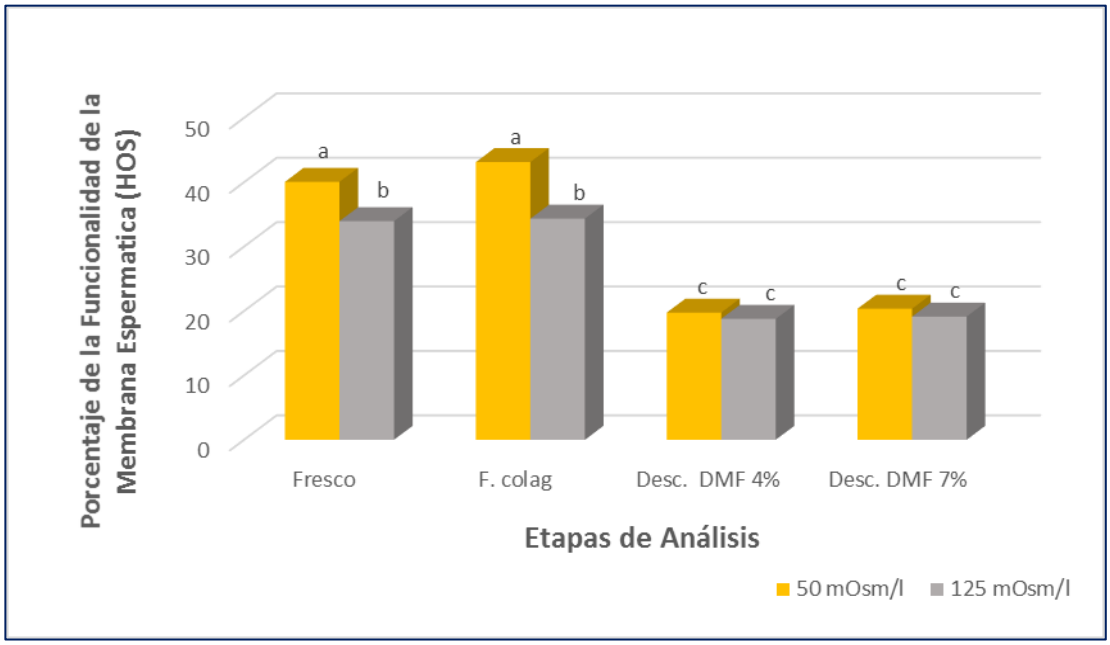


Gráfico: 5. Porcentaje de espermatozoides con endósmosis según las etapas de análisis y osmolaridad de la solución hipoosmótica.

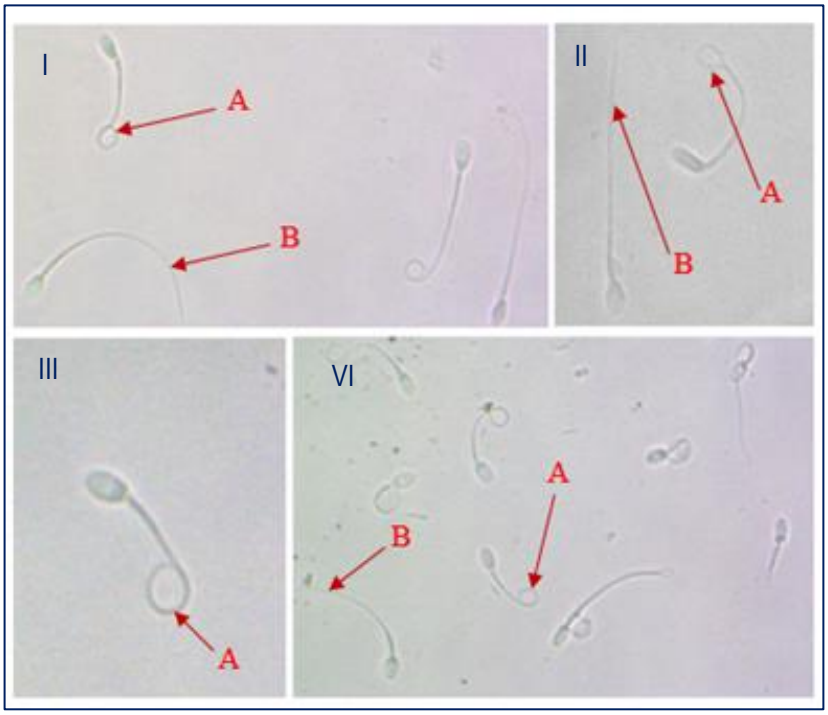


Figura: 30. Espermatozoides de alpaca incubados con solución hipoosmótica 50 (I, III) y 125 (II, VI) mOsm/l. A: Espermatozoide con endósmosis, B: Espermatozoides sin endósmosis.

3.6. Integridad del acrosoma

Los porcentajes de espermatozoides con acrosoma intacto obtenidos en el semen fresco, luego de la incubación con una solución de colagenasa al 0,1% y en las muestras congeladas descongeladas, pueden observarse en la tabla 10 y en el gráfico 6.

El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto de las muestras tratadas con colagenasa fue significativamente superior ($p \leq 0,05$) a los porcentajes obtenidos luego del período de equilibramiento y luego del proceso de congelado descongelado tanto con DMF al 4% como con DMF al 7%.

Tabla: 10. Porcentaje de espermatozoides con integridad de acrosoma en semen tratado con colagenasa, y semen descongelado con 4% y 7% de DMF. Los valores son medias ± DS (n=5, r=5).

Alpaca	n	Semen con Colagenasa	Equilibrado		Criopreservado	
			DMF 4%	DMF 7%	DMF 4 %	DMF 7%
1	5	96,32±1,91	69,83±0,48	70,81±2,34	70,03±2,63	66,25±3,38
2	5	95,80±1,63	69,81±2,38	71,02±0,95	73,70± 0,29	70,80±3,09
3	5	84,34±10,92	59,73±4,43	63,00±6,30	54,77±11,32	53,62±17,04
4	5	91,09±9,41	69,34±2,13	65,06±3,40	66,49±4,70	65,55±3,53
5	5	90,65±6,76	68,36±1,81	70,69±2,17	66,81± 4,85	66,23±2,28
Total	25	91,28±8,16[a]	67,13±4,78[bc]	68,21±4,59[b]	65,69±8,71[bc]	64,57±9,10[c]

[a, b, c] letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas.

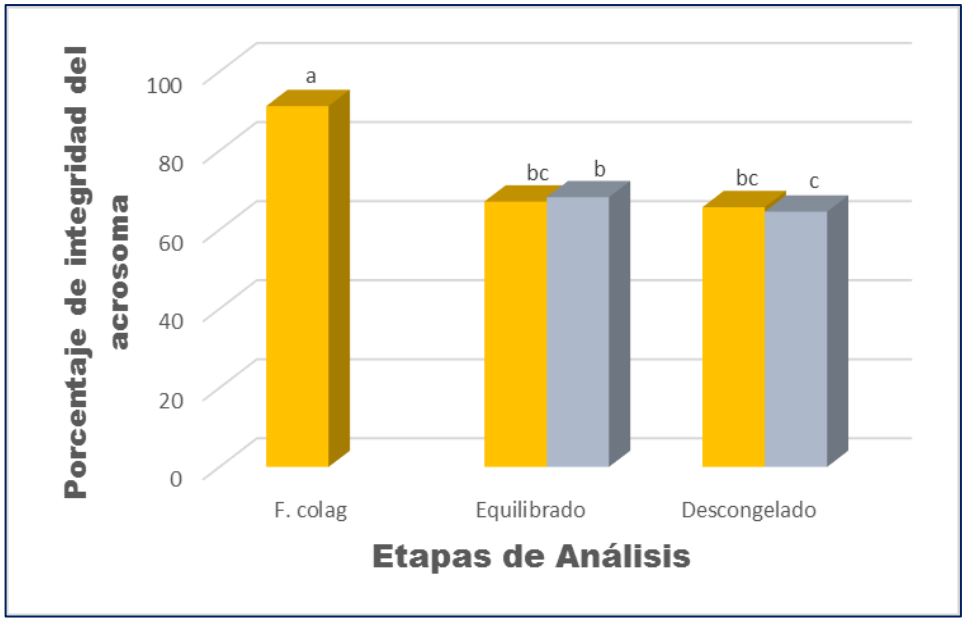


Gráfico: 6. Porcentaje de espermatozoides con integridad del acrosoma según etapas de análisis.

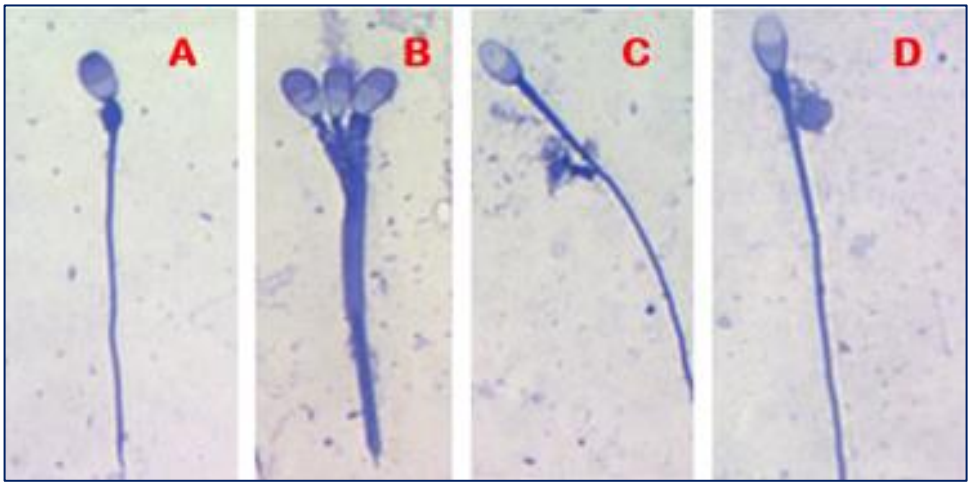


Figura: 31. Figuras A y B: Espermatozoides de alpaca con acrosoma intacto, figuras; C y D: Espermatozoides sin acrosoma.

CAPÍTULO IV

4. Discusión

Las características de la monta y del semen de los camélidos sudamericanos han condicionado la implementación de biotecnologías reproductivas en estas especies. Como es de conocimiento, los resultados obtenidos hasta el momento, luego de criopreservar semen de alpaca, no han sido alentadores. Con el objetivo de implementar un protocolo de criopreservación que permita obtener espermatozoides con integridad y funcionalidad de membrana plasmática, acrosomal y morfométrica, es que en esta Tesis de Maestría se determinó por primera vez.

1. El efecto de criopreservar semen de alpaca con el crioprotector penetrante N, N Dimetilformamida en dos concentraciones: 4% y 7% sobre las variables movilidad, vitalidad, morfometría, funcionalidad e integridad de membrana plasmática e integridad del acrosoma medidas mediante el sistema ISAS-PROISER® v 1.1.
2. El efecto de incubar semen de alpaca con colagenasa en solución al 0,1% en medio TALP sobre las variables espermáticas de la especie.
3. El efecto de incubar, espermatozoides provenientes de eyaculado de alpaca, utilizando dos osmolaridades (50 y 125 mOsm/l) (HOST test).

En este estudio, para poder contar con muestras de semen de calidad y en forma repetitiva, se utilizó el método de extracción de semen con electroeyaculación. Mediante esta metodología, de 5 alpacas, se recolectaron 25 eyaculados con parámetros seminales cuyos valores de sus medias y rangos corresponden a los obtenidos por otros autores, que utilizaron el método de vagina artificial como el de (Giuliano *et al*., 2009; Huanca *et al*., 2012a; Ordoñez *et al*., 2012). Con respecto a los valores obtenidos de vitalidad espermática en el semen fresco se observó un alto porcentaje de espermatozoides vivos (95%) y un bajo porcentaje de espermatozoides con movilidad total (11%). Estos resultados son similares a los observados en semen de llama por Giuliano *et al*., (2005) y (2010) y Carretero *et al*., (2014).

Es interesante resaltar que estos valores confirmarían que los espermatozoides de camélidos sudamericanos pueden estar vivos aunque no se muevan y que la movilidad espermática no siempre es un indicador de la calidad de los eyaculados de estas especies.

Respecto del estudio de los parámetros morfométricos espermáticos, se determinó la existencia de gran variabilidad morfométrica intra e inter alpaca. Estos resultados coinciden con los reportes de Buendía *et al*., (2002); Casaretto *et al*., (2011b); Ordoñez *et al*., (2012); Soler *et al*., (2013) y Evangelista *et al*., (2015).

Debido a las características reológicas (filancia y elevada viscosidad estructural) del plasma seminal de la alpaca se hizo necesario implementar metodologías que permitiesen manejar el semen, homogenizar la muestra y disminuir la formación de hilo, para de esta manera poder envasar en tiempo y forma las muestras diluidas en las pajuelas.

Giuliano *et al*. (2010) observaron que la incubación del semen con una solución de colagenasa en Hepes-TALP, evita la formación de hilo, pudiendo separar los espermatozoides del plasma seminal e induciendo movilidad espermática progresiva manteniendo la viabilidad. Consecuentemente se analizó el efecto de incubar semen de alpaca con colagenasa al 0,1%, y se observó que, en todas las muestras, disminuyó la filancia del plasma seminal preservando la movilidad, vitalidad, funcionalidad de membrana espermática e integridad del acrosoma de los espermatozoides de alpaca.

En esta Tesis, al incubar el semen con una solución de 0,1% de colagenasa en medio Hepes-TALP, se eliminó la formación de hilo en todas las muestras estudiadas sin afectar la movilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de espermatozoides con funcionabilidad de membrana ni del porcentaje de integridad acrosomal. Los valores obtenidos de las distintas variables espermáticas pueden observarse en las tablas: 06; 07; 09 y 10 y en los gráficos 01; 02; 03; 04; 05 y 06. Estos resultados coinciden con los observados en semen de llama por Giuliano *et al*., (2010) y Carretero *et al*., (2012) en muestras de semen incubados también con 0,1% de colagenasa en medio Hepes-TALP.

Sin embargo, resultados obtenidos en esta Tesis, difieren con los obtenidos en semen de alpaca por otros autores (Bravo *et al*., 1999 y 2000; Poblete *et al*., 2003, Maxwell *et al*., 2008) quienes al realizar tratamientos enzimáticos disminuyeron la viscosidad de los eyaculados, pero obtuvieron un efecto nocivo sobre los espermatozoides al utilizar soluciones hipoosmóticas de colagenasa o tripsina (≤ a 1 mOsmolar) las cuales producirían ruptura de

la membrana plasmática por aumento excesivo del volumen celular, debido a la ósmosis hacia el interior de los espermatozoides.

En este estudio, los espermatozoides tratados con la enzima colagenasa, no mostraron diferencias significativas en la morfometría de la cabeza del espermatozoide respecto a las muestras frescas.

Es interesante destacar que en esta tesis, se determinó por primera vez en forma objetiva mediante el software ISAS-PROISER (2010) que la incubación con 0,1% con colagenasa en medio TALP no modifica ninguno de los valores de los parámetros morfométricos de cabeza y pieza intermedia. Es de destacar también que tampoco modificó la proporción de acrosomas intactos/cabeza espermática. Estos resultados confirmarían lo reportado por Giuliano *et al*., (2010), Carretero *et al*., (2012) y Trasorras *et al*., (2014) quienes sugirieron que la incubación con colagenasa al 0,1% en medio TALP no afectaría las características espermáticas de llama ya que obtuvieron embriones mediante la técnica de fertilización in vitro y estudiaron distintos inductores de la reacción acrosomal en espermatozoides de llama a partir de espermatozoides tratados con colagenasa al 0,1% en medio Hepes-TALP. Además estos resultados indicarían que no habría un influjo o eflujo neto de agua entre los espermatozoides y el medio que lo rodea ya que no hay un aumento del área o modificaciones en la forma del espermatozoide.

Los protocolos de criopreservación de semen en CSA, en general, fueron adaptaciones de los utilizados en bovinos y principalmente en ovinos. Debido a esto, es que en la mayoría de los reportes se observa al glicerol en una concentración del 7% como el crioprotector de elección. Sin embargo, congelando semen de alpaca o de llama utilizando este crioprotector no se obtuvieron porcentajes de preñez que justifiquen su uso en forma masiva. A su vez, en muestras criopreservadas con glicerol en semen de llama, Carretero *et al*., (2014) determinaron que el 99% de los espermatozoides presentaban ruptura del ADN, mientras que las muestras criopreservadas con N N-Dimetilformamida no presentaron diferencias significativas con respecto al semen fresco.

La N N-Dimetilformamida perteneciente al grupo de las amidas, es un crioprotector penetrantes de bajo peso molecular (73), comparado con el glicerol (92). Esta característica, le permitiría a la N N-Dimetilformamida entrar a la célula en forma más rápida que el glicerol

(Squires *et al*., 2004). Cuanto más permeable es el crioprotector es menor la posibilidad de que se produzca el estrés osmótico debido a que éste tiende a producirse, si la permeabilidad del crioprotector es menor a la del agua. Otra característica a tener en cuenta de las amidas es que son solubles al agua y presentan baja viscosidad (Alvarenga *et al*., 2005). Siendo el plasma seminal de los CSA muy viscoso es de esperar que las amidas puedan homogeneizarse adecuadamente con el diluyente base, no así el glicerol, el cual es impermeable al agua y viscoso.

Teniendo en cuenta estas observaciones es que se plantea en esta Tesis la necesidad de estudiar el efecto de criopreservar semen de alpaca con un crioprotector alternativo al glicerol. Teniendo en cuenta, los reportes previos que indican que con el glicerol no se obtienen porcentajes altos de preñez, su toxicidad para el ADN espermático de llama es que se decide estudiar el efecto del crioprotector N N-Dimetilformamida al 4% y 7% sin estudiar a su vez el efecto del glicerol por considerar que hay suficiente información negativa sobre este último crioprotector. A su vez el bajo número de espermatozoides por eyaculado de alpaca, no permite realizar muchas alícuotas de la muestra.

Al analizar los resultados obtenidos al criopreservar semen de alpaca con dos concentraciones diferentes (4% y 7%) de N N-Dimetilformamida se observó que no hubo diferencias significativas entre la movilidad espermática del semen fresco y la de las muestras de semen congeladas descongeladas. Es de resaltar que se comenzó con una sub población de espermatozoides estáticos en semen fresco de un 88,92% y de móviles progresivos y no progresivos del 11% por lo tanto el bajo porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos y de móviles progresivos obtenidos al descongelar las muestras no estarían indicando que el protocolo realizado haya tenido un efecto negativo sobre la movilidad espermática progresiva. Es de resaltar que es inherente a los camélidos sudamericanos tener muy bajos porcentajes de movilidad progresiva o de movilidad total en el semen fresco (Tibary y Vaughan, 2006; Giuliano *et al*., 2008; 2010; Carretero *et al*., 2014).

Al comparar los resultados obtenidos en esta Tesis con los obtenidos por Carretero *et al*., (2014), quienes utilizaron para congelar semen de llama, N N-Dimetilformamida al 7%, se puede observar que en ese estudio sí obtuvieron un aumento de la movilidad progresiva espermática. Las diferencias observadas entre esta Tesis y el estudio realizado por Carretero *et al*., (2014), pueden deberse a que se utilizaron diluyentes diferentes. Carretero *et al*. (2014)

utilizaron un diluyente a base lactosa glucosa EDTA y yema de huevo (25%) y una curva de congelamiento rápida.

Al comparar los resultados obtenidos en este estudio con los obtenidos por otros autores con el crioprotector glicerol en un concentración al 7% (llama: von Baer & Helleman, 1999; Aller *et al*., 2003; alpaca: Vaughan *et al*., 2003; Santiani *et al*., 2005; Santiani *et al*., 2013), se observa que en dichos estudios obtuvieron una disminución significativa de la movilidad espermática. Dicha disminución puede deberse a la toxicidad intracelular del glicerol.

Entre el semen fresco y las muestras congeladas y descongeladas se observa que hay una disminución significativa de la vitalidad espermática y que no hay diferencias significativas entre las muestras congeladas y descongeladas con ambas concentraciones. El porcentaje de vitalidad obtenido en las muestras congeladas y descongelado fue aproximadamente del 54%. Esta disminución en el porcentaje de espermatozoides vivos ha sido observado en otros reportes de CSA (Aller *et al*., 2003; Santiani *et al*., 2005; 2013). Es de conocimiento que la criopreservación produce en las distintas especies una disminución importante del porcentaje de espermatozoides vivos llegando a ser inclusive del 50% (Watson, 2000; Neild *et al*., 2003). El estudio de la vitalidad de este estudio fue superior a los resultados reportados por (Choez *et al*., 2014; Zirena *et al*., 2015), esta diferencia puede ser atribuida a las diferentes concentraciones utilizadas, con los siguientes tratamientos de Glicerol, Etilenglicol y DMSO, que utilizó y que además obtuvo sus muestras espermáticas de la recuperación epididimaria del testículo de alpaca. Estudios recientes en criopreservación de semen de alpaca criopreservados con (Andromed-Triladyl), reportan mejores porcentajes de espermatozoides vivos luego de su congelado-descongelado según Naveros M. y Contreras M. (2015).

Cuando comparamos los resultados luego de la criopreservación con N N-dimetilformamida (4% y 7%), con la morfometría de la cabeza de muestras frescas se encontró diferencias estadísticas en la longitud y área de los espermatozoides criopreservados con N N-dimetilformamida al 4%. El estudio de la forma en la cabeza del espermatozoide también mostró variabilidad, coincidiendo con los resultados reportados por (Buendía *et al*., 2002; Ordoñez *et al*., 2012; Soler *et al*., 2013; Evangelista *et al*., 2015), al comparar con los espermatozoides sometidos a criopreservación se encontró variaciones en la Rugosidad y Regularidad para ambas concentraciones de N N-dimetilformamida.

Es interesante resaltar la variación del porcentaje de acrosoma/área cabeza luego del proceso de criopreservación, esto demuestra que el proceso de congelado-descongelado de espermatozoides y el uso de crioprotectores provocan la expansión del acrosoma dentro de la cabeza espermática. En el estudio de tamaño de la pieza intermedia se evidenció la alteración en su área, para ambas concentraciones del crioprotector. Para el ángulo de inserción de la pieza intermedia se observó una variación luego de congelar-descongelar al 4% con N, N-Dimetilformamida.

En relación al estudio del acrosoma de alpaca, es de destacar que el mismo no se puede observar con microscopia óptica de contraste de fase. Diversas técnicas se han estudiado en esta especie y en la llama. Fumuso *et al*., (2014) pusieron a punto la técnica de Coomassie Blue. Esta técnica es económica y sencilla y se puede utilizar con una microscopia de campo claro. Es interesante resaltar que Carretero *et al*., (2015) observaron una correlación positiva entre el patrón acrosoma intacto (espermatozoide vivo + muerto, técnica FITC-PNA / PI) y el patrón de CB presente en el acrosoma.

Respecto de la presencia o ausencia del acrosoma en el espermatozoide, este estudio es el primero en implementar la técnica de Coomassie Blue, para evaluar muestras seminales en alpacas tratadas con colagenasa y luego del proceso de criopreservación.

Los resultados obtenidos con respecto al porcentaje de presencia de acrosoma en espermatozoides tratados con colagenasa fueron similares a los resultados obtenidos en llama por Fumuso *et al*., (2014). Considerando las etapas de equilibramiento y de criopreservación, se puede observar en la Tabla 10 el efecto de la etapa de equilibrado a 5 °C sobre los porcentajes de integridad acrosomal. Los cuales, en ambas concentraciones del crioprotector, disminuyen en forma significativa (26%), no así entre esta etapa y la etapa de congelamiento profundo el cual los porcentajes de integridad acrosomal disminuyen un 6%. Es de interés resaltar que Santiani *et al*., (2013) criopreservaron semen de alpaca utilizando 5 °C como temperatura de equilibramiento obtuvieron un 40 % menos de acrosomas intactos al congelado/descongelado. Estos resultados indicarían que las etapas de equilibramiento 5 °C y posterior congelamiento podrían ser críticas para la integridad acrosomal en esta especie.

Con respecto al test de endósmosis, Vásquez *et al*., (2012) determinaron que 150 mOsmoles/litro era la mejor osmolaridad de una solución de citrato-fructosa para realizar el test de endósmosis en espermatozoides provenientes de epidídimos de alpaca. A su vez Giuliano *et al*., (2005, 2008) determinaron que las mejores osmolaridades eran 50 o 100 mOsmoles/litro para determinar el porcentaje de endósmosis en semen de llama.

Debido a esta controversia es que en esta Tesis se determinó cual sería la mejor osmolaridad para realizar el test de endósmosis en semen de alpaca. Se tomó como criterio de elección para decidir cuál era la mejor osmolaridad, a aquella osmolaridad que permitiese obtener mayor porcentaje de espermatozoides con endósmosis. Con tal objetivo se incubaron muestras de semen fresco en diferentes soluciones hipoosmóticas y se demostró que las soluciones de menor osmolaridad producían mayor endósmosis coincidiendo con lo observado por Giuliano *et al.,* (2005). Es de resaltar entonces que en este estudio se demostró que incubar a una solución de 50 mOsm/l produjo una mayor cantidad de espermatozoides con endosmosis para las muestras evaluadas en fresco y tratadas con colagenasa. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en la llama (Giuliano *et al*., 2005), por lo tanto se demostraría que al incubar con soluciones con osmolaridad más alejadas de la osmolaridad del plasma seminal se obtendrían mayores porcentajes de espermatozoides con endosmosis. Se destaca que procesar espermatozoides sin plasma seminal para una solución de 125 mOsm/l pueda ser utilizada, sin embargo no tendría el mismo resultado al utilizar el eyaculado completo, donde se requieran una solución de 50 mOsm/l según lo reportado por Flores *et al*., (2014). Los resultados de este estudio luego del proceso de criopreservación respecto a las pruebas de endósmosis son coincidentes a los reportados por Zirena *et al*., (2015), donde indica que solo el 22% de los espermatozoides presentaron patrones de endósmosis que, al ser comparado con nuestro estudio, nuevamente las soluciones de 50 mOsm/l tanto para (DMF 4% y 7%) mostraron mayor proximidad a los datos de Zirena *et al*., (2015).

CAPÍTULO V

5. 1. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en esta Tesis se pueden realizar las siguientes conclusiones:

1. La incubación del semen de alpaca con colagenasa al 0,1% disminuye la filancia del plasma seminal preservando movilidad, vitalidad, funcionalidad de membrana espermática, integridad del acrosoma y características morfométricas.

2. El crioprotector N, N-Dimetilformamida en concentraciones del 4 al 7% preserva el semen de alpaca durante el proceso de criopreservación.

Acerca del crioprotector N, N-Dimetilformamida se concluye que:

- ✓ La concentración de 7% del crioprotector N, N-Dimetilformamida sería de elección para criopreservar semen de alpaca.

Acerca del protocolo de criopreservación utilizado se concluye que:

- ✓ El equilibramiento a 5 °C del semen de alpaca sería la etapa en la cual se induce mayor pérdida de la integridad acrosomal.

3. La motilidad espermática no es un indicador de la calidad del semen fresco o criopreservado de alpaca.

4. La concentración de 50 mOsm/l de la solución de fructosa-citrato de sodio es de elección para realizar el test de endósmosis.

5.2. Proyecciones futuras

A partir de los resultados de esta tesis las futuras investigaciones estarían dirigidas hacia:

1. Estudiar el efecto de agregar el crioprotector N, N-Dimetilformamida y de equilibrar el semen a temperatura ambiente, sobre las características espermáticas de alpaca.
2. Estudiar el efecto de realizar una curva de congelamiento rápida sobre el semen de alpaca diluido con el crioprotector N, N-Dimetilformamida.
3. Estudiar el efecto de distintas combinaciones entre temperaturas de equilibramiento y curvas de congelación en semen de alpaca diluido con el crioprotector N, N-Dimetilformamida.
4. Realizar inseminaciones artificiales en alpacas hembras con semen criopreservado con N, N-Dimetilformamida.

REFERENCIAS

Abaigar, T., Holt, W., Harrison, R., Del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulation in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazela dama mhorr*), Semen as revealed by pattern analysis of computer assisted motility assessments. Biol Reprod; 60:32-42.

Abaigar, T., Cano, M., Pickard, A. R., Holt, W. V. (2001). Use of computer assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazela dama mhorr*), Effects of body weigth, electroejaculation technique and short-term semen storage. Reproduction; 12: 265-273.

Agüero, A., Zanzottera, E., Egey, J., Leoni, I., Martinez Vivot, M. (1997). Anatomia ultrasonográfica del aparato genital macho de llama *Lama glama*. Actas del Segundo Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos realizado en la Universidad Católica de Cordova, Provincia de Cordova, Argentina, 111-113.

Aller, J. F., Rebuffi, G. E., Cancino, A. K., Alberio, R. H., (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, motilidad, vitalidad y fertilidad de espermatozoide de llama (*lama glama*). Arch. Zootec. 52, 15-23.

Alvarenga, M., **Papa, F., Landim-Alvarenga, F., Medeiros, A. (2005).** Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. Anim. Reprod. Sci.89:105-113.

Antonini, M., González, M., &. Valbonesi, A. (2004). Relationship between age and postnatal skin follicular development in three types of South American domestic camelids. Livestock Production Science 90: 24-246.

Banda, J., Evangelista, S., Ruiz, L., Sandoval, R., Rodríguez, C., Valdivia, M., Santiani, A. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Rev Inv Vet, Perú 21: 145-153.

Bedford, J. M. (1983). Significance of the need for sperm capacitation before fertilization Biol. Reprod; 28: 108-120.

Boiso, I. (2001). Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 18, 127-131.

Boyers, S. P., Davis, R., Katz, D. F. (1989). Automated Semen Analysis. Curr Probl Obstet Gynecol Fertil 12:172-200.

Bravo, P. W., Johnson, L. W. (1994). Reproductive Physiology of South American Camelids. Vet. Clin. A. Am. Food Anim. Pract. 10, 259-264.

Bravo, P.W., Flores, U., Garnica, J., Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. Theriogenology 47, 619-626.

Bravo, P.W., Pacheco, C., Quispe, G., Vilcapaza, L., Ordoñez, C. (1999). Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. Archives of Andrology 43: 239-246.

Bravo, P.W., Skidmore J.A., Zhao X.X. (2000). Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. Ani. Reprod. Sci. (62): 173-93.

Bravo, P.W., Callo, M., Garnica, J. (2000b). The effect of enzymes on semen viscosity en llamas and alpacas. Small Rumiant Research, 38: 91-95.

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.

Bustinza, A. V. (2001). Conocimiento del gran potencial andino de la alpaca. Edit. FMVZ - UNA. Puno, Perú.

Carpio, M., Ordoñez, C., Alarcón, V., Bravo, P. (1999). Presencia de espermatozoides, niveles de testosterona, y tamaño testicular en alpacas. EN: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco - Perú.

Carretero, M. I., Lombardo, D., Arraztoa, C. C. (2012). Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the Sperm Chromatin Dispersion test. *Anim. Reprod. Sci*.; 131 (1-2): 63-71.

Carretero, M. I., Neild, D. M., Ferrante, A., Caldevilla, M., Arraztoa, C. C., Fumuso F. G., Giuliano, S. M. (2014). Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of *Lama glama* spermatozoa. Andrologia, doi: 10.1111/and.12319.

Casaretto, C., Martínez Sarrasague, M., Giuliano, S., Rubin de Celis, E., Gambarotta, M., Carretero, I., Miragaya, M. (2011a). Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia*, DOI: 10.1111/j.1439-0272.2011.01186.x.

Casaretto, C., Lombardo, D., Giuliano, S. M,. Gambarotta, M., Carretero, M. Miragaya. (2011b). Morphometric analysis of llama *(Lama glama*) sperm head. *Andrologia* .Jul 18.

Chang, M. C., Hunter, R. F. (1975). Capacitation of mammalian sperm: biological and experimental aspects, In: Hamilton D.W, Greep RO (Eds). Handbook of Physiology. Endocrinology V. Washington. American Physiological Society, 339-351.

Choez, K., Evangelista, S., Ruiz, L., Sandoval, R., Santiani, A. (2014). Efecto de la concentración de tres crioprotectores sobre la motilidad, vitalidad e integridad acrosomal de espermatozoides criopreservados de epidídimo de alpaca. Spermova; 4 (1): 80-82.

Chuna, P., Leyva, V., Franco, J. (2000). Adherencias pene-prepuciales y niveles de testosterona circulantes en alpacas. Rev Inv Vet Perú 10 (2):11-16.

Dávalos, R., Olazábal, J. (2002). Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Rev Inv Vet Perú 13:98-99.

Davis, R. O., Siemers, R. J. (1995). Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. Reprod Fertil Dev; 7: 857-869.

Director, A., Giuliano, S., Carretero, M., Pinto, M., Trasorras, V., Miragaya, M. (2007). Electroejaculation and seminal characteristics in llama (*lama glama*). Journal of Camel Practice and Research. 14 (2): 203-206.

De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, H. G., Colenbrader, B. Werkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. Cryobiology. 30, 32-44.

Delhon, G. A. Von Lawzewitsch, I. (1987). Reproduction in the male llama (*Lama glama),* South American Camelid. I. Spermatogenesis and organization of the intertubular space of the mature testis. Acta Anat. 129, 59 -66.

Dott, H. M., Foster, G. C. (1979). The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. J Reprod Fertil 55, 161-166.

Evangelista, D., Evangelista, S., Santiani, A., Valdivia., M. (2015). Análisis morfométrico de espermatozoides de alpaca utilizando softwares de captura y medición de imágenes. Primer Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal, pag 395-398. Buenos Aires - Argentina.

FAOa, (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Argentina. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina. TCP/RLA/2914. Organización para la Agricultura y la Alimentación. Oficina regional para América Latina y el Caribe.

FAOb, (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Bolivia. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina. TCP/RLA/2914. Organización para la Agricultura y la Alimentación. Oficina regional para América Latina y el Caribe.

FAOc, (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Ecuador. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina. TCP/RLA/2914. Organización para la Agricultura y la Alimentación. Oficina regional para América Latina y el Caribe.

FAOd, (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina. TCP/RLA/2914. Organización para la Agricultura y la Alimentación. Oficina regional para América Latina y el Caribe.

Fernández Baca, S., Novoa, C., Sumar, L. (1972). Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. Rev Inv Pec. IVITA 1(2):115-128.

Ferré, L. B. Werkmeister A. (1996). Desarrollo de una vagina artificial termoeléctrica para la colecta de semen en camélidos. Rev. Arg. Prod. Anim. 16 (4) ,363-365.

FIA, (2004). Estrategia de Innovación Agraria para la ganadería de camélidos. Fundación para la Innovación Agraria, Gobierno de Chile.

Flores, N. H., Giuliano, S., Quispe, A., Ordoñez, C., Carretero, M., Miragaya, M., Cucho, H. (2014). Test de Endosmosis en Espermatozoides de Alpaca. IV Jornadas del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal. Buenos Aires – Argentina, InVet pag 155.

Fowler, M. (1998). Medicine and Surgery of South American Camelids. Second Edition. Iowa State University Presss/Amer, 391.

Fumuso, F. G., Giménez, M. L., Neild, D. M., Giuliano, S. M., Chaves, M. G., Carretero, M. I. (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.

Garnica, J., Achata, R., Bravo, P. W. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. Anim. Reprod. Sci. 32, 85-90.

Giuliano, S., Spirito, S., Miragaya, M. H., Capdevielle, E. F., Agüero, A., Boquet M. D., Ferrari, M. (2002a). Electroejaculation and seminal parameters in (*Vicugna vicugna*). Abstrat Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society.

Giuliano, S., Ferrari, M., Agüero, A., Spirito, S., Campi, S., Director, A., Fernández, H. (2002b). Methodological advances on the hypoosmotic swelling test (HOS test) in llama (*Lama glama*) spermatozoa. Abstract en Biocell 17 (1), 149.

Giuliano, S., Director, A., Trasorras, V., Maizon, D., Miragaya, M. (2005). Evaluation of membrane integrity and function in fresh and cooled Lama glama semen. VII Jornadas Multidisciplinarias de la Sociedad Argentina de Biología. Actas en Biocell (19).

Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., Miragaya, M. (2008). Collection methodseason and individual variationon seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). Animals Reproduction Sciencie 104, 359-369.

Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M. Miragaya, M. (2009). Improvement of llama (Lama glama) seminal characteristics using collagenase. Ani. Reprod. Sci.

Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Miragaya, M. (2010). Improvement of llama (*Lama glama*). Seminal characteristics using collagenase. Anim. Reprod. Anim. Reprod. Sci 118 (1): 98-102.

Giuliano, S. M., Chaves, M. G., Trasorras, V. L., Gambarotta, M., Neild, D., Director, A., Pinto, M., Miragaya, M. H. (2012). Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. Animal Reproduction Science 131; 204-210.

Giuliano, S. (2012). Extracción y evaluación de semen de camélido sudamericano. Spermova, revista Científica de la Asociación Peruana de Reproducción Animal, 2 (1): 6-9.

Hoffman, E., & M. E. Fowler. (1995). The Alpaca book. Clay Press Inc., Herald, California.

Holt, W. V. (1996). Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. Reprod. Dom. Anim. 31: 17-24.

Huanca, W., Adams, G. (2007). Semen collection and artificial insemination in llamas and alpacas. En: Youngquist R and Threlfall W 2° Edition Saunders. Elseiver Inc, pp 869-873.

INEI, (2012). IV Censo Nacional Agropecuario. Instituto Nacional de Estadística e Informática del Perú.

Johnson, L. W. (1989). Llama Reproduction. Johnson, L.W. (Ed). Vet. Clinic of North America. Food Anim Practice W.B. Saunders Co. Philadelphia PA, 5 (1) 37-54.

Kadwell, M. M., Fernandez, H. F., Stanley, R., Baldi, J. C., Wheeler, R., Rosadio & M. W. Bruford. (2001). Genetic analysis reveals the wild ancestors of llama and alpaca. Proceedings of the Royal Society London B 268: 2575-2584.

Kershaw Young, C. M., Stuart, C., Evans, G., Maxwell, W. (2013). The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. Ani. Reprod. Sci.138: 261-267.

Lichtenwalner, A. B., Woods, G. L., Weber, J. A. (1996). Seminal collection. Seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. Theriogenology 46, 293-305.

Lupton, C. J., A. McColl & R. H. Stobart. (2006). Fiber characteristics of the Huacaya alpaca. Small Ruminant Research 64: 211-224.

Marin, J. C., B. Zapata, B. A., González, C., Bonacic, J. C., Wheeler, C., Casey, M.W., Bruford, E., Palma, E., Poulin, A., Alliende & A. E. Spotorno. (2007). Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. Revista Chilena Historia Natural 80: 121-140.

Martí, J.I., Aparicio, I.M., García, H. (2011). Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. Theriogenology 75: 473-481. España.

Maxwel, C., Evans, G., Morton, K. (2008). The development of collection, processing and Storage Technologies for Alpaca Semen, Extender abstracts WBC/ ICAR Satellite Meeting on.

Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isnt it better. Theriogenology 57: 327-344.

Mortimer, S. (2000). CASA - Practical Aspects. J Androl 21: 515-524.

Morton, K. M., Roslyn Bathgate, A. B., Evans, G., Maxwell, W. M. (2007). Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-Tris and Lactose-Based diluents and pellets and straws. Reproduction, Fertility and Development; 19 (7), 792-796.

Morton, K. M., Evans, G., Maxwell, W. M. (2010). Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (Vicugna pacos) sperm. Theriogenology 74 (2), 311-316.

Naveros, M. L., Contreras M. (2015). Evaluación de dos dilutores comerciales en la congelación de semen con fines de inseminación artificial en alpacas (*Vicugna pacos*). 37th Reunión Científica de la Asociación Peruana de Producción Animal. P, 244.

Neely, D. P., Bravo P. W. (1997). Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. In: Youngquist R.S 8Eds, Current therapy in large animal theriogenology. Editorial: W.B. Saunders Company. Philadelphia. Pennsylvania, 898.

Neild, D.M., Bart, M., Gadella, M., Chaves, G., Miragaya, M.H., Colenbrander, B., Agüero, A. (2003). Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. Theriogenology 59, 1693-1705.

Novoa, C, Leyva V. (1996). Reproducción en alpacas y llamas. Fondo Contravalor Perú-Suiza, CISA/IVITA, Fac Med Vet, Univ Nac Mayor de San Marcos (Serie Publ IVITA N°26). 30 p.

Ordoñez, C., Ampuero, E., Cucho, H., Chalco, G. (2012). Morphometric characterization of alpaca sperms using the Integrated Sperm Analysis System, Spermova, 2 (1): 67- 68.

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

Pacheco, J.I., Deza, H.W., Mamani, R.H. y Quispe, Y.E. (2010). Evaluación de la maduración espermática en alpacas (*Vicugna pacos*) mediante metacromasia nuclear

inducida. *Resúmenes de la XXXIII Reunión Científica Anual de la Asociación peruana de Producción Animal*. APPA. Huancavelica. Perú.

Paricahua, E., (2001). Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. Tesis Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nac. Altiplano. 26.

Pasco, M.E. (2001). Desarrollo histológico testicular y características biométricas en alpacas desde el nacimiento al año de edad. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor San Marcos.

Poblete, P., Von Baer, A., Von Baer, L., Del Campo, M. (2003). Evaluación de la morfología espermática del semen de camélidos sudamericanos tratados con tripsina. Memorias III Congreso Mundial Sobre Camelidos, Potosí, Bolivia. II, 765-768.

Proiser, ISAS-CASA. (2010). Manual de uso del ISAS®. Integrated Sperm Analysis System. Projectes I Serveis R+D S.L. España.

Quintero Moreno, A., Madrigal, O., Gallardo, F., Ramió, L., Peña, A., Miró, J., Rigau, T., Rodríguez Gil, J.E. (2003). Subpoblaciones espermaticas en mamiferos. Biologia de la Reproducción; 8: 47-49.

Renard, P., Trimeche, A., Le Pichon, J.P., Quero, J.C., Griveau, J.F., Chouteau, P., Tainturier, D., Le Lannou, D. (1996). Sperm motility and flagelar motion: a comparison between boar and other mammalian species. Reprod Domestic Anim: 31 81: 249.250.

Reunión Convenio de la Vicuña. (2013). La vicuña manual para su conservación y uso sustentable.

Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T., Peña A., Rodriguez, Gil J.E. (2001). Effects of glucose and fructose on motility pattems of dog spermatozoa from fresh ejaculates; Theriogenology: 56: 801.815.

Rivera del Álamo, M., Palomo, M., Quintero Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez Gil, J.E. (2002). Sperm subpopulations in boar semen and their relationship with natural photoperiod 17th Congress of the International Pig Veterinary Society, June 2-5/ Ames, Iowa; Vol 2. pp. 669-494.

Rodríguez, C. (2009). Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (Vicugna pacos). Tesis Mag. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ Nacional Mayor de San Marcos. 72 p.

Rodríguez, Gil. (2000). Aspectos funcionales de los espermatozoides de mamífero. En: Jornadas sobre la fecundación en mamíferos; conceptos actuales. Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, Unidad de Reproducción Animal; p. 1-6.

Rojas, E. (1998). Determinación de la temperatura testicular y su influencia sobre la espermatogénesis en alpacas de la raza huacaya. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Lima: Univ. Nac. Altiplano.

San Miguel, C. (2001). Administración de testosterona en alpacas machos con adherencias pene-prepuciales. Tesis Médico Veterinario. Lima: Univ Nac Mayor de San Marcos. 36p.

San Martín, M., Copaira, M., Zuniga, J., Rodriguez, R., Bustinza, G., Acosta, L. (1968). Aspects of reproduction in the alpaca. J Reprod Fert 16: 395-399.

Santiani, A., Huanca, W., Sapana, R., Huanca, T., Sepúlveda, N., Sanchez, N. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. Asian Journal of Andrology 7 (3), 303-309.

Santiani, A., Evangelista, S., Valdivia, M., Risopatrón, J., Sanchez, R. (2013). Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. Theriogenology, 79: 842-846.

Schmid, S., B. Lehmann, M. Kreuzer, C. Gómez & C. Gerwig. (2006). The value chain of alpaca fiber in Peru, an economic analysis. Tesis de Master. Swiss Federal Institute of Technology Zurich. Switzerland.

Smith, C. L., Peter, A. T., Pugh, D.G. (1994). Reproduction in llamas and alpacas: A review. Theriogenology 41, 573-592.

Soler, C., Gadea, B., Soler, A.J., Fernández, M.R., Nuñez, J. (2005). Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. Theriogenology, 64: 1236-1243.

Soler, C., Sancho, M., García, A., Fuentes, M.C., Núñez, J; Cucho, H. (2013). Ejaculate Fractioning Effect on Llama Sperm Head Morphometry as Assessed by the ISAS-CASA system. Reprod Dom Animdoi: 10.1111/rda.12226.

Squires, E. L., Keith, S. L., Graham, J. K. (2004). Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. Theriogenology, Volume 62, Issue 6, 15, 1056-1065.

Sumar, J., Leyva, V. (1981). Coleccion de semen mediante vagina artificial en la alpaca. In: roceedings of the IVth International Conference on South American Camelids, Punta Arenas, Chile, 12.

Sumar, J. (1983). Studies on Reproductive Pathology in alpacas. MS Thesis. Dept. Obstet and Gynaec. College of Vet, Swedish Univ. of Agric Sci, Upsala.

Sumar, J. (1985). Reproductive physiology in South American Camelids. In Genetics of reproduction in sheep. Land, R.B and Robinson, D.W. eds. Butterworths, pag. 81-95.

Sumar, J. (1988). South American Camelids Raising and Reproduction in the High Andes.

Sumar, J. (1991). Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. En: Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Chile. Pag. 111-120.

Sutovsky, P. & Manandhar G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartamental analisys. In: De Jonge C. and Barratt C. The Sperm Cell. Cambridge University Press. Cambridge UK, pp 1-30.

Tibary, A., Anouassi, A. (1997). Theriogenology in Camelidae, Actes ed. Rabat, Morocco.

Tibary, A., Vaughan, J. (2006). Reproductive physiology and infertility in male South American Camelids: A review and clinical observations. Small Ruminant Research (61): 283-283.

Thurston, L.M., Watson, P., Mileham, A., Holt, W. (2001). Morphologically distinct sperm subpopulation defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation, J. Androl; 22 (3): 382-394.

Trasorras, V., Giuliano, S., Chaves, G., Neild, D., Agüero, A., Carretero, M., Santa Cruz, R., Baca Castex, C., Alonso, A., Pinto, M., Morell, J., Miragaya, M. (2012). In vitro embryo production in llamas (*Lama glama*) from in vivo matured oocytes with fresh semen processed with Androcoll-ETM using defined embryo culture media. Reprod Domest Anim. 47: 562-567.

Trasorras, V., Giuliano, S., Miragaya, M. (2013). In vitro production of embryos in South American Camelids. Anim Reprod Sci. 10 (136): 187-193.

Trasorras, V.L., Baca Castex, C., Alonso, A., Giuliano, S., Santa Cruz, R., Arraztoa, C., Chaves, G., Rodríguez, D., Neild, D., Miragaya, M. (2014). First llama (*Lama glama*) pregnancy obtained after in vitro fertilization and in vitro culture of gametes from live animals. Anim. Reprod. Sci.; 148 (1-2): 83-89.

Urquieta, B., Cepeda, R., Caceres, J.E., Raggi, L.A., Rojas, J.R. (1994). Seasonal variation in some reproductive parameters of male vicuña in the High Andes of northern Chile. J. Arid Environ. 26, 79-87.

Valdivia, M., Suyo, M., Manosalva, I., Ruiz, M., Romero, S., Olazabal, J. (2000). Cryopreservation and immunoreactivity of proacrosin/acrosin system in alpaca espermatozoa. Biol Reprod 62 (Suppl): 146-157.

Vásquez, J., E. Florentini, M., Valdivia. (2012). Reprod Domest Anim. Feb 15. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.01988.x.

Vaughan, J., Galloway, D., Hopkins, D. (2003). Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation, Pub. Nº03/104, Kingston, Australia.

Von Baer y Hellemann. (1998). Variables seminales en llama (*Lama glama*). Arch. Med. Vet. 30 (2).

Wang, X., Wang, L. & X. Liu. (2003). The Quality and Processing Performance of Alpaca Fibres: Australian Alpaca Fibre Industry and the Fibre properties. Rural Industries Research and Development Corporation. Chapter 2-8.

Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Reprod Sci 60-61:481-492.

World Health Organization WHO. (2010). Laboratory manual for the examination and processing of human semen, Fifth edition.

Xungai, W., Lijing, W. & L. Xiu. (2003). The Quality and Processing Performance of Alpaca Fibres. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No 03/128. Australia. 119 p.

Zirena, N., Madrid, N., Limache, T., Huanca, W. (2015). Criopreservación de semen de alpacas sometido a dos métodos físicos para reducir la viscosidad. Primer Congresos de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal; Camélidos (49), 407.