

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



TESIS:

**Evaluación de tres dilutores para la criopreservación de
espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpacas
(*Vicugna pacos*) en la región Ayacucho**

Para optar el título profesional de:
MÉDICO VETERINARIO

PRESENTADO POR:
Bach. Ronal ROBLES QUISPE

ASESOR:
Mg. Sc. César Augusto OLAGUIVEL FLORES

COASESORA:
Ing. Mary Luz NAVEROS FLORES

AYACUCHO - PERÚ

2016

Con amor a Claudia mi Madre y Lucio mi Padre, quienes me brindaron una maravillosa formación, por su ternura y todo su amor, por contagiarme de sus mayores fortalezas. Mamá, tú me pusiste como ejemplo el ser “luchón” y decidido, y pelear contra la adversidad que es una condición dolorosa pero pasajera, me enseñaste a levantarme después de cada tropiezo y a tener siempre un colchón para los tiempos difíciles. Papá, me enseñaste a ser perseverante y paciente, a ponerme pasos fijos para alcanzar mis metas, a ver los problemas con la cabeza fría y como situaciones solucionables y no como dramas, y a guiarme por la premisa de que “toda disciplina tiene su recompensa”.

A mis hermanos José Luis, Juan y mi tío Alejandro *in memoriam* que de algún lugar están viendo mis logros y por la invaluable herencia que me han dado en vida: Mi profesión.

AGRADECIMIENTO

A Dios por la vida, iluminarme, darme las oportunidades y la fuerza para salir adelante; sin él nada sería posible en mi vida.

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por albergarme y brindarme conocimiento en mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, a la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria que contribuyeron en mi formación profesional y personal.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho, por ceder los materiales necesarios para este trabajo de investigación, por despertarme el cariño a la investigación y amor a los camélidos sudamericanos.

Al Mg. Sc. César A. Olaguivel Flores, asesor de este trabajo de investigación, por su gran apoyo, consejos y sugerencias. Confiar en mi capacidad para realizar este trabajo.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores, como coasesora por abrirme las puertas del laboratorio de biotecnología reproductiva del INIA, por su apoyo incondicional, consejos, sugerencias, amistad y comprensión.

A Edson, mi hermano por poner a prueba mi paciencia y mis habilidades y por darme la oportunidad de tener un cómplice en situaciones de alegría, pero que también es el único que siente lo mismo que yo en algunos momentos difíciles, los cuales comparte conmigo, y aligerar la carga.

Mis amados hermanos Cristian, Jhonatan, Paulino, Lucio, Hilda y Betzabeth; por los ánimos constantes, por confiar siempre en mí, por no dejarme caer y ayudarme a

descubrir una nueva etapa compartida y aprender que los problemas no se hacen grandes si se tratan a tiempo.

A Gabriela por enseñarme de forma divertida muchos hábitos buenos como la puntualidad y la importancia de los detalles en la vida diaria y sobre todo a tener coherencia entre las palabras y acciones y por todos los buenos y malos momentos a lo largo de este proceso de investigación.

A mis queridos amigos Edwin, Mijaíl, por su apoyo durante la ejecución de este trabajo y por darme muchos días felices y llenos de risas y por dejarme entrar a sus vidas y compartir conmigo un poquito de cada uno de ustedes.

A todos aquellos que de una u otra manera me apoyaron en mi vida y a concluir mi carrera a través de su ejemplo, apoyo, consejos y cariño agradezco profunda y sinceramente.

A mis sobrinos, sobrinas, primas y primos, por darme tantos momentos memorables, divertidos y agradables, por compartir conmigo las diferentes etapas de mi vida por ser grandes amigos.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XI
RESUMEN	XII
INTRODUCCIÓN	1
Objetivos.	2
Objetivo general.	2
Objetivos específicos.	3
I REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1. Antecedentes.	4
1.2. La alpaca.	8
1.2.1. Razas de alpacas.	9
1.2.2. Taxonomía de la alpaca.	10
1.3. Problemática de la fisiología reproductiva de la alpaca	11
1.4. Anatomía reproductiva de la alpaca macho.	12
1.4.1 Testículos.	12
1.4.2. Epidídimo y conducto deferente.	12
1.4.3. Glándulas sexuales Accesorias.	13
1.5. Fisiología reproductiva de la alpaca macho.	13
1.5.1. Pubertad.	13
1.5.2. Espermatogénesis.	14

1.6.	Evaluación de los Espermatozoides.	15
1.7.	Características seminales de la alpaca.	16
1.7.1.	Características macroscópicas.	16
1.7.2.	Características microscópicas.	16
1.8.	Experiencias en el uso de Dilutores en semen de camélidos.	18
1.9.	Diluyentes más usados para congelar semen de alpacas.	20
1.9.1	Tris yema de huevo	21
1.9.2	Dilutor a base de TES.	21
1.9.3.	Dilutor a base de leche.	21
1.10.	Agentes antibacteriales.	22
1.11.	Diluyentes comerciales.	23
1.11.1.	AndroMed®.	23
1.11.1.1.	Protocolo de producción eficiente.	25
1.11.1.2.	Amplio rango de aplicación.	25
1.11.1.3.	Composición.	25
1.11.1.4.	Estándares de producción y control de calidad.	25
1.11.2.	Triladyl®.	26
1.11.2.1.	Estándares de la industria internacional.	26
1.11.2.2.	Aplicación eficiente.	27
1.11.2.3.	Composición.	27
1.11.2.4.	Recomendaciones para la aplicación.	27
1.12.	Principios generales de la Criopreservación de semen.	29
1.13.	Crioprotectores.	31
1.13.1.	Yema de huevo.	31

1.14.	Dilución de semen.	32
1.15.	Actualidad de la congelación de semen de alpacas.	32
II	MATERIALES Y MÉTODOS.	34
2.1.	Localización.	34
2.2.	Duración.	34
2.3.	Muestra.	35
2.4.	Materiales.	35
2.4.1.	De laboratorio.	35
2.4.2.	Equipos.	35
2.4.3.	De campo.	36
2.4.4.	Material biológico.	36
2.4.5.	Dilutores y extensores	36
2.4.6.	Otros.	36
2.5.	Metodología.	38
2.5.1.	Procedimiento experimental.	38
2.5.1.1.	Preparación de dilutores y materiales de laboratorio.	39
2.5.1.2.	Recolección y traslado de testículos de alpacas del matadero de Pilpichaca-Huancavelica.	40
2.5.1.3.	Diseción de testículos para la obtención del epidídimo.	41
2.5.1.4.	Obtención de espermatozoides de la cola del epidídimo.	41
2.5.1.5.	Dilución de espermatozoides en cada uno de los Dilutores.	42
2.5.1.6.	Evaluación microscópica antes del refrigerado.	42
2.5.1.7.	Refrigeración de los espermatozoides.	43

2.5.1.8. Llenado y sellado de pajillas	44
2.5.1.9. Congelación de espermatozoides	44
2.5.1.10. Descongelación y evaluación de espermatozoides.	45
2.6. Diseño estadístico.	45
III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	47
IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
V REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	61
VI ANEXOS.	70

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro N° 1.1.	Características microscópicas en Alpacas.	16
Cuadro N° 1.2.	Comparación de criterios de calidad en diluyentes de semen.	24
Cuadro N° 1.3.	Componentes de los diluyentes Andromed y Triladyl.	29
Cuadro N° 3.1.	Motilidad de espermatozoides epididimarios pre refrigeración en alpacas	47
Cuadro N° 3.2.	Motilidad de espermatozoides epididimarios post refrigeración en alpacas.	49
Cuadro N° 3.3.	Motilidad de espermatozoides epididimarios post descongelación en alpacas.	50
Cuadro N° 3.4.	Vitalidad de espermatozoides epididimarios pre refrigeración en alpacas.	53
Cuadro N° 3.5.	Vitalidad de espermatozoides epididimarios post refrigeración en alpacas.	54
Cuadro N° 3.6.	Vitalidad de espermatozoides epididimarios post descongelación en alpacas.	56
Cuadro N° 3.7.	Concentración inicial de espermatozoides epididimarios en alpacas.	57
Cuadro N° 6.1.	Componentes del dilutor AndroMed®.	71
Cuadro N° 6.2.	Componentes del dilutor Triladyl®.	71
Cuadro N° 6.3.	Componentes del dilutor Tris-yema de huevo de gallina.	72
Cuadro N° 6.4.	Resultados obtenidos en las diferentes etapas de la criopreservación de espermatozoides del epidídimo de alpacas.	73

Figura N° 6.1. Flujo de congelación de espermatozoides epididimarios de alpacas.

71

INDICE DE GRÁFICOS

Grafico N° 6.1.	Diagrama del proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas	70
Grafico N° 6.2.	Porcentaje de motilidad antes y después de la refrigeración, y pos congelación.	74
Grafico N° 6.3.	Tendencia de motilidad según dilutores en diferentes etapas de la criopreservación de espermatozoides de epidídimo de alpacas.	74
Grafico N° 6.4.	Porcentaje de vitalidad utilizando los tres tres dilutores en diferentes etapas de la criopreservación de espermatozoides de epidídimo de alpacas.	75
Grafico N° 6.5.	Tendencia de vitalidad según dilutores en diferentes etapas de la criopreservación de espermatozoides de epidídimo de alpacas.	75

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán de INIA – Ayacucho, ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray, provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho, entre los meses de Febrero a Junio del 2013. El objetivo del trabajo fue determinar la motilidad post descongelación de espermatozoides de alpaca sometido a tres tratamientos consistentes, en dilutores, el primer un dilutor comercial formulado para rumiantes (AndroMed[®]), el otro dilutor (Triladyl[®]) y el tercer fue Tris - yema de huevo de gallina. Se trabajó con una población de 100 testículos que corresponden a 50 machos alpacas mayores a 2 años de edad, procedentes del matadero Municipal de Pilpichaca. Los espermatozoides se obtuvieron de la cola del epidídimo. Se trabajó con muestras que demostraron tener porcentajes de motilidad, porcentaje de vivos y muertos y buena concentración de espermatozoides por muestra como mínimo. La motilidad pre refrigerado fue en promedio 27%, 24.7% y 16.88% para Andromed[®], Triladyl[®] y Tris - yema de huevo, respectivamente. Asimismo, los resultados de motilidad post refrigerado fue en promedio 51.47%, 43.23 y 39.38% para tratamiento Andromed[®], Triladyl[®] y Tris - yema de huevo, respectivamente. Finalmente, la motilidad de espermatozoides post descongelado fue 22.24%, 16.82% y 17.50 para el tratamiento Andromed[®], Triladyl[®] y Tris - yema de huevo, para ($p \geq 0.05$), prueba tukey. Concluyéndose que el dilutor comercial Andromed[®] resultó ser mejor, para obtener índices de motilidad elevadas.

Palabras claves: Espermatozoides, alpaca, criopreservación, Andromed[®], Triladyl[®], Tris – yema de huevo, motilidad.

INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos en las zonas alto-andinas del Perú es uno de las principales actividades económicas más importante sobre los 4000 m.s.n.m donde están las zonas más pobres de la sierra con 2.9 millones de habitantes, que representa el 12 % de la población nacional.

El Perú tiene más de 4.2 millones de camélidos sudamericanos, con 3 840 000 alpacas que es más del 84 % de los camélidos sudamericanos del mundo. Ayacucho tenía 113 332 alpacas en el 2004, hoy en día cuenta con 238 020 (INEI-DRAA-2013).

La congelación de semen es una biotecnología reproductiva muy poco empleada en camélidos sudamericanos (CSA). Las dificultades en la colección de semen y en el manejo de las muestras seminales, debido a su alta viscosidad y el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados para el semen de CSA constituyen uno en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación con resultados óptimos de calidad espermática post-descongelamiento.

Esto determina que la inseminación artificial quede restringida al uso de semen fresco. Así mismo, se tiene que considerar la baja concentración de espermatozoides y el alto porcentaje de anormales que como características usuales del semen de alpaca, incrementan la dificultad de obtener parámetros espermáticos adecuados post-descongelamiento, que permitan la fecundación.

En este sentido, la recuperación de espermatozoides epididimarios constituye una alternativa para la obtención de muestras sin el inconveniente antes mencionado.

Un paso más adelante sería lograr un método de criopreservación satisfactorio de gametos de genética superior sean estos espermatozoides, ovocitos, embriones, incluso tejidos los cuales pueden ser transportados de lugares muy distantes a los rebaños autóctonos abaratando los costos de transporte y mantenimiento si éstos fueran sementales.

La congelación de semen es cotidiana en otras especies domésticas y con resultados muy aceptables, pero en los camélidos aún no es posible de forma óptima. La falta de un protocolo efectivo para la congelación, como en otras especies, se debe a las diferencias fisiológicas de especie y la bioquímica de los espermatozoides (Holt, 2000).

De allí la imperiosa necesidad de tener un protocolo que permita obtener parámetros aceptables de motilidad en la congelación de espermatozoides de alpaca para una posterior inseminación con niveles aceptables de motilidad que permitan obtener un producto viable; esto nos posibilita la evaluación de tres dilutores para el proceso de congelación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpacas.

Por consiguiente el presente trabajo de investigación tuvo por objetivo evaluar cuál de los tres dilutores tiene mejor viabilidad post descongelamiento en espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpacas.

Por tanto el objetivo del presente trabajo fue:

- Evaluar cuál de los tres dilutores tiene mejor efectividad en mantener la motilidad en el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*).

Los objetivos específicos fueron:

- Evaluar el porcentaje de motilidad de los espermatozoides de alpaca antes de la refrigeración.
- Evaluar el porcentaje de motilidad de los espermatozoides post-refrigeración
- Evaluar el porcentaje de motilidad de los espermatozoides post-descongelamiento.
- Evaluar el porcentaje de vitalidad de los espermatozoides epididimarios en pre refinación, post refrigeración y post descongelación en los tres dilutores.
- Determinar el efecto de la concentración inicial de espermatozoides epididimarios en los tres dilutores.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA.

1.1. Antecedentes

El trabajo de investigación muestra el efecto de tres dilutores (Tris, Tes y leche descremada) en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca, la recuperación de espermatozoides se realizó a las 0, 35, 48 y 72 horas (6 testículos por grupo) y se evaluó la motilidad, concentración espermática e integridad funcional de membrana, los espermatozoides recuperados a partir de 35 horas post beneficio/castración no fueron aptos para ser congelados. La motilidad fue de 14.0, 8.6 y 17.0 % en los grupos Tris, Tes y leche descremada, respectivamente (Banda R. y Col. 2010).

Se evaluaron los efectos de tres crioprotectores: Dimetil sulfoxido (DMSO), etilenglicol (EG) y Glicerol (GL) sobre la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. Los espermatozoides fueron recuperados con la fracción A del dilutor (leche descremada, yema de huevo y fructosa) y se emplearon las muestras con motilidad espermática igual o mayor a 50%. De la fracción A fue

refrigerado (1°C/5min) hasta alcanzar 5°C. Después de 7 días de almacenamiento las motilidades post descongelación fueron de 31, 8 y 24% y los porcentajes de integridad funcional de la membrana espermática fueron de 28,17 y 26% para DMSO, EG y GL respectivamente (Marino T. y Col. 2015).

El efecto de diferentes concentraciones de glicerol, etilenglicol y Dimetil sulfoxido sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de espermatozoides criopreservado de epidídimo de alpaca utilizando los siguientes dilutores leche descremada, yema de huevo y fructuosa, a 0.75 de concentración molar, 17.5, 5.8 y 20.5% con un promedio de 14.6 %, para glicerol, etilenglicol y Dimetil sulfoxido respectivamente (Choez K. y Col. 2014).

Estudio reciente muestra la evaluación de tres dilutores (Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris en la criopreservación de semen de alpaca en pelets, evaluaron mediante la motilidad y los parámetros de movilidad (VCL, ALH), se encontró que la motilidad del semen refrigerado siendo el Triladyl[®] Base tris superiores. Al descongelamiento la motilidad espermática con el dilutor Triladyl[®] fue superior a los demás (Ordoñez C. y Col. 2015).

En un trabajo sobre la evaluación de características microscópicas de semen de llama criopreservado en dos dilutores (Andromed[®] y Base tris). Las variables que evaluaron fueron motilidad espermática (%), Vitalidad espermática (%) y anormalidades morfológicas (%).al pos descongelado obtuvieron 0 % y 17.03 % respectivamente (Laruta L. y Col. 2015).

En un trabajo de investigación reciente en la recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva, muestran que utiliza

un dilutor comercial Triladyl[®]. Reportan que obtuvieron una concentración espermática inicial de 159 000 y 98 000 de espermatozoides /mm³, motilidad de 56.8 %, 56.2 y en la vitalidad 47.8 %, 52.0 % en dos machos (Guido P. y Col. 2014).

Entre los estudios más importantes realizados en criopreservación de semen de camélidos sudamericanos está el trabajo que usando semen de alpaca obtuvo un porcentaje de motilidad post descongelamiento de 46.7% y en llama de 45%, siendo estos los mayores obtenidos hasta la fecha, sin embargo no ha sido posible reproducir la metodología (Bravo et al., 1996).

El mejor dilutor para semen de alpacas parece ser tris tamponado. El primer reporte de semen diluido y mantenido en incubación por dos horas consideró tres dilutores, fosfato salino tamponado, leche descremada y yema de huevo citrato glucosa. El porcentaje de espermatozoides vivos inmediatamente después de la colección de semen fue: 61.1, 60.8 y 64.0%, respectivamente. A las dos horas el dilutor que mantenía más espermatozoides vivos fue yema de huevo citrato glucosa (35.4%) en contraste a 22.2 y 15.6% para fosfato salino tamponado y leche descremada, respectivamente (Bravo, 1998).

En un trabajo de investigación sobre colección de semen mediante vagina artificial, se reportó que en las alpacas no existe motilidad masal, por la baja concentración relativa de espermatozoides y porque se ha observado una motilidad progresiva individual, poco vigorosa, esta última observación obedece a que el plasma seminal es altamente viscoso, por lo tanto el movimiento de los espermatozoides es lento comparado con el ovino y bovino (Sumar et al., 1981).

Estudios posteriores reportaron tasas inferiores de motilidad post descongelamiento tales como las mencionadas por (Vaughan et al., 2003), que obtuvo porcentajes de 17.4% (Pérez et al., 2005), usando diferentes concentraciones de crioprotectores reportó motilidades de 22.5 a 41% (Santiani et al., 2005), reportó la obtención de motilidades que iban desde 4 a 20%.

(Burgel et al., 2001). Reporta que se obtuvo una motilidad post descongelamiento menor a 10% y (Aller et al., 2003) obtuvo un 20% de motilidad post descongelamiento.

Los trabajos referidos a la congelación de semen de CSA muestran resultados desalentadores en función a la calidad seminal post-descongelamiento. En llamas, (McEvoy et al. 1992), obtuvieron solo un 10% de motilidad al descongelamiento de semen colectado por electroeyaculación (Von Baer y et al., 1999), describen motilidades entre 16 y 28% en semen descongelado de llama, probando la adición de un surfactante al 0.5% (Equex). Mientras que (Aller et al. 2003), reportan 20% de espermatozoides móviles. En la alpaca se ha reportado un descenso considerable de la motilidad progresiva, donde valores de 60-98% en muestras seminales frescas descienden hasta 15-20% luego del descongelamiento (Valdivia et al., 1999).

Posteriormente, congelaron semen en dos pasos obteniendo una motilidad de 20% de espermatozoides viables con acrosoma íntegro al descongelamiento de las muestras obtenidas con vagina artificial (Santiani et al., 2005). No obstante, obtuvieron resultados superiores de motilidad (30-40%) en muestras obtenidas y congeladas por el mismo método (Bravo et al., 2000).

Se han reportado diversos métodos que eliminan la viscosidad del plasma seminal con el fin de favorecer el manejo de muestras seminales. Mediante el uso de enzimas (fibrinolisisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina) y la acción mecánica del paso repetido a través de una jeringa de tuberculina (aspirado y eyectado múltiple), se ha logrado licuar las muestras de semen; sin embargo, aún es incierto el efecto de estos métodos sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides (Callo et al., 1999; Valdivia et al., 1999).

Los primeros en reportar el congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca, obteniendo 18% de motilidad y 80% de integridad acrosomal al descongelamiento. Reporta una tasa de supervivencia de solo 5% con espermatozoides epididimarios de alpaca (Morton et al., 2007) y (Gonzales, 2008).

1.2. La alpaca.

Es una especie doméstica de mamífero andino cuyo nombre científico es (*Vicugna pacos*). Genéticamente deriva mayormente de la vicuña salvaje y, en una proporción mucho menor, de la llama (Wheeler et al., 2001). Su domesticación se viene realizando desde hace miles de años.

Las relaciones entre la alpaca y los demás camélidos sudamericanos han sido controvertidas durante muchos años. En los siglos XVIII y XIX, cuando recibieron nombres científicos, se creía que la alpaca era descendiente del guanaco (*Lama guanicoe*), y fue denominada por ello *Lama pacos*, ignorándose sus similitudes con la vicuña, tanto en tamaño, como en la fibra y la dentición. Su clasificación se complicó tras comprobarse que las cuatro especies de camélidos sudamericanos pueden cruzarse entre sí y dar descendencia fértil. No fue hasta el siglo XXI que,

gracias al desarrollo de las técnicas de análisis de ADN pudo demostrarse finalmente que la alpaca y la vicuña están estrechamente relacionadas, y que el nombre científico correcto es *Vicugna pacos*, aunque se detectó un porcentaje de su ADN proporcionado por la llama, por lo que técnicamente es un taxón híbrido intergenérico (Wheeler et al., 2001).

Así mismo tienen una vida productiva de aproximadamente 14 años, quedando aptos para la reproducción a los 2 años. La alpaca es una especie que representa un factor importante de la economía de nuestro país, La población de alpacas es de 3 685,5 superando en 50,2% a la encontrada en el censo agropecuario de 1994. La raza Huacaya concentra el 80,4% de la distribución, seguida de la raza Suri con 12,2% y Cruzados con 7,3%. La población Alpaquera se concentra en la Sierra con 3 685,0 cabezas, que representa aproximadamente el 100, 0% del total. Considerando las razas, es la Huacaya la que tiene mayor participación 78,9%, seguida por la Suri con 12, 0% (INEI 2013 y CENAGRO, 2012).

Por lo menos 1.5 millones de campesinos de más de 1,000 comunidades de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Lima y Puno, los que se dedican a la crianza de vicuñas, llamas y alpacas. El Perú al poseer la mayor población mundial de alpacas, presenta dos variedades domesticadas: Suri y Huacaya (Wheeler J, 1991).

1.2.1. Razas de alpacas.

1.2.1.1. Huacaya.

Representa más del 85 % de la población de alpacas, es un animal que presenta contornos curvos y armoniosos, con una apariencia de corpulencia y una talla mayor

que la alpaca suri. Presenta una superficie externa de fibra áspera, opaca y esponjosa ya que las fibras y las mechas se disponen perpendiculares a la superficie corporal. Los rizos se disponen a lo largo de la mecha presentando una fibra suave y brillante internamente. La línea superior del dorso está muy bien cubierta haciéndola muy resistente a las condiciones climáticas adversas y a la altitud (Huanca y Mamani, 2013).

1.2.1.2. Suri.

Representa menos del 5 % de la población de alpacas, presenta contornos lineales, angulosos y armoniosos, con una apariencia menos corpulenta por la disposición de las mechas colgantes además de una talla menor que la Huacaya. La superficie externa de la fibra es suave y resbaladiza. Las mechas presentan ondulaciones suaves y largas hasta el primer tercio y de allí a la punta rulos colgantes a ambos lados del cuerpo, incluso en el copete. Es un animal de extraordinaria belleza sobre todo con un crecimiento de fibras alrededor de los 3 años (Huanca y Mamani, 2013).

1.2.2. Taxonomía de la alpaca.

Reino : Animalia
Filo : Chordata
Clase : Mammalia
Orden : Artiodactyla
Familia : Camelidae
Género : *Vicugna*
Especie : *Vicugna pacos*

Fuente: Marín et al., 2007.

1.3. Problemática de la fisiología reproductiva de la alpaca.

La fisiología reproductiva de las alpacas difiere de la de otros animales domésticos y queda pobremente entendida, por ello se busca establecer tecnologías para el manejo y preservación de sus gametos (Smith et al., 1994).

Poseen una estacionalidad reproductiva, incluyendo el apareamiento y el parto los cuales se producen durante los meses de Diciembre a Marzo, coincidiendo con los periodos de lluvias abundantes y presencia de forraje (Smith et al., 1994).

Las técnicas de reproducción asistida como la criopreservación de gametos y embriones son una herramienta clave para el manejo sostenible y estudio a nivel molecular del comportamiento de éstas células, con la finalidad de la producción, manejo y mejoramiento de esta especie (Smith et al., 1994).

En los últimos años se ha venido realizando trabajos sobre el manejo de semen para su preservación, pero las características que presenta este tipo de muestra son muy desalentadoras, ya que la técnica de extracción seminal no ha sido estandarizada y sólo se obtienen eyaculados con bajo volumen, alta viscosidad y una baja concentración de espermatozoides. Una alternativa que se ha presentado es el uso de espermatozoides del epidídimo ya que estos espermatozoides se encuentran en un nivel de maduración notable y su manejo en el laboratorio es muy satisfactorio. (Smith et al., 1994).

El uso de estos espermatozoides es principalmente para establecer un protocolo de preservación que sea manejable y el cual permita la obtención de espermatozoides post descongelamiento que presenten una alta tasa de fecundación (Smith et al., 1994).

1.4. Anatomía reproductiva de la alpaca macho.

1.4.1. Testículos.

Son órganos pares, de forma ovoide redondeada. Se encuentran en las bolsas escrotales localizadas en la región perineal, en posición similar a la del cerdo (Bravo et al, 2000), ambos testículos tienen el mismo tamaño.

En la alpaca adulta, el peso promedio es de 18 gramos y mide de 3,5 a 4,5 cm de largo por 2 a 3 cm de ancho. En alpacas y llamas es frecuente el descenso incompleto del testículo, anomalía conocida como criptorquidismo y puede ser unilateral o bilateral. En otras especies, este defecto es considerado hereditario, debido a genes recesivos. Si en el momento del nacimiento los testículos no están en el escroto, el descenso puede ocurrir posteriormente, ya sea en forma parcial o completa. Sin embargo, el descenso lento debe ser considerado una anomalía, que es probablemente una variación de la expresión de los mismos factores que determinan fallas en el descenso. Los machos con criptorquidismo bilateral son estériles, pero la mayoría muestra deseo sexual y los efectos unilaterales; su conducta sexual y producción de semen es normal. Estos animales no deben ser usados para la reproducción, debido a la naturaleza hereditaria del defecto (Huanca, 1996).

1.4.2. Epidídimo y conducto deferente.

Macroscópicamente, el epidídimo presenta tres porciones bien diferenciadas: la cabeza, relativamente voluminosa, que se inserta en la parte posterior del testículo; la porción intermedia, de forma aplanada, y la cola o porción terminal. La parte posterior, próxima a la uretra, muestra cierto engrosamiento. La longitud total del

conducto es de 40 cm y su diámetro cerca de 174 a 237 micrómetros (Bravo et al., 2002).

1.4.3. Glándulas sexuales accesorias.

En alpacas y llamas, se ha descrito dos glándulas: la próstata y las glándulas bulbouretrales. La próstata está ubicada dorsalmente sobre el cuello de la vejiga. Consta de un cuerpo con dos lóbulos unidos entre sí, que están próximos al primer segmento de la uretra; presenta, adicionalmente, una porción diseminada que penetra en el músculo uretral. Las glándulas bulbouretrales son pares, de forma ovoide. Están ubicadas a 7 cm u 8 cm de la próstata y lateralmente a la uretra, en la salida pélvica. Cada glándula tiene un promedio de 1 cm de diámetro. En alpacas y llamas, no existen glándulas vesiculares (Bravo et al., 2000).

1.5. Fisiología reproductiva de la alpaca macho.

1.5.1. Pubertad.

Se define como la edad en la que se inicia la espermatogénesis o cuando se encuentran espermatozoides en el eyaculado. Los niveles de testosterona sérica a los 9 a 11 meses se logran valores alrededor de 60 a 90 picogramos/ml (Bravo et al, 2002), esto revela que a esta edad se inicia la pubertad, asimismo, estudios demuestran la correlación con el peso corporal que alcanza el animal, así se ha visto la presentación de libido sexual en algunos machos de un año de edad (Fernández-Baca et al., 1970; Vivanco et al., 1985).

La alpaca inicia su vida reproductiva plena con la desaparición de la adherencia pene - prepucio, ya que esta condición es una limitante, esto se logra a los tres años en su totalidad (Sumar, 1983).

1.5.2. Espermatogénesis.

La regulación hormonal para la producción de espermatozoides está dada por GnRH que estimula la adeno hipófisis que libera la LH, que en las células testiculares intersticiales provoca la producción de andrógenos. También es liberada FSH (Hormona Foliculoestimulante), cuyo blanco de acción celular son las células de Sertoli con la consecuente producción de ABP y andrógenos que ayudan en la formación y la maduración espermática (Hafez, 2000).

Las colonias celulares a partir de la pubertad son los espermatogonio tipo A1 los cuales tras una división progresiva dan lugar las de tipo A2, A3 y A4. Estos últimos dan lugar a los de tipo intermedio (In), que tras una división se convierten en los de tipo B y a su vez se dividen y originan a los espermátocitos tanto primarios y secundarios que al dividirse se convierten esta vez en células haploides llamándose espermátides (Hafez, 2000).

Desde aquí la metamorfosis espermática es muy marcada observándose hasta cuatro etapas en los cuales se producen cambios como la condensación de los gránulos celulares, formación del axonema, encasquetamiento celular para la formación del acrosoma, orientación de la cola hacia la luz tubular del conducto seminífero; la última etapa de la formación del espermatozoide es la modelación de la morfología espermática propia de cada especie, se puede decir que este proceso es común a todas las especies (Hafez, 2000).

El proceso descrito se denomina ciclo epitelial del túbulo seminífero y su etapas varían ligeramente según especie, así se habla de los camélidos sudamericanos la ocurrencia de 8 etapas divididas en 4 estadios A con etapas del 1 al 4 y 4 estadios B

con etapas del 5 al 8, los cuales abarcan entre espermatogonios, espermatocitos y espermátides. La primera parte del ciclo (etapas del 1 a 4) generan hasta 54.6% de los espermátides (Bravo et al., 2002).

La última etapa testicular es la liberación del espermatozoide y su consiguiente almacenamiento y maduración en los depósitos epididimarios conocido como espermiación (Hafez, 2000).

1.6. Evaluaciones de los espermatozoides.

El éxito de las inseminaciones artificiales y los procesos de fertilización in vitro tienen enormes repercusiones tanto económicas como biológicas y depende tanto de la calidad como de la cantidad de espermatozoides depositados en el tracto reproductivo de la hembra (Hancock J., 1951).

La estimación de la calidad o de la evaluación de espermatozoides requiere la contrastación y correlación con datos de viabilidad, parámetros de motilidad espermática, morfología celular y grado de integridad celular (especialmente del acrosoma) (Hancock J., 1951).

El desarrollo de pruebas de laboratorio que puedan anticipar de forma precisa el poder fecundante de los espermatozoides en las especies domésticas y salvajes ha sido un gran reto para los investigadores dedicados a las tecnologías reproductivas. La evaluación de los parámetros fisiológicos y morfológicos que presentan los espermatozoides es fundamental, ya que proporciona criterios sobre el destino de las muestras, su forma de conservación y su forma de aplicación. Hoy en día no existe un método universal que pueda predecir la fertilidad de las muestras de espermatozoides (Hancock J., 1951).

1.7. Características Seminales de la alpaca.

1.7.1. Macroscópicas.

Las características macroscópicas del semen de camélidos sudamericanos, entre las cuales se consideran, color, volumen, filancia, y pH. Estas características del eyaculado dependerán del tipo de colección y de la manipulación, así como de las características (Bravo et al., 2000).

Color. Observado directamente a través del tubo Falcón, la gama de colores normales que se tiene que observar es entre blanco claro o blanco cremoso según la concentración que tenga (Bravo et al., 2000).

Volumen. Se observa en el mismo tubo graduado que puede ser de 1 a 10 ml dando un promedio de 3.5 (Bravo et al., 2000).

1.7.2. Microscópicas.

Las características microscópicas más importantes que se evalúan en el semen son concentración, motilidad, vitalidad y porcentaje de anomalías.

Cuadro N° 1.1. Características seminales microscópicas en alpacas

Autor	Método de colección	Concentración espermática (ESP/mm3)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)
Quintano (2002)	Desviación de conductos deferentes	2 387 000	64.81	62.47
Huanca y Gauly (2001)	Vagina artificial	80 000	--	--

Dávalos y Olazábal (2002)	Vagina artificial	280 000 a 5 750 000	2 a 68.9	4.3 a 72.1
Aller y col. (2003)	Vagina artificial	7 520 000	54.3	68.5
Gonzales y Copa. (2003)	Vagina artificial	2 870 000	25.7	31.8
Fernández y col. (2003)	Vagina artificial	4 650 000	32.5	70.04

Fuente: (Pacheco J., 2008).

Motilidad espermática.

La movilidad espermática se considera el primer parámetro de calidad ya que el transporte espermático en el tracto femenino y la capacidad de penetración del ovocito, dependen en gran medida de este parámetro. Sin embargo, la movilidad no es sinónimo de capacidad fecundante ya que refleja únicamente una de las funciones del espermatozoide, que es la actividad flagelar, mientras que otras estructuras espermáticas (acrosoma, membrana espermática) también intervienen en el proceso de la fertilización. Por tanto, a pesar de ser indispensable para la fertilización, no pronostica de forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide, debido fundamentalmente a la valoración subjetiva de dicho parámetro, por lo que su correlación con la fertilidad oscila entre valores que van de 0 a 0,6 (Fiser y Fairfull, 1990).

También Se hace la observación a un aumento de 100 a 400x, se ha reportado un porcentaje de motilidad de 34.2 ± 5.3 (Dávalos y Olazábal, 2002).

Viabilidad.

Es el porcentaje de espermatozoides vivos es de 34.3 ± 4.2 por ciento (Dávalos y Olazábal, 2002).

1.8. Experiencias en el uso de dilutores en semen de camélidos

Los dilutores, son medios que deben realizar las funciones de aportar nutrientes como una fuente de energía, proteger contra el efecto nocivo del enfriamiento rápido, ser amortiguadores de tal manera que impidan los cambios perjudiciales en el pH, mantener la presión osmótica apropiada y el balance electrolítico, inhibir la proliferación electrolítica, incrementar el volumen del semen y proteger a las células durante el congelamiento (Hafez, 2000).

Prácticamente todos los diluyentes para semen líquido o congelado tienen yema de huevo o leche descremada o una combinación de estas dos, como componentes básicos. Es posible que el suero sanguíneo al igual que la yema de huevo ofrezca una protección a la membrana del espermatozoide al congelamiento, que consistiría en una interacción de la superficie celular más con los lípidos que con las proteínas (Hafez, 2000).

La dilución y conservación del semen procura el mantenimiento de su capacidad fertilizadora por un tiempo prolongado (De Alba., 1985).

Las funciones principales de cualquier dilutor es que debe proveer nutrientes para los espermatozoides y además ser un vehículo para que el semen se emplee en programas de inseminación artificial. A la fecha se han usado varios dilutores en semen de alpacas, entre ellos se encuentran: leche descremada, fosfato salino

tamponado, glucosa citrato, yema de huevo glucosa citrato, Triladyl y tris tamponado (Bravo, 1998).

La congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferente de camélidos en el buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol, a la descongelación varió el índice de recuperación del 18% al 43% dependiendo del nivel de la yema de huevo (Pérez et al, 2004).

La yema de huevo citrato - glucosa parece ser el mejor dilutor para el semen de alpacas por lo menos por dos horas siguientes a la colección del semen. Además, señala que las características especiales del eyaculado de los camélidos sudamericanos domésticos (alpacas y llamas) tienen una alta viscosidad lo que dificulta la posibilidad tan fácil de utilizar dilutores que son empleados en otras especies para fines de su conservación de la calidad del eyaculado, reportándose con resultados alentadores el uso de enzimas como la tripsina y colagenasa para lograr la dilución de la viscosidad del semen colectado en alpacas (Bravo, 1998).

La albúmina sérica bovina (BSA) y glucosa en la conservación de semen refrigerado de llamas, es posible utilizar para la conservación de semen de llamas en refrigeración, con una motilidad mayor del 43% a las 24 horas (Huanca y Gauly, 2001).

En camélidos aún se viene investigando dilutores adecuados para trabajos de congelamiento. (Bravo, 1998). Los dilutores que mantuvieron mayor número de espermatozoides vivos, en orden de importancia, fueron: tris tamponado 70%; Triladyl 65%; yema de huevo, glucosa y citrato 8% (Vaughan et al., 2003).

Una de las investigaciones reporta que utilizó citrato sódico, yema de huevo, glucosa, penicilina, sulfato de estreptomicina para diluir semen de llama (Aller et al., 2003).

1.9. Diluyentes más usados para congelar semen de alpaca.

Los diluyentes para congelar semen deberán tener propiedades similares a los diluyentes que se utilizan para el semen fresco; es decir, deben estar tamponados contra los cambios de pH y tonicidad y contener una fuente de energía. Además, debe contener una sustancia para proteger la membrana celular durante el enfriamiento a 5 °C (yema de huevo) y un agente crioprotector (glicerol) para evitar lesiones de la membrana durante la congelación (Evans et al., 1990).

El diluyente debe contener sustrato metabólico, generalmente sin azúcar, concentración apropiada de electrolitos para proteger a los espermatozoides de los cambios de pH y presión osmótica. También debe tener componentes con alto pH para proteger a las células espermáticas de los efectos nocivos del frío. Las células en ausencia de sustancias crioprotectores sufren el llamado choque de frío, estas se rompen y mueren porque durante la congelación se forman en su interior cristales de hielo y porque se lesiona su membrana, permitiendo la salida de potasio, ATP, lipoproteínas, enzimas y otros constituyentes. La glicerina es una medida de precaución para que tal proceso no ocurra. Como amortiguadores para evitar que baje demasiado el pH como consecuencia del propio metabolismo de los espermatozoides, se emplea el citrato, fosfato y tris. La presión osmótica se mantiene mediante la presencia de azúcares para evitar la ruptura de las células. También son necesarios los antibióticos para controlar el crecimiento de bacterias y micoplasmas (Evans et al., 1990).

1.9.1. Tris – yema de huevo.

La cual tiene entre sus ingredientes Tris (Hidroximetil amino metano), ácido cítrico y fructosa los cuales son preparados en agua bidestilada completando la mezcla con yema de huevo de gallina en diferentes proporciones (Aisen et al., 2002).

El dilutor a base de yema de huevo es uno de los más usados por su excelente capacidad de conservación espermática, gracias a sus componentes crioprotectores, nutritivos, tamponantes y antimicrobianos (Evans et al., 1990).

Por otra parte, la yema de huevo al 20% tiene una adecuada capacidad amortiguadora para mantener el pH neutro, evitando la acidificación del medio y por tanto la mortalidad espermática (Evans et al., 1990).

La yema de huevo, debido a su acción protectora sobre los espermatozoides, aumenta el metabolismo de la glucosa de manera que los espermatozoides ahorran fructosa y tienen mayor energía durante su conservación (Pérez F., 1985). Los fosfolípidos de la yema de huevo protegen al espermatozoide contra el shock por frío (Pérez F., 1985).

1.9.2. Dilutor a base de TES.

Lleva una proporción mayor de Tes acompañado de Tris, citrato de sodio y una proporción de aproximadamente 20% de yema de huevo, todo se prepara con agua ultra pura (Rodríguez, 2009).

1.9.3. Dilutor a base de leche.

Lleva como componente principal leche descremada con una proporción pequeña de yema de huevo de gallina y como fuente energética fructosa u otro azúcar (Santiani et al., 2005).

La fructosa es necesaria para la supervivencia de los espermatozoides en condiciones anaeróbicas y está relacionada con la motilidad inicial de los espermatozoides, la leche descremada es considerada como otro componente de los dilutores para la refrigeración del semen, ya que su contenido proteico actúa como buffer del pH y puede proteger parcialmente los espermatozoides durante la reducción de la temperatura para su conservación (Pérez F., 1985).

Otros dilutores probados en semen de alpaca colectado por vagina artificial son el PBS, BSA y dilutores comerciales para rumiantes y camélidos europeos (Wabersky y col., 1989). Además llevan antibióticos y crioprotectores según la finalidad de dilución.

1.10. Agentes antibacteriales.

Se busca evitar la variación de pH por la flora que contiene el semen. En 1949, se introduce el uso de antimicrobianos (Penicilina) como forma de controlar o disminuir la carga bacteriana presente en el semen (Fernández R., 2007). Se emplea 500 a 1000 UI de penicilina por mililitro de dilutor y 500 a 1000 µg de estreptomicina por mililitro de dilutor (Pérez F., 1985). La penicilina contra microorganismos gram positivos y la estreptomicina contra gram negativos (Sumano y Ocampo. 1997).

Los antibióticos son requeridos por ley para ser añadidos al dilutor. La Directiva 88/407 de la Unión Europea especifica 500 µg de estreptomicina, 500 UI de penicilina, 150 µg de lincomicina y 300 µg de espectinomicina por ml o una combinación alternativa de antibióticos con un efecto equivalente contra *Campylobacter*, las leptospiras y los micoplasmas (Pérez F., 1985).

1.11. Diluyentes comerciales.

Los diluyentes comerciales importados (AndroMed®, Triladyl®, etc.) tienen un elevado precio lo cual puede limitar el congelamiento de semen a baja escala; sin embargo, su uso se justifica ya que cuenta con ingredientes de alta calidad, comparados a los elaborados en forma casera; los cuales pueden tener fallas en su elaboración y calidad de ingredientes a pesar de su bajo costo (Santillana y García., 2001).

1.11.1. Andromed®.

AndroMed® es un diluyente libre de yema de huevo, desarrollado para la preparación, tanto de semen fresco como de semen bovino congelado. No contiene ingredientes de origen animal y no presenta riesgo de contaminación microbiológica (AndroMed® 2015).

Produce altas tasas de fertilidad. Es muy fácil de preparar, además sus costos son bajos. Los ensayos para probar las tasas de fertilidad de semen tratado con AndroMed® han producido resultados excelentes. Las ventajas de este medio, libre de yema de huevo, incluyen el fácil manejo, la calidad estandarizada y la seguridad microbiológica. No existen más inmuno-reacciones. Además, la composición químicamente estandarizada de este diluyente lo hace más adecuado para procedimientos de control de calidad y muy atractivo como medio básico para investigación biotecnológica (AndroMed®, 2015).

AndroMed® también permite certificar partidas de semen para la exportación a países que no permitan la importación de medios que no contienen yemas de huevo (AndroMed®, 2015).

La alta calidad de AndroMed® ha sido demostrada en extensos ensayos bajo condiciones controladas, como igualmente en muchos centros de inseminación artificial que han incorporado el uso de este diluyente (Muller F., 2001).

Cuadro 1.2. Comparación de criterios de calidad en diluyentes de semen.

Factor	Crioprotector convencional (con yema de huevo)	Nueva generación de crioprotectores (sin yema de huevo)
Estándar de calidad	-	+
Certificación de partidas	-	+
Contaminación bacteriana	Posible	-
Progesterona, Hidroxy-progesterona, Pregnenolona	+	-
Manejo	-	+
Evaluación microscópica	+/-	+
Evaluación asistida computacionalmente	+/-	+
Utilidad como medio para semen fresco	+/-	+
Utilidad como Crioprotector	+	+

Fuente: (Muller F., 2005).

1.11.1.1. Protocolos de producción eficiente.

La preparación es simple: se requiere añadir 800 ml de agua destilada al contenido de 200 ml de un frasco de AndroMed®. La microscopía es más eficiente donde AndroMed® es un medio altamente transparente que entrega imágenes de semen extremadamente claras bajo el microscopio. Los eyaculados de calidad cuestionable pueden ser detectados y evaluados fácilmente, en base a un estándar de selección definido (AndroMed®, 2015).

1.11.1.2. Amplio rango de aplicación.

AndroMed® también es apropiado para la preservación de semen fresco a +5°C hasta +10°C. En la investigación celular, AndroMed® es recomendable cuando se utilizan los espermatozoides como modelo, debido a que su composición estandarizada lo hace apto para el análisis computacionalmente asistido (CASA – computer-assisted semen analysis) de semen (AndroMed®, 2015).

1.11.1.3. Composición.

AndroMed® contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de CE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina) (AndroMed®, 2015).

1.11.1.4. Estándar de producción y control de calidad.

Todas las materias primas utilizadas en la producción de AndroMed® son producidas según normas GMP y DIN ISO 9001:2000 y certificadas según estándares Ph Eur, BP o USP. Ellas son sometidas a pruebas de calidad basadas en

las directrices para sustancias farmacéuticas, cumpliendo todos sus requerimientos. Los componentes individuales de cada partida de diluyente son controlados química y físicamente y también en cuanto a su aptitud para la conservación de semen, en laboratorios independientes bajo la supervisión de veterinarios especializados. Los certificados de análisis y los protocolos de las pruebas garantizan un rastreo completo. Es posible obtener un certificado general de calidad, como también certificados de partidas individuales (AndroMed®, 2015).

La congelación de pajuelas se efectúa sobre rampas en vapor de Nitrógeno, a una altura de 4 cm sobre el nivel del Nitrógeno líquido, o en un congelador de semen profesional con una temperatura inicial de -120°C (AndroMed®, 2015).

El proceso de congelación en un congelador automático debiera extenderse por al menos 7 minutos con mini-pajuelas (0,25 ml) y 10 minutos con pajuelas medianas (0,5 ml) (AndroMed®, 2015).

1.11.2. Triladyl®.

Medio de conservación para la congelación de semen bovino (Triladyl®, 2015).

1.11.2.1. Estándar de la industrial internacional.

Desde su lanzamiento al mercado en el año 1974, este diluyente se ha establecido como un medio clásico para la producción de semen bovino. Con Triladyl® también se ha podido congelar una serie de eyaculados de otros mamíferos, como ovinos, caprinos, camélidos y caninos, como igualmente de diversas especies exóticas (Triladyl®, 2015).

1.11.2.2. Aplicación eficiente.

La tasa de dilución para los eyaculados permite un amplio rango de variación, sin comprometer los resultados de fertilidad. Triladyl® se utiliza con buenos resultados en diluciones con baja concentración espermática (menos de 10 millones de espermios/dosis) como también para la dilución de eyaculados con baja concentración celular (Triladyl®, 2015).

1.11.2.3. Composición.

Triladyl® es un buffer que contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, glicerina, agua purísima y antibióticos, de acuerdo a la Directiva 88/407 de la UE (Tilosina, Gentamicina, Espectinomycin, Lincomicina). Triladyl® CSS no contiene antibióticos. Sin embargo, se dispone de un Cocktail de antibióticos en polvo (Art. N° 13500/0005), adecuado para el procesamiento de semen en dilución de 1 paso, de acuerdo a la norma CSS (Triladyl®, 2015).

1.11.2.4. Recomendaciones para la aplicación.

Colección de semen: Al momento de la colección, la temperatura interna de la vagina artificial no debe superar los +43° C, para evitar daños celulares producidos por temperatura excesiva (Triladyl®, 2015).

Preparación del diluyente final: El diluyente listo para su uso se compone de una parte de Concentrado de Triladyl®, tres partes de agua de alta pureza y una parte de yema de huevo, de modo que el diluyente contiene 20% de yema de huevo (Triladyl®, 2015). Se comienza la preparación vaciando un frasco completo de Concentrado de Triladyl® en una probeta graduada, agregándole 750 ml de agua de

alta pureza. Esta solución madre es estable y puede conservarse a temperatura de +5° C por hasta una semana (Triladyl®, 2015).

A continuación se separa completamente la yema de huevo fresca de la clara de huevo y de sus membranas y se pesan 250 g en una balanza (Triladyl®, 2015).

La solución madre es luego agregada en varios pasos a la yema de huevo, mezclándola cuidadosamente. Para el desarrollo completo de las cualidades de conservación del Triladyl®, debe cuidarse de que la solución madre sea adicionada a la yema de huevo y no en sentido contrario. El diluyente es filtrado a continuación por un filtro de diluyente estéril o una compresa de gasa estéril (Triladyl®, 2015).

Pre dilución y dilución del semen: Después de la colección, el eyaculado es puesto en una baño-maría a +28°C hasta +32° C. Tras el examen macroscópico y la evaluación al microscopio, el eyaculado es pre diluido dentro de su vaso de colección en proporción 1:1, vertiendo lentamente el diluyente a lo largo de la pared del vaso. Una vez calculado el volumen total del diluyente, el semen pre diluido es vertido a lo largo de la pared interna a un envase temperado de mayor tamaño, previamente enjuagado con diluyente (Triladyl®, 2015).

A continuación se adiciona el volumen de diluyente faltante al semen pre diluido, agitando suavemente el envase para favorecer la dispersión homogénea del semen en el diluyente. En lugar de efectuar las diluciones en probetas graduadas, es preferible el uso de una balanza electrónica o del sistema de dosificación “Smart Dispenser” (Triladyl®, 2015).

El semen, el diluyente y los envases de vidrio deben estar siempre a igual temperatura que el semen, para evitar un shock térmico de las células espermáticas.

El semen pre diluido puede retirarse del baño maría para continuar su procesamiento a temperatura ambiente. El envasado se efectúa a temperatura ambiente (Triladyl®, 2015).

Cuadro1.3. Componentes de los diluyentes AndroMed® y Triladyl®.

ANDROMED®	TRILADYL®
Agua bidestilada	Agua bidestilada
Fructosa	Fructosa
Glicerol	Glicerol
Ácido cítrico	Ácido cítrico
Buffers	Tris
Fosfolípidos (Lecitina de soja)	Fosfolípidos (Lecitina de yema de huevo)
Espectinomicina	Espectinomicina
Lincomicina	Lincomicina
Tilosina	Tilosina
Gentamicina	Gentamicina

Fuente: Minitube, 2015.

1.12. Principios generales de la criopreservación de semen

La preservación del semen en diversas especies es un importante campo de investigación, tanto para facilitar las posibilidades de reproducción de diversos individuos y así salvaguardar las características genéticas encaminadas a la mejora de las especies, como para la conservación de muchas especies y razas que están en extinción o cuentan con pocos ejemplares (Polge et al., 1949).

El proceso de refrigeración forma parte del proceso de congelación del semen; sin embargo, también puede utilizarse como método de conservación a corto plazo para lo que necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes

específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura, como la yema de huevo (Polge et al., 1949).

A diferencia de la refrigeración del semen, el proceso de congelación necesita también del empleo de un agente crioprotector que permita un descenso mayor de la temperatura. Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector efectivo (Polge et al., 1949).

En el establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de una variedad de especies se congela y utiliza con éxito en la inseminación artificial. Sin embargo y con excepción de los bóvidos, la utilización generalizada de semen congelado no se ha extendido en las otras especies domésticas. En parte porque los protocolos de congelación no proporcionan resultados aceptables de fertilidad (Parks y Graham, 1992).

La reducción de la temperatura por debajo de los 37°C y, principalmente, de los 20°C induce una serie de alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Amann y Pickett, 1987).

El mayor desafío para las células en el proceso de congelación no es resistir a las bajas temperaturas del nitrógeno líquido, sino mantener la viabilidad en un rango de temperaturas, entre los -15 y -60°C, que las células experimentan por dos ocasiones, es decir, durante la congelación y durante la descongelación. A -196°C no se producen reacciones térmicas, puesto que debajo de los -130°C no existe agua en el estado líquido (Mazur, 1984).

1.13. Crioprotectores.

El crioprotector debe preservar, en la mayor proporción posible, la integridad de las diferentes estructuras del espermatozoide (Watson, 1995), su utilización es indispensable para minimizar los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Gao et al., 1995), asimismo en la descongelación, proporcionando protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras celulares y extracelulares y en la composición química (Fahy et al., 1990).

Según su capacidad para atravesar la membrana se habla de penetrantes como glicerol, DMSO, etilenglicol y no-penetrantes como la yema de huevo, leche y determinados azúcares disacáridos como trehalosa y sucrosa (Hammerstedt et al., 1990), los cuales pueden proporcionar estabilidad de la membrana debido a su capacidad para asociarse a las membranas más fuertemente que un crioprotector permeable pudiendo causar remoción parcial del agua del espermatozoide, y así reducir la posibilidad de formación de hielo intracelular (Anchordoguy et al., 1987).

1.13.1. Yema de huevo.

La yema de huevo es un componente básico presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación por sus características protectoras contra el frío desde los primeros trabajos de congelación (Phillips y Lardy, 1940).

La yema de huevo contribuye beneficiosamente de dos maneras distintas en la criopreservación (Kampschmidt et al., 1953).

Por resistencia la porción lipídica constituida por los fosfolípidos, lecitina y cefalina, es efectiva en la protección contra el choque térmico; la lecitina es el principal fosfolípido protector y, por conservación consigue la supervivencia del espermatozoide (Blackshaw, 1954).

Además las lipoproteínas de baja densidad son los componentes de la yema que consiguen el efecto crioprotector, evitando el choque térmico y preservando la integridad de la membrana (Graham y Foote, 1987).

1.14. Dilución de semen.

La respuesta de los espermatozoides a los procesos de congelación-descongelación varía entre las especies, e incluso entre individuos dentro de una misma especie. Esto parece ser debido a diferencias en la composición de las membranas, lo cual determina requerimientos específicos entre especies en la composición de los diluyentes (Garden J., 1992).

La dilución del semen se realiza por razones técnicas y biológicas. La primera para incrementar el volumen de eyaculado e inseminar un gran número de hembras (uso intensivo del padre) y la segunda para proporcionar nutrientes, un sistema amortiguador a los cambios de pH y un ambiente isotónico a las células espermáticas. Además, protegen a los espermatozoides del shock por frío y contra las injurias de la congelación (Evans y Maxwell, 1990).

1.15. Actualidad de la congelación de semen de alpacas.

Los reportes sobre semen congelado son muy escasos a comparación con otras especies; pero la alpaca ha recibido una atención cada vez más creciente para la aplicación de biotecnologías reproductivas, pero pocos son los centros de

investigación que se ocupan del desarrollo de este aspecto de la investigación en el Perú. Hoy en día se sigue buscando las formas de elevar los parámetros seminales pos descongelación, como el problema de la viscosidad seminal que ha posibilitado la utilización de numerosos protocolos que parcialmente han dado resultados alentadores. Lamentablemente los trabajos que involucran mayores tecnologías en criopreservación se hacen en centros de investigación del extranjero con animales criados en sus respectivos países y el acceso a este conocimiento es dificultoso.

Aun así han surgido investigadores jóvenes que han visto una gran oportunidad en este campo de la de la biotecnología reproductiva.

Los fines de la congelación de semen de alpacas, hoy en día, no solamente se encaminan a su aplicación en inseminación artificial, sino en biotecnologías diversas y complementarias como su utilización en FIV, ICSI, vitrificación y transferencia de embriones. El semen congelado ofrece distintas posibilidades para el avance tecnológico en la explotación de los camélidos sudamericanos y brindaría una mayor rapidez al progreso genético en esta especie.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Localización.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Reproducción Asistida de la Estación Experimental Agraria Canaán, ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray de la provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho a una altitud de 2735 m.s.n.m. a 13°10'09'' latitud sur y 74°11'53'' longitud oeste, con una temperatura promedio de 12 - 18 °C, precipitación pluvial promedio de 500 mm y humedad relativa de 40 – 50 % (SENAMHI, 2013).

2.2. Duración.

El trabajo de investigación tuvo una parte pre-experimental (febrero-marzo) y una experimental que tuvo una duración de 3 meses (abril-junio). Se realizó en el laboratorio de Reproducción Asistida de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA-Ayacucho.

2.3. Muestra.

Para el presente estudio se utilizaron 100 testículos provenientes de 50 alpacas machos mayores a 2 años de edad.

2.4. Materiales.

2.4.1. De laboratorio

- ✓ alcohol polivinílico
- ✓ 100 pajillas francesas de 0.5 cc
- ✓ 01 Caja de Guantes de Látex.
- ✓ 01 Pipetas automáticas de 0-10, 10-20, 20-100 y hasta 1000 microlitros (ul).
- ✓ 50 tubos Falcón de 15 ml.
- ✓ 01 Placas Petri pequeña, mediana y grande.
- ✓ 01 Caja de jeringas desechables de 1, 5, 10, 15 y 20 ml.
- ✓ 01 Caja de pipetas estériles de 5 y 10 ml.
- ✓ Agujas 21 G x 1 y 1/2", 18 G x 1 y 1/2".
- ✓ Cámara de Neubauer.
- ✓ Láminas cubreobjetos y portaobjetos.
- ✓ Tips para micropipeta de diferentes capacidades.

2.4.2. Equipos

- ✓ Balanza analítica.
- ✓ Equipo de Baño María.
- ✓ Esterilizador de calor húmedo (autoclave).
- ✓ Estufa.
- ✓ Microscopio.

- ✓ Platinas térmicas.
- ✓ Refrigerador.
- ✓ Tanque criogénico de nitrógeno líquido de 33 litros.
- ✓ Termocupla o termómetro de lecturas bajo cero.
- ✓ Termómetro digital.

2.4.3. De Campo.

- ✓ Libretas de apuntes.
- ✓ 01 Equipo de disección.
- ✓ 01 Mameluco.
- ✓ 01 par de Botas de jebe.

2.4.4. Material biológico.

- ✓ Testículos de alpacas obtenidos en el camal Pilpichaca.
- ✓ Huevo fresco de gallina

2.4.5. Dilutores o extensores.

- ✓ Dilutor AndroMed®.
- ✓ Dilutor Triladyl®.
- ✓ Dilutor en Base tris (preparado con yema de huevo).

2.4.6. Otros.

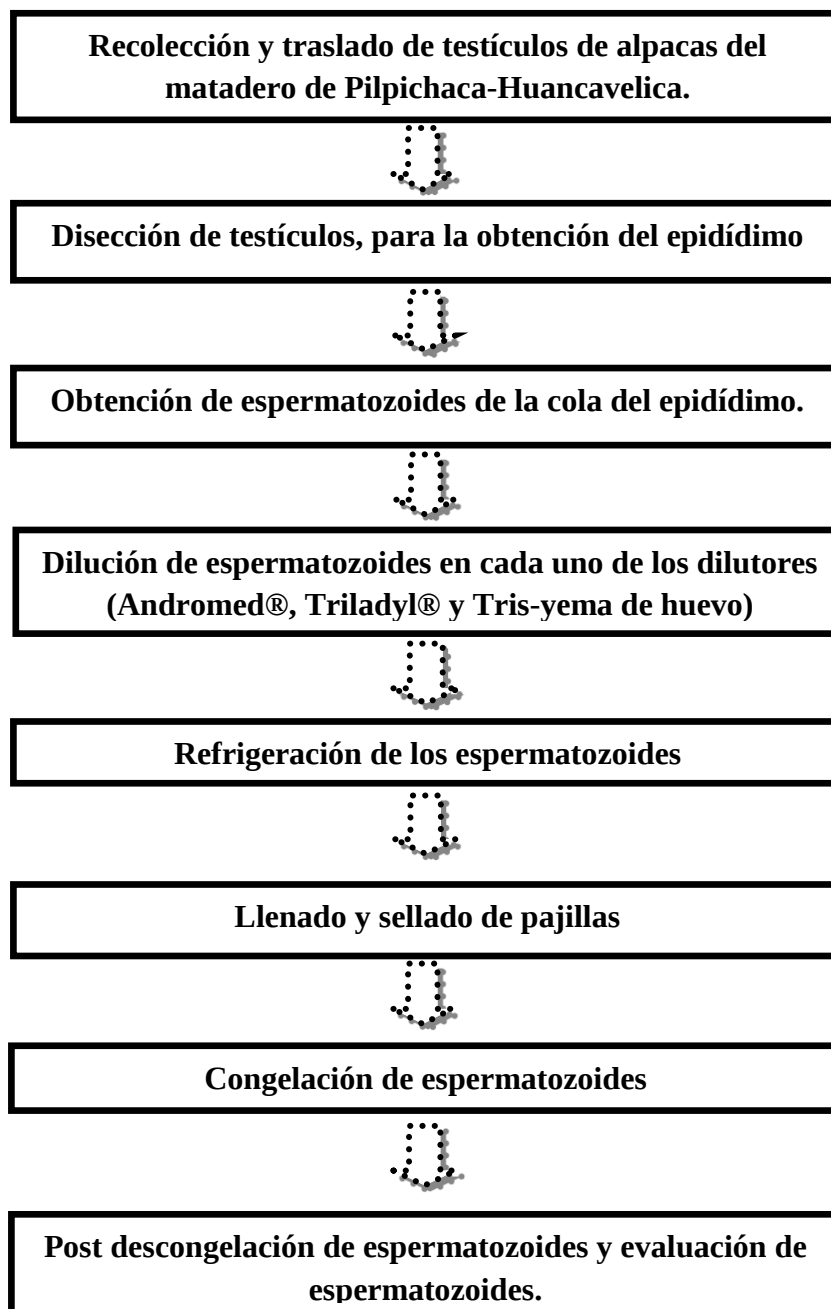
- ✓ 01 Guardapolvo blanco
- ✓ 01 Cámara digital.
- ✓ 01 paquete de gorras descartable.
- ✓ 01 caja de mascarilla quirúrgica.

- ✓ 01 Caja de Hojas de Bisturí N°21
- ✓ 03 Litros Nitrógeno líquido
- ✓ 04 Rollos de papel toalla absorbente.
- ✓ Hervidora eléctrica.
- ✓ 01 de bolsas plásticas.

2.5. Metodología.

2.5.1. **Procedimiento experimental:** se realizó como muestra la figura N° 2.1.

Figura N° 2.1. Flujo de congelación de espermatozoides del epidídimo de alpacas.



Fuente: Elaboración Propia

2.5.1.1. Preparación de dilutores y materiales de laboratorio.

La preparación de dilutores antes del viaje al matadero de Pilpichaca-Huancavelica fue de la siguiente manera:

a. Andromed®.- Es un dilutor libre de yema de huevo indicado para procesamiento seminal de rumiantes, especialmente bovinos (Minitube, 2015). AndroMed® contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, espectinomicina, lincomicina). Para lograr las propiedades óptimas de conservación de AndroMed®, la cantidad requerida de agua debe agregarse al concentrado y no viceversa. El diluyente preparado AndroMed® debe temperarse antes de su uso en un baño-maría entre +30 °C y +32 °C

- **Preparación del diluyente final:** El contenido (200 ml) de un frasco de AndroMed® debe diluirse con 800 ml de agua destilada estéril previamente temperada a +30°C hasta +35°C. Es posible preparar volúmenes menores, siempre que se mantenga la proporción de 4 partes de agua con 1 parte de concentrado.

- En un tubo falcón de 15 ml se añadió 4ml de agua de transferencia o bidestilada, inmediatamente a esta se le agrega 1ml de dilutor AndroMed® luego se hizo un movimiento ligero para homogenizar.

b. Triladyl®.- Medio de conservación para la congelación de semen bovino. es un buffer que contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar, glicerina, agua purísima y antibióticos, de acuerdo a la Directiva 88/407 de la UE (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina). Triladyl® CSS no contiene antibióticos. Sin embargo, se dispone de un Cocktail de antibióticos en polvo (Art. N° 13500/0005),

adecuado para el procesamiento de semen en dilución de 1 paso, de acuerdo a la norma CSS.

- **Preparación del diluyente final:** El diluyente listo para su uso se compone de una parte de Concentrado de Triladyl®, tres partes de agua de alta pureza y una parte de yema de huevo, de modo que el diluyente contiene 20% de yema de huevo. 750 ml de agua bidestilada, 250ml de Triladyl® y 250g de yema de gallina.

- Resumidamente en un tubo falcón de 15 ml se puso 7.5 ml de agua bidestilada más 2.5 ml de Triladyl® y finalmente 2.5 ml de yema de huevo de gallina fresca. Luego se mezcló cuidadosamente y se calentó a un estado de 30 °C. finalmente se filtró el medio gracias a filtros especiales de transferencia.

c. Tris Base-yema de huevo.- La cual tiene entre sus ingredientes Tris (Hidroximetil amino metano), ácido cítrico y fructosa los cuales son preparados en agua bidestilada completando la mezcla con yema de huevo de gallina en diferentes proporciones (Aisen y col., 2002). El dilutor a base de yema de huevo es uno de los más usados por su excelente capacidad de conservación espermática, gracias a sus componentes crioprotectores, nutritivos, tamponantes y antimicrobianos.

- En un tubo falcón de 15 ml se puso 0.36 de Tris Base, 0.19gr de Ácido cítrico, 0.05gr de fructuosa, 8.5 ml de agua bidestilada o transferencia, 1.5 ml de yema de huevo fresco de gallina y 0.1 ml de antibiótico Gentamicina.

2.5.1.2. Recolección y traslado de testículos de alpacas del matadero de Pilpichaca-Huancavelica.

Se consideró machos mayores de 2 años, una vez que las alpacas fueron beneficiados y desangrados se procedió a la extracción, para lo cual se utilizó un bisturí se cortó a nivel del escroto luego se divulsionó hasta exponer los dos testículos. Luego se cortó

el cordón espermático y se obtuvo los testículos. Finalmente los testículos fueron envueltos con papel toalla puestos por pares en una caja de polietileno. Para su posterior traslado hasta la ciudad de huamanga, al laboratorio de biotecnología reproductiva INIA Ayacucho.

2.5.1.3. Disección de testículos para la obtención del epidídimo.

Antes de empezar con este procedimiento se preparó los materiales necesarios para su realización.

La disección de testículos se realizó en el laboratorio de biotecnología reproductiva. Primeramente, se sacó de la caja aislante todo los testículos los cuales fueron limpiados en pares respectivos, cada par corresponde a un macho. Luego con una hoja de bisturí se hizo un corte de la túnica vaginal en la parte del cuerpo y de esta manera se obtuvo la cola del epidídimo.

En la mesa de trabajo se colocó una platina térmica graduada para que llegue a los 38°C, inmediatamente se puso las microplacas de Petri rotuladas respectivamente.

Es aquí donde los Dilutores se sacaron de la refrigeradora y se pusieron en el baño maría hasta llegar a 37 °C.

2.5.1.4. Obtención de espermatozoides de la cola del epidídimo.

Con una hoja de bisturí se hizo cortes longitudinales a nivel de la cola del epidídimo, donde se encuentra la mayor concentración de espermatozoides viables, de esta manera se obtuvieron los espermatozoides. Luego se prendió el microscopio. Posteriormente se añadió con una micropipeta de 1000 ul los dilutores que estaban atemperados en el baño maría, 2ml de Andromed en una microplaca, 2ml de Triladyl

en otro y 2 ml de Tris preparado con yema de huevo de gallina en otra microplaca rotulado. Se repite dependiendo de la muestra.

2.5.1.5. Dilución de espermatozoides en cada uno de los Dilutores.

La dilución se realizó de la siguiente manera.

La cola del epidídimo que estaba cortados longitudinalmente se sumergió 2 veces en las microplacas que contenían dilutor primero en Andromed, Triladyl y Base Tris con yema de huevo. Luego con un suave movimiento se homogenizó y se colocó en la platina térmica a temperatura 37 °C.

2.5.1.6. Evaluación microscópica antes del refrigerado.

2.5.1.6.1. Análisis microscópico.

Motilidad. Se colocó con una micropipeta 0.5 ul de la dilución sobre una lámina portaobjetos que se encontraba en una platina atemperado y se observó en el microscopio a un aumento de 100 y 400x.

Porcentaje de vivos (vitalidad).

Se tomó 0.5 ul de la dilución y 0.5ul de solución acuosa de tinción de eosina 5% y nigrosina 10% precalentada a 37 °C, se mezcló sobre una lámina portaobjetos atemperada y se realizó un frotis el cual se dejó secar por 1 minuto y se observó al microscopio a un aumento de 100x, 400X se contó vivos y muertos. Se hizo con un aumento mayor para observar espermatozoides muertos de color rojo violeta y los vivos que se observan transparentes con la cabeza brillante.

Con una micropipeta de 1000 ul se deposita en tubos Ependorf rotulados la dilución sobrante. Luego de depositar toda la dilución en los tubos Ependorf se deja por 10 minutos a temperatura ambiente para que de esta manera la temperatura del dilutor

con los espermatozoides desciende gradualmente, ya que si se procede a refrigerar inmediatamente ocasionaría un shock térmico, conllevando a la muerte de los espermatozoides. Finalmente se llevaron a refrigeración a unos 5°C por un periodo de 12 a 16 horas para el análisis del día siguiente.

Concentración.

Con una micropipeta de 100 microlitros se aspiró 95 microlitros agua y se depositó en un tubo de microcentrífuga seguidamente se aspiró con otra micropipeta de 10 microlitros, 5 microlitros de la dilución de los tubos Ependorf y se mezclan para dispersar uniformemente los espermatozoides.

Se llenó el preparado en la cámara de Neubauer en ambos campos con la misma muestra en el cual se hizo el conteo una vez los espermatozoides hubieran reposado por 5 minutos.

La concentración se calculó según la siguiente fórmula (Mellisho, 2010):

$$C=NxD\times 10\,000$$

Donde:

C: Se determina en millones por ml.

N: Promedio de espermatozoides contados de 5 campos pequeños en ambas cámaras.

D: Grado de dilución 0.1 ml de espermatozoides en 0.9 ml de suero fisiológico = 10.

2.5.1.7. Refrigeración de los espermatozoides.

La dilución fue depositada en tubos Ependorf, colocados ordenadamente en gradillas de tecnoport. Seguidamente se procedió atemperar la mezcla a temperatura ambiente laboratorial (hasta 22 °C aproximadamente) por espacio de 10 minutos, tratando de mantenerse en un parámetro de descenso de temperatura óptima de 0.5 a 0.6

°C/minuto para evitar el shock térmico. Luego se llevaron a refrigeración a 5°C por 14 a 16 horas.

2.5.1.8. Llenado y sellado de pajillas.

Para el llenado de las pajillas de 0.50, con los espermatozoides diluidos, fue mediante succión hasta el punto límite de la pajilla. Después de succionar se sacude y se expulsa unas gotas para el llenado exacto. Luego se sella con alcohol polivinílico. Finalmente se rotuló con los respectivos tratamientos y se colocan en un envase conteniendo agua helada. Luego se llevan a congelación.

2.5.1.9. Congelación de espermatozoides

Los espermatozoides envasados se congelaron por la acción del frío dentro del tanque criogénico (Mendoza, 2015), temperatura más baja cuanto más próximo al nitrógeno líquido.

Las pajillas llenadas que estaban dentro de la cubeta con hielo a 5 °C fueron sacados uno por uno, luego secados perfectamente antes de ser colocados en una canastilla adaptada y enfriada. Luego la tapa se cerró con cinta maskingtape para evitar la flotación de las pajillas con los espermatozoides en el nitrógeno, al momento de la inmersión final de la canastilla.

Para facilitar la lectura de las inmersiones se utilizó una regla graduada en centímetros en el extremo superior.

Las pajillas colocados y tapados en la canastilla modificada se bajaron por tres tiempos a razón de 3 cm cada 5 minutos hasta su completa inmersión. Esto para completar el proceso de congelación a -196 °C.

Vale decir que la canastilla se colocó a una altura de 10 centímetros sobre el nitrógeno líquido al principio del proceso de congelación.

Los tres tratamientos se congelaron simultáneamente utilizando la misma canastilla. Con este procedimiento de congelación de fácil aplicación se hizo descender la temperatura de manera gradual aunque no en parámetros estrictamente medidos y estandarizados.

2.5.1.10. Descongelación y evaluación de espermatozoides.

En un primer momento los espermatozoides refrigerados a temperatura de 5 °C se evaluaron en su motilidad antes de ser congelado mediante observación microscópica a 100 y 400x, con una micropipeta, se sacó de los tubos viales 0.5 microlitros y se colocó sobre una lámina porta objetos y se observó al microscopio para evaluar la motilidad correspondiente. Esto con la finalidad de congelar muestras con altos porcentajes de motilidad.

Igualmente la evaluación post descongelación de la motilidad se hizo tomando cada pajilla congelado de cada tratamiento pocos minutos después y sumergiéndolo en un termo conteniendo agua caliente a 38 °C por espacio de un minuto aproximadamente. Se tomó algunas gotas las cuales se colocaron en una laminilla precalentada y se evaluó a aumentos de 100 y 400x.

2.6. Diseño estadístico:

Se utilizó estadígrafos de tendencia central (promedio) y de dispersión (desviación estándar, coeficiente de variabilidad, máximos y mínimos), a la vez los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANVA) partiendo de un Diseño Completamente al azar (DCA) cuyo modelo aditivo lineal (Kaps and Lamberson, 2004) es la siguiente.

$$y_{ij} = u + D_i + e_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = Es la variable respuesta (motilidad y vitalidad).

u = Es la media general o constante común.

D_i = Es el efecto del factor dilutor.

e_{ij} = Es el error experimental o efecto ambiental no controlable del

Para la comparación de medias en caso se encontrase diferencia significativa al ANVA se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

Los datos se han procesado con el programa estadístico SAS® (SAS 9.2, Institute. Inc., Cary, NC, USA) y se han tabulado los cuadros utilizando Software Microsoft Excel.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Motilidad de espermatozoides epididimarios pre-refrigeración en alpacas (*Vicugna pacos*).

La colección de testículos y epidídimos representan la etapa inicial de este proceso, se colectaron de machos de diferentes edades y condiciones fisiológicas, los cuales fueron obtenidos del matadero Municipal de Pilpichaca, Provincia de Huaytará, Departamento de Huancavelica, una vez en el laboratorio se hizo cortes longitudinales y fueron sumergidos en los tres Crioprotectores (Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris). Se evaluó la motilidad con cada crioprotector como se muestra en el cuadro N° 3.1

Cuadro N° 3.1. Motilidad de espermatozoides epididimarios pre-refrigeración en alpacas.

TRATAMIENTO	N	PROMEDIO±DS	CV (%)	MINIMO	MÁXIMO
ANDROMED [®]	17	27±8.85 ^a	32.7	15	45
TRILADYL [®]	17	24.7±7.17 ^a	29.4	15	40
BASE TRIS	16	16.88±4.43 ^b	26.22	10	25

^{a,b} Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ($p \geq 0.05$), prueba tukey.

El cuadro N° 3.1 muestra los resultados de la motilidad de espermatozoides epididimarios pre refrigeración en alpacas, procesadas con los tratamientos Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris, en los cuales se obtuvo en promedio $27 \pm 8.85\%$, $24.7 \pm 7.17\%$ y $16.88 \pm 4.43\%$ y coeficientes de variabilidad de 32.7%, 29.4% y 26.22% respectivamente.

Se puede apreciar que existe una diferencia significativa entre la utilización de los tratamientos Andromed[®], Triladyl[®], sobre el tratamiento en Base Tris, estas debidas fundamentalmente a su composición de cada uno de estos dilutores.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación son inferiores a los reportados por Ordoñez y col. (2015), quienes reportan una motilidad inicial de 57.96%, 57.96% y 57.96% de espermatozoides en semen fresco de alpacas para dilutores Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris. Esta diferencia se debe a que las muestras de espermatozoides fueron obtenidas directamente del lugar donde se almacenan de la cola del epidídimo.

Los resultados obtenidos son inferiores a lo reportado por Choez K. y col; (2014), quienes reportaron una motilidad inicial de $56 \pm 14.03\%$ y utilizaron como dilutor leche descremada-yema de huevo y fructuosa para la recuperación y dilución de los espermatozoides epididimarios. Esta diferencia se debería al proceso de transporte de las muestras, dado que las muestras obtenidas en el presente estudio fueron transportadas solamente en papel toalla y a una temperatura de 5°C.

3.2. Motilidad de espermatozoides epididimarios post refrigeración en alpacas (*Vicugna pacos*).

La refrigeración de espermatozoides obtenidos de epidídimos fue por un tiempo de 12-16 horas obteniéndose los resultados que se muestran en el Cuadro N° 3.2.

Cuadro N° 3.2. Motilidad de espermatozoides epididimarios post refrigeración en alpacas.

TRATAMIENTO	N	PROMEDIO±DS	C.V (%)	MINIMO	MÁXIMO
ANDROMED [®]	17	51.47±12.22 ^a	23.74	30	75
TRYLADIL [®]	17	43.23±10.30 ^{a,b}	23.82	30	60
BASE TRIS	16	39.38 ±7.72 ^b	19.60	25	50

^a Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ($p \geq 0.05$), prueba tukey

El cuadro N° 3.2 muestra los resultados de la motilidad de espermatozoides epididimarios post refrigeración en alpacas, procesadas con los tratamientos Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris, en los cuales se obtuvo en promedio 51.47±12.22%, 43.23±10.30% y 39.38±7.72% y coeficientes de variabilidad de 23.74%, 23.82% y 19.60% respectivamente.

Se puede apreciar que no existe una diferencia significativa entre la utilización de los tratamientos Andromed[®] y Triladyl[®], tampoco entre el tratamiento Triladyl[®] y el tratamiento en Base Tris, pero si existe diferencia estadística entre el tratamiento Andromed[®] y el tratamiento Base Tris. Esta diferencia se debe a que en la refrigeración los espermatozoides captan los nutrientes necesarios de los dilutores comerciales para su adaptación y sobrevivencia, es por ello que se eleva el porcentaje de motilidad en este proceso.

Los resultados obtenidos son superiores a los reportados por Ordoñez C. y col. (2015), quienes reportan una motilidad progresiva post refrigeración de 1.91.0%, 46.94% y 43.02% de espermatozoides en semen refrigerado de alpacas en los dilutores Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris, respectivamente. Esta diferencia se debería a que en el presente trabajo de investigación las muestras de espermatozoides fueron obtenidas directamente del lugar donde se almacenan (Cola del epidídimo).

Mendoza A. (2013), reporta una motilidad post refrigeración de espermatozoides de 56.2% con el dilutor Andromed[®] en semen colectado con maniquí de alpacas. Estos resultados son semejantes a los encontrados en la investigación realizada donde se obtuvo como promedio $51.47 \pm 12.22\%$ con el tratamiento Andromed[®]. Esta semejanza se debe mayormente a que los espermatozoides reaccionan mejor con el dilutor Andromed debido a su composición.

3.3. Motilidad de espermatozoides epididimarios post descongelación en alpacas (*Vicugna pacos*).

Cuadro N° 3.3. Motilidad de espermatozoides epididimarios post descongelación en alpacas.

TRATAMIENTO	N	PROMEDIO $\pm$ DS	C.V (%)	MINIMO	MÁXIMO
ANDROMED [®]	17	22.24 $\pm$ 6.22 ^a	27.97	15	35
TRYLADIL [®]	17	16.82 $\pm$ 5.28 ^b	31.4	10	28
BASE TRIS	16	17.50 $\pm$ 4.83 ^b	27.6	10	25

^a Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ($p \geq 0.05$), prueba Tukey

El cuadro N° 3.3 muestra los resultados de la motilidad de espermatozoides epididimarios post descongelación en alpacas, procesadas con los tratamientos Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris, en los cuales se obtuvo promedios de $22.24 \pm 6.22\%$, $16.82 \pm 5.28\%$ y $17.50 \pm 4.83\%$ y coeficientes de variabilidad de 27.97%, 31.4% y 27.6% respectivamente.

Se observa que existe diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento Andromed[®] y el tratamiento Triladyl[®] ($p \geq 0.05$), así mismo existe diferencia estadística entre el tratamiento Andromed[®] y el tratamiento en Base Tris ($p \geq 0.05$), pero no hubo diferencias entre el tratamiento Triladyl[®] y Base Tris ($p \geq 0.05$).

Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Banda y Col. (2010), quienes reportaron una motilidad de $14.0 \pm 7.5\%$, $8.6 \pm 3.8\%$ y $17.0 \pm 4.3\%$ y utilizaron dilutores Tris, Tes y leche descremada. De igual manera Choez K. y col. (2014), reportaron una motilidad de $17.50 \pm 13.79\%$, $5.8 \pm 6.60\%$ y de $20.5 \pm 9.26\%$ para dilutores en base Tris con una concentración de 0.75Molar de Glicerol, Etilenglicol y DMSO respectivamente. Los resultados obtenidos se deberían a la similar composición del dilutor en base Tris utilizado en el presente trabajo y existiendo una diferencia numérica a favor de los dilutores comerciales Andromed[®], Triladyl[®].

Marino T. y Col. (2015), reportaron una motilidad pos descongelado de $31.1 \pm 8.5\%$, $8.3 \pm 6.9\%$ y de $23.9 \pm 8.3\%$, quienes utilizaron un dilutor en base Tris de leche descremada-yema de huevo y fructuosa, como crioprotectores DMSO, Etilenglicol y Glicerol a una concentración de 0.9M de respectivamente.

Estos resultados son superiores a los encontrados en la investigación realizada donde se obtuvo como promedio 17.50 ± 4.83 con el tratamiento Base Tris, esto

probablemente se debería a la concentración del crioprotector en un 7% de glicerol utilizado en la investigación y el método de congelacion y descongelación.

Ordoñez C. y col. (2015), reportaron una motilidad progresiva post descongelación de 0.00%, 15.69% y 11.08% de espermatozoides en semen descongelado de alpacas con los dilutores Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris. Esta diferencia se debe al método de obtención de las muestras, dado que Ordoñez C. y Col. (2015), colectaron semen por electro eyaculación y en la investigación las muestras fueron obtenidas directamente de la cola del epidídimo.

Laruta y Col. (2015), reportaron una motilidad espermática post descongelamiento de 17.03 % y 0.0% en semen de llamas, en este trabajo utilizaron como dilutores Base Tris-Ácido cítrico-fructuosa-yema- glicerol y Andromed[®].

Los resultados obtenidos en el siguiente trabajo de investigación muestran que hay una ligera similitud con el tratamiento Base tris donde se obtuvo como promedio $17.50 \pm 4.83\%$, pero el tratamiento con el dilutor Andromed[®] es superior mostrando un promedio de $22.24 \pm 6.22\%$ frente al 0.0% obtenido por Laruta y Col. (2015). Esta diferencia se debe al método de obtención de las muestras, donde Laruta y Col. (2015), colectaron semen por electro eyaculación y en la investigación las muestras fueron obtenidas directamente de la cola del epidídimo.

3.4. Vitalidad de espermatozoides epididimarios pre-refrigeración en alpacas (*Vicugna pacos*).

El cuadro N° 3.4 muestra los resultados de la vitalidad de espermatozoides epididimarios pre-refrigeración en alpacas, procesadas con los tratamientos Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris, en los cuales se obtuvo en promedio 95.41±1.91%, 91.94±2.79% y 91.44±3.22% y coeficientes de variabilidad de 2%, 3.04% y 3.53% respectivamente.

Cuadro N° 3.4. Vitalidad de espermatozoides epididimarios pre-refrigeración en alpacas.

TRATAMIENTO	N	PROMEDIO±DS	C.V (%)	MINIMO	MÁXIMO
ANDROMED [®]	17	95.41±1.91 ^a	2	90	98
TRYLADIL [®]	17	91.94±2.79 ^b	3.04	90	98
BASE TRIS	16	91.44±3.22 ^b	3.53	85	98

^{a,b} Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ($p \geq 0.05$), prueba tukey

Se puede observar que si hay diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento Andromed[®] y el tratamiento Triladyl[®] ($p \geq 0.05$), también hay diferencias estadísticas entre el tratamiento Andromed[®] y Base Tris ($p \geq 0.05$), pero no hubo diferencias entre el tratamiento Triladyl[®] y Base Tris ($p \geq 0.05$).

Pérez y Col. (2014) quienes reportan una vitalidad inicial de 47.8±8.8 % y 52.0±9.3 % de espermatozoides recuperados de conductos deferentes desviados quirúrgicamente de dos machos, donde utilizaron un solo dilutor comercial Triladyl[®]. Estos resultados son inferiores numéricamente a los encontrados en el presente trabajo de investigación realizada, donde se obtuvo como promedio 91.94±2.79 %

con el tratamiento Triladyl[®]. Esta diferencia se debe al proceso de obtención de la muestra ya que en la investigación las muestras fueron obtenidas directamente de la cola del epidídimo.

De igual manera los resultados obtenidos en el trabajo de investigación son superiores a lo reportado por, Laruta y Col. (2015) reportan vitalidad espermática pre-refrigerado de 86.67% y con un coeficiente de variación de 6.66% en semen fresco de llamas sin adición de dilutor y obtenido por electroeyaculación. Esta diferencia se debe a que en el presente trabajo de investigación antes de llevar a refrigerar las muestras ya estaban diluidas respectivamente en los dilutores, por consecuente se muestra una elevada vitalidad con el tratamiento Andromed[®], de igual manera las muestras fueron obtenidas directamente de la cola del epidídimo.

3.5. Vitalidad de espermatozoides epididimarios post-refrigeración en alpacas (*Vicugna pacos*).

Cuadro N° 3.5. Vitalidad de espermatozoides epididimarios post-refrigeración en alpacas.

TRATAMIENTO	N	PROMEDIO±DS	C.V	MINIMO	MÁXIMO
ANDROMED [®]	17	87.65±3.59 ^a	4.09	80	90
TRYLADIL [®]	17	82.35±4.00 ^b	4.86	75	90
BASE TRIS	16	78.75 ±6.45 ^b	8.2	60	85

^{a,b} Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ($p \geq 0.05$), prueba tukey

El cuadro N° 3.5 muestra los resultados de la vitalidad de espermatozoides epididimarios post refrigeración en alpacas, procesadas con los tratamientos Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris, en los cuales se obtuvo en promedio

87.65±3.59%, 82.35±4.00% y 78.75±6.45% y coeficientes de variabilidad de 4.09%, 4.86% y 8.2% respectivamente.

Se puede observar que si hay diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento Andromed[®] y el tratamiento Triladyl[®] ($p \geq 0.05$), también hay diferencias estadísticas entre el tratamiento Andromed[®] y el tratamiento Base Tris ($p \geq 0.05$), pero no hubo diferencias entre el tratamiento Triladyl[®] y el tratamiento Base Tris ($p \geq 0.05$).

Se puede ver que después de la refrigeración y el tiempo transcurrido de 14 horas la vitalidad post refrigeración se ve afectado en un 20 a 25 % de espermatozoides esto se debe al shock térmico que sufren los espermatozoides. En este trabajo de investigación los espermatozoides procedieron del epidídimo y por lo tanto, no estuvieron expuestos al plasma seminal. En ese sentido, el efecto del plasma seminal sobre la viabilidad espermática durante el proceso de refrigeración y criopreservación es controversial. Por un lado se indica que el plasma seminal protegería a los espermatozoides Barrios y col 2000; Parrilla y Col. (2004).

La gran mayoría de los trabajos de investigación, reportan resultados de motilidad inicial y post descongelación, vitalidad inicial y post descongelación, mas, no reportan vitalidad post refrigeración, es por eso que no se encuentran discusiones en este cuadro.

3.6. Vitalidad de espermatozoides epididimarios post descongelación en alpacas (*Vicugna pacos*).

Cuadro N° 3.6. Vitalidad de espermatozoides epididimarios post descongelación en alpacas.

TRATAMIENTO	N	PROMEDIO±DS	C.V	MINIMO	MÁXIMO
ANDROMED [®]	17	57.65±6.15 ^a	10.67	50	70
TRYLADIL [®]	17	58.53±5.52 ^a	9.44	50	65
BASE TRIS	16	55.63 ±7.04 ^a	12.66	40	65

^a Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ($p \geq 0.05$), prueba tukey

El cuadro N° 3.6 muestra los resultados de la vitalidad de espermatozoides epididimarios post descongelación en alpacas, procesadas con los tratamientos Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris, en los cuales se obtuvo en promedio 57.65±6.15%, 58.53±5.52% y 55.63±7.04% y coeficientes de variabilidad de 10.67%, 9.44% y 12.66% respectivamente.

Se puede observar que no hay diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento Andromed[®], tratamiento Triladyl[®] y el tratamiento Base Tris ($p \geq 0.05$).

Los resultados obtenidos en el siguiente trabajo de investigación son mayores a los reportados por Banda y Col. (2010), quienes reportaron una vitalidad/integridad acrosomal de 32.6±15.6, 26.3±17.3 y 27.2±13.5 post descongelación de espermatozoides de alpacas y utilizaron dilutores Tris, Tes y leche descremada. Esta diferencia estadística se debe a que la evaluación de la vitalidad de los espermatozoides se hizo 16 horas después de la congelación, mostrando así vitalidades mayores, frente a que Banda y Col. (2010), quienes evaluaron 15 días después de la criopreservación y utilizaron colorante Azul de tripan. No existe

información precisa sobre la supervivencia de espermatozoides de camélidos sudamericanos mantenidos dentro del epidídimo desde el momento que se beneficia o se castra al animal hasta que la muestra pueda ser procesada en un laboratorio.

3.7. Concentración inicial de espermatozoides epididimarios en alpacas (*Vicugna pacos*).

Cuadro N° 3.7. Concentración inicial de espermatozoides epididimarios en alpacas.

TRATAMIENTO	N	PROMEDIO±DS	C.V (%)	MINIMO	MÁXIMO
ANDROMED[®]	17	30.91±20.31 ^a	65.69	10	73
TRYLADIL[®]	17	27.41±15.31 ^a	55.84	11	61
BASE TRIS	16	25.31±17.99 ^a	71.08	10	70

^a Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ($p \geq 0.05$), prueba tukey

El cuadro N° 3.7 muestra los resultados de la concentración de espermatozoides epididimarios en alpacas, procesadas con los tratamientos Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris, en los cuales se obtuvo en promedio 30.91±20.31, 27.41±15.31 y 25.31±17.99 y coeficientes de variabilidad de 65.69%, 55.84% y 71.08% respectivamente.

Se puede apreciar que no hay diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento Andromed[®], tratamiento Triladyl[®] y Base Tris ($p \geq 0.05$), respectivamente.

Los resultados obtenidos en el trabajo de investigación son superiores a lo reportados por Pérez y Col. (2014), quienes reportaron una concentración de 15.9±6.8 millones de espermatozoides recuperados del conducto deferente desviados quirúrgicamente y

utilizaron un dilutor comercial el Triladyl[®]. Esta diferencia numérica se debe a que Pérez y Col. (2015), aspiraron del conducto deferente con una jeringa tuberculina que contenía el dilutor Triladyl[®] esto permite una alta contaminación y obteniendo espermatozoides inmaduros y jóvenes del trayecto, mientras en el trabajo de investigación se obtuvo directamente de la cola del epidídimo con márgenes de error de laboratorio 25 a 30 %.

Los resultados obtenidos en el trabajo de investigación son similares a los reportados por Banda y Col. (2010), quienes reportaron una concentración de 39 ± 17.0 millones de espermatozoides y 37.8 ± 37.7 millones de espermatozoides epididimarios a 0 y 35 horas del beneficio. Esta semejanza se debe a la dilución utilizada, en comparación al trabajo de investigación que se realizó con 5 ul de dilución y 95 ul de formol, de igual manera el análisis de la concentración se realizó a 8 horas pos beneficio.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- El dilutor Andromed[®] resultó tener mejor capacidad de mantener la motilidad de espermatozoides epididimarios en el proceso pre refrigeración, post refrigeración y post descongelación, frente a los dilutores Triladyl[®] y Base Tris más yema de huevo
- El dilutor Andromed[®] demostró tener mejor efecto sobre la motilidad de espermatozoides epididimarios pre refrigeración frente a los dilutores Triladyl[®] y base Tris más yema de huevo.
- El dilutor Andromed[®] resultó eficaz en mantener la motilidad espermática en la etapa post refrigeración con un $51.47 \pm 12.22\%$ frente a $43.23 \pm 10.30\%$ y $39.38 \pm 7.72\%$, para Triladyl[®] y Base Tris, respectivamente.
- El dilutor Andromed[®] demostró tener efectividad en mantener la motilidad espermática en el proceso de post descongelación de espermatozoides epididimarios con un $22.24 \pm 6.22\%$ frente a $16.82 \pm 5.28\%$ para Triladyl[®] y $17.50 \pm 4.83\%$, para Base Tris, con resultado estadísticamente significativa.

- Se determinó que la vitalidad de espermatozoides epididimarios pre refrigeración es óptimo con los tres dilutores, pero en post refrigeración y post descongelación, el dilutor Andromed[®] mostro tener mejor efecto frente a los dilutores Triladyl[®] y Base Tris.
- Se determinó que los dilutores Andromed[®], Triladyl[®] y Base Tris no tuvieron un efecto sobre la concentración inicial de espermatozoides epididimarios.

4.2. Recomendaciones.

Los resultados del presente trabajo de investigación permiten recomendar lo siguiente:

- Continuar con trabajos de investigación similares con el objetivo de estandarizar protocolos de congelación de semen en alpacas a fin de obtener mayores parámetros de calidad espermática como la utilización de espermatozoides procedentes del epidídimo.
- Utilizar el dilutor Andromed[®] en trabajos de inseminación artificial con semen refrigerado ya que demostró tener mejores parámetros de motilidad en esta etapa.
- Utilizar el dilutor Andromed[®] como dilutor base y adicionar sustancias que mejoran los parámetros espermáticos a fin de lograr un dilutor modificado que tenga mejores resultados.

V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Aisen E., Medina V. y Venturino A. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.

Aller J., Rebuffi G., Kancino A. y Alberio R. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama. *Arch. Zootec.* 52: 15-23.

Amann R. y Pickett B. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.

Anchordoguy T. J., Rudolph A. S., Carpenter J. F. y Crowe J. H. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24: 324-331.

Andromed®. 2015. Diluyente sin yema de huevo para la conservación de semen bovino. Disponible en: http://www.minitube.de/var/StorageMinitube/Datenblaetter/13503-0200_AndroMed_es_090527.pdf Consultado noviembre, 2015.

Banda R. J., Evangelista V. S., Ruiz G. L., Sandoval M. R., Rodríguez L. C., Valdivia C. M., Santiani A. A, 2010. *Rev Inv Vet Perú*, 21 (2): 145-153.

Barrios B., Perez-Pe R., Gallego M., Tato A., Osada J., Muiño- Blanco T. y Cebrian-Perez J. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on rame sperm membrane. *Biol Reprod* 63: 1531-1537.

Blackshaw A. W. 1954. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust Journ of Biol Sci* 7: 573-582.

Bravo P. W., Ordoñez C. Y Alarcón V. 1996. Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. 13th Int. Congr. Anim. Reprod., Sydney pp. 2–3.

Bravo P.W. 1998. Avances en la fisiología reproductiva del macho: llama y alpaca. En Resúmenes de la XXI Reunión científica anual peruana de producción animal. Puno – Perú. p. 15-21.

Bravo Pw, Skidmore Ja, Zhao XX. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. Anim Reprod Sci 62: 173-193.

Bravo W., Moscoso R., Alarcón V. y Ordoñez. 2002. Ejaculatory process and related semen characteristics of llamas and alpacas. J. of Androl. 48:65-72.

Burgel H, Erhardt G, Gauly M. 2001. Cryopreservation of llama (*Lama glama*) spermatozoa with an egg yolk free extender, in Gerken M., Renieri C. (eds), Progress in South American Camelids Research Wageningen Pers, Wageningen Netherlands.

Callo M, Garnica J, Bravo W. 1999. Efecto de la fibrinolisisina, hialuronidasa, collagenasa y tripsina sobre la viscosidad del semen en alpacas. En: II Congreso Mundial sobre camélidos. Cusco, Perú.

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

Dávalos R. y Olazábal, J. 2002. Evaluación de dos Formas de Colección de Semen en Alpacas. Rev Inv Vet Perú: 13 (2): 98-99.

- De Alva J. (1985.** Reproducción animal. Editorial La Prensa Médica Mexicana S.A: México.
- DRAA. 2013.** Censo Población de alpacas y números de criadores.
- Evans G., Maxwell W.M.C., 1990.** Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza, España.
- Fahy G. M., Lilley T. H, Linsdell H., John Douglas M. S. T. y Meryman H.T. 1990.** Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. Cryobiology 27: 247-268.
- Fernández Requena, Leandro, 2007.** Manejo higiénico del semen y enfermedades transmisibles por el mismo. Disponible en: http://www.iica.org.uy/data/informes/Publicaci%C3%B3n_hereford.pdf. Consultado Octubre, 2015.
- Fernández-Baca S., Maden D. H. L. y Novoa C. 1970.** Effect of different mating on induction of ovulation in the alpaca. J. Reprod. Fert. 22: 261-267.
- Fiser, P.S., R.W. Fairfull. 1990.** Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. Molecular Reproduction and Development, 25: 123-129.
- Gao D. Y., Liu J., Liu C., McGann L. E., Watson P. F., Kleinhans F. W., Mazur P., Critser E. S. y Critser J. K. 1995.** Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. Human Reprod 10: 1109-1122.
- Garden J. 1992.** Congelación de semen en la especie ovina. [Tesis Doctoral] Madrid, España; Universidad Complutense de Madrid. Disponible en:

http://www.uclm.es/organos/Vic_Investigacion/gruposweb/BiologiaReproduccion/docs/tesis_garde.pdf. Consultada octubre 2015.

Guido P., Quintana J. y Harold P. 2014. Sobrevivencia espermática en refrigeración a 5 °C recuperados del conducto deferente de alpacas en tres dilutores con dos protectores de membrana ASPRA, 4(2)153-158.

Gonzales H. 2008. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. Scientia 10: 223-234.

Graham, J. K. y Foote, R. H. 1987. Effects of several lipids, fatty acil chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. Cryobiology 24: 42-52.

Hafez E. S. E. 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Mc Graw Hill. Séptima edición. México D. F. - México.

Hammerstedt R. H., Graham J. K. y Nolan J. P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J Androl 11: 73-88.

Hancock JL. A, 1951. Staining technique for the study of temperature shock in semen Nature, 167 323.

Huanca T. 1996. Manual del alpaquero, Serie Manual, INIA. Lima-Perú. Pág. 53.

Huanca T. y Mamani R. H. 2013. Producción de reproductores con evaluación genética en alpacas. INIA-CONCYTEC. Puno-Perú. Págs. 9 y 13.

Huanca W. Y Gaily, M. 2001. Conservación de semen refrigerado en llamas. En Resúmenes de la XXIV Reunión científica anual peruana de producción animal. Lima – Perú. P-460-461.

INEI. 2013. Resultados definitivos: IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Lima-Perú.

Kampschmidt R. F., Mayer D. T. y Herman H. A. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. J Dairy Sci 36: 733-742.

Laruta L. F., Loza M. M. y Delgado C. P. 2015. Evaluación de características microscópicas de semen de llama *Lama glama*, Journal of the Selva Andina Animal search Society.

Marino T. C., Wilfredo H. L., Irma A. C., Antonio A. B., 2015. Efecto de tres crioprotectores en la Criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas, Rev.Inv.Vet, Perú. 26(3) 420-426.

Marín J. C., Zapata B., González B. A., Bonacic C., Wheeler J. C. y Casey C. 2007. Systematics, taxonomy and domestication of alpacas and llamas: new chromosomal and molecular evidence. Revista Chilena de Historia Natural 80 (2): 121 – 140.

Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. Am J Physiol 247: 125-142.

Mcevoy T, Kyle C, Slater D, Adam C, Bourke D. 1992. Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. JReprod Fert 9: 48 (Abstr).

Mendoza A. 2013. Evaluation de dos Protocolos para la congelación de semen de alpacas (*Vicugna pacos*) a 2736 m.s.n.m. – Ayacucho.

Morton Km, Bathgate R, Evans G, Maxwell WMC. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate based, Tris-based and lactose-based diluents and pellets and straws. Reprod Fert Dev 19: 792-796.

Müller F. 2001. Medios de Crio-Preservación de Semen Bovino.

Müller, F. 2005.Avances con el uso de diluyentes libres de yema de huevo en la congelación de semen bovino. 6th Simposio Internacional de Reproducción Animal, Universidad Córdoba.

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

Parrilla I., Vasquez JM., Cuello C., Gil MA., Roca J., Di Berardino D. y Martinez EA. 2004. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. Reproduction 128: 615-621.

Pacheco, J. 2008. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 2008 Volumen IX Número 5.

Parks J, Graham J. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology 38: 209-222.

Perez G.; Apaza E. y Deza, H. 2005. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en el buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol. En resúmenes del XVII Congreso nacional de ciencias veterinarias del Perú. Tacna – Perú.

Perez G.; Apaza E. Y Deza, H. 2004. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en el buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol. En resúmenes del XVII Congreso nacional de ciencias veterinarias del Perú. Tacna – Perú.

Pérez, F. 1985. Reproducción animal. Inseminación artificial y trasplante de embriones, Madrid, España. Ed. Científico-Médica.

Phillips P. H. y Lardy H. A. 1940. A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. J Dairy Science 23: 399-404.

Polge C, Smith A, Parks A. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164: 666.

Ponce C, Olazabal J, Dávalos R. 1999. Criopreservación de semen de alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.

Rodríguez C. 2009. Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Mag. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Pág. 72.

Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005. Effects on the quality of frozenthawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. Asian J Androl 7: 303-309.

Santillana A, García A. 2001. Estudio comparativo de dos diluyentes para el procesamiento en congelado de semen de Pelibuey. EXOPOL. Disponible en: <http://www.exopol.com/seoc/docs/vzq5536o.pdf>. consultada Agosto 2015.

SAS Institute INC. SAS/STAT® 9.2 2009. User's Guide, Second Edition. Cary, NC.

SENAMHI, 2013: <http://www.senamhi.gob.pe/site/tesis/>

Smith, C.L., A.T. Peter, D.G. Pugh. 1994 Reproduction in llamas and alpacas: a review. Theriogenology, 41: 573-596.

Sumano H, Ocampo L. 1997. Farmacología veterinaria., México, D.F., México. Págs. Editoriales McGraw-Hill. 122-125 páginas.

Sumar J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. MSc. thesis.Fac. Med. Vet. Swedish University of Agric.Sci.Uppsala.

Sumar J. y leyva L. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). Memoria IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Corp. Nac. de Formación e Integración de la Patagonia. Punta Arenas Chile.

Triladyl®. 2015. El estándar para la producción de semen bovino con diluyente con yema de huevo, huevo. Minitube consultado noviembre del 2015.

Valdivia M, Ruíz M, Bermúdez L, Quinteros S, Gonzáles A, Manosalva I, Vaughan J., Galloway D., y Hopkins D. (2003). Rural Industries Research y Development Corporation. (2003). “Artificial insemination de alpacas”. Publicación N° 03/104. Edición. Publicación N° 03/104. Australia.

Vivanco W., Foote W. y Pinares C. 1985. Estudio del desarrollo de algunas características reproductivas en alpacas machos “Huacaya” en la sierra central del Perú, del nacimiento a los 13 meses de edad y sus correlaciones con el desarrollo corporal. V Conv. Internac. Cam. Sudam. Cusco, Perú. p 5.

Von Baer L, Hellemann C. 1999. Cryopreservation of llamas (*Lama glama*) semen. *Reprod Domest Anim* 34: 95-96.

Waberski D., Weitze K. F., Rath D. y Sallmann H. P. 1989. Wirkung von bovinem Serumalbumin und Zwitterionenpuffer auf flüssigkonservierten Ebersamen. *Zuchthygiene* 24, 126–133.

Watson P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev* 7: 871-891.

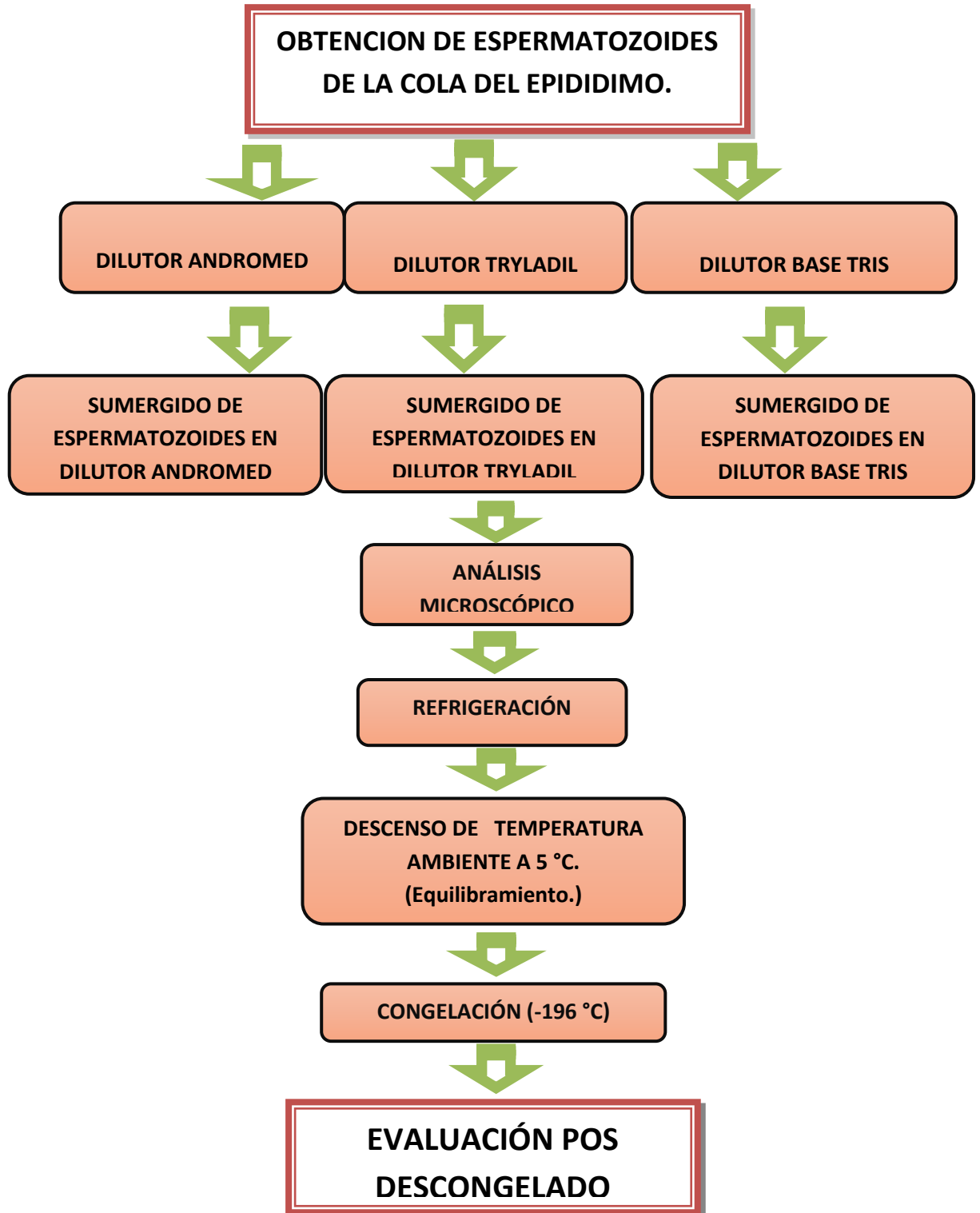
Wheeler J., Kadwell M., Fernández M., Stanley H. F. Baldi R., Rosadio R. y Bruford M.W. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and

the alpaca. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268 (1485): pp. 2575–2584.

Wheeler, J.C. 1991. Origen, evolución y status actual. En: *Avance y perspectivas de los camélidos sudamericanos*. Ed. Saúl Fernández-Baca. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe.

VI. ANEXOS

Grafico N° 6.1. Diagrama de proceso de criopreservación de espermatozoides del epidídimo de alpacas.



Fuente: Elaboración Propia.

ANEXO N° 02. Composición de los dilutores utilizados.

Cuadro N° 6.1. Componentes del dilutor AndroMed®

COMPONENTES	CANTIDAD
Fosfolípidos.	Desconocida.
Tris.	Desconocida.
Ácido cítrico.	Desconocida.
Azúcares.	Desconocida.
Antioxidantes.	Desconocida.
Tampones.	Desconocida.
Agua ultrapura.	Desconocida.
Tilosina.	Desconocida.
Gentamicina.	Desconocida.
Espectinomicina.	Desconocida.
Lincomicina.	Desconocida.
Glicerina	Desconocida.

Fuente: MINITUBE, 2003.

Cuadro N° 6.2. Componentes del dilutor Triladyl®.

COMPONENTES	CANTIDAD
Agua bidestilada	Desconocida
Fructosa	Desconocida
Glicerol	Desconocida
Acido cítrico	Desconocida
Tris	Desconocida
Fosfolípidos (Lecitina de yema de huevo)	Desconocida
Espectinomicina	Desconocida
Lincomicina	Desconocida
Tilosina	Desconocida
Gentamicina	Desconocida

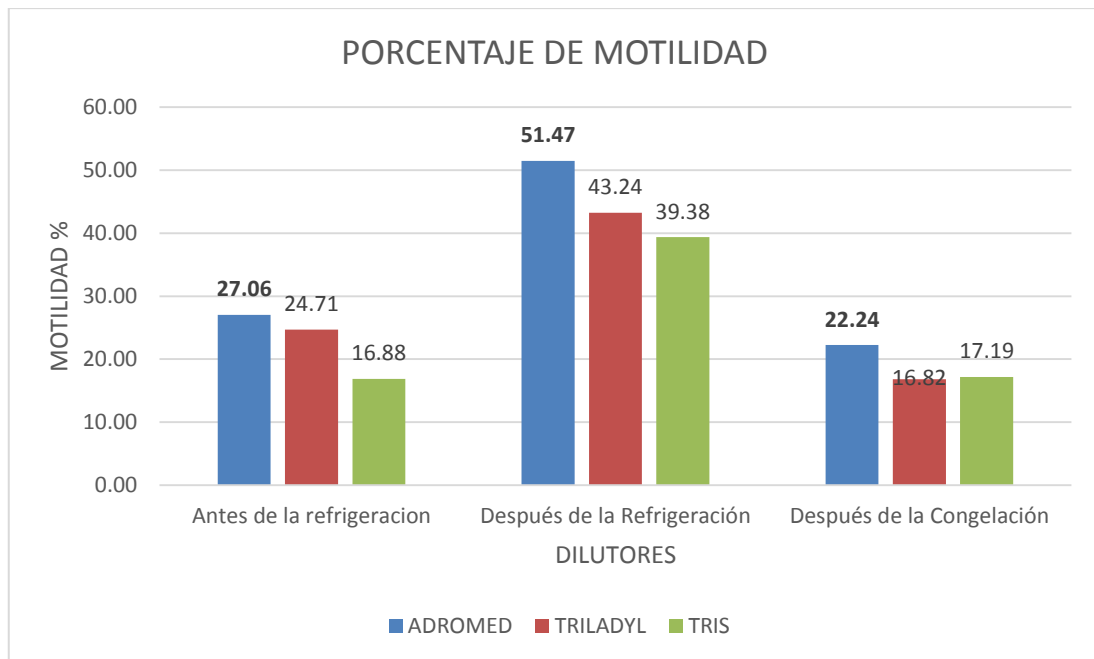
Cuadro N° 6.3. Componentes del dilutor Tris – yema de huevo de gallina.

COMPONENTES	CANTIDAD (Para 10 ml)
Tris.	0.36 g
Ácido cítrico.	0.19 g
Fructosa.	0.05 g
Agua bidestilada.	8.5 ml
Yema de huevo	1.5 ml
Gentamicina.	0.1 ml
Glicerol	7%

Cuadro N° 6.4. Resultados obtenidos en las diferentes etapas de criopreservación de espermatozoides del epidídimo de alpacas.

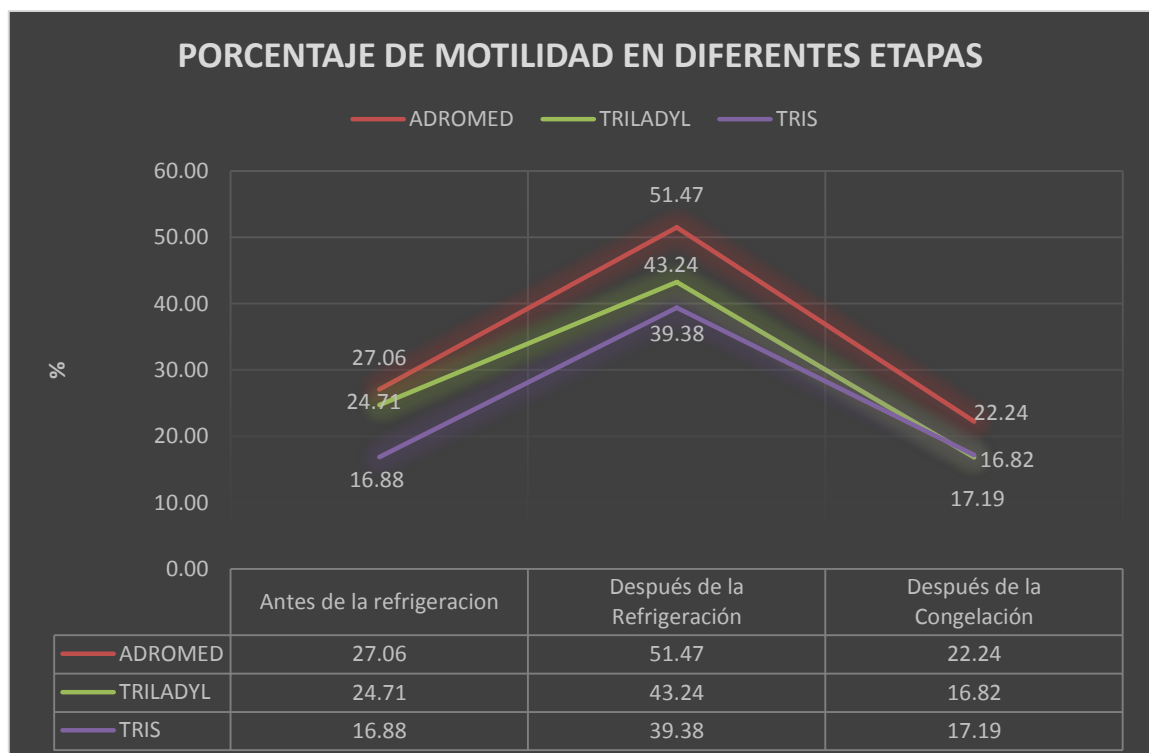
ETAPAS DEL PROCESAMIENTO DE LOS ESPERMATOZOIDES																					
COLOR	Evaluación de Espermatozoides del epidídimo antes de la Refrigeración									Evaluación de Espermatozoides diluido después de la Refrigeración						Evaluación de Espermatozoides después de Criopreservación					
	ANDROMED	VIVOS	CONC. MILL/0.5 ML	TRYLADIL	CONC. MILL/0.5 ML	VIVOS	TRIS	CONC. MILL/0.5 ML	VIVOS	ANDROMED	VIVOS	TRYLADIL	VIVOS	TRIS	VIVOS	ANDROMED	VIVOS	TRYLADIL	VIVOS	TRIS	VIVOS
B.LECH	20	95	10	25	16.5	90	10	15	90	40	85	40	85	45	80	20	55	15	65	20	60
B.LECH	15	90	19.5	15	11	90	15	12	90	30	80	30	80	35	75	15	60	10	50	15	55
B.LECH	15	95	21	20	32.5	90	20	63	90	35	90	35	80	45	80	15	60	10	60	25	60
B.LECH	30	95	32.5	25	26	95	15	21	90	60	90	55	85	40	85	25	50	20	60	20	50
B.CLARO	25	95	15	15	12	90	15	12	95	50	90	30	80	25	70	18	50	10	50	15	45
B.LECH	30	95	19	35	51.5	98	20	38	90	60	90	60	90	50	80	20	60	20	65	25	55
B.LECH	40	95	51.5	30	41.5	90	10	10	85	75	90	50	85	45	60	30	65	20	60	10	40
B.LECH	45	95	60.5	20	15.5	90	20	15	95	70	90	40	80	30	80	30	60	15	55	10	55
B.LECH	30	95	16.5	25	36.5	90	10	25	90	50	80	45	80	45	85	25	50	20	65	20	60
B.CLARO	25	95	12	20	11	90	15	20	90	50	85	35	80	30	80	15	50	10	60	15	60
B.LECH	20	95	16	40	61	95	25	70	98	45	90	60	90	40	85	15	50	28	65	20	65
B.LECH	20	95	20	35	41.5	95	20	36	95	40	85	60	80	35	75	20	55	25	60	15	50
B.LECH	30	98	26	20	12.50	90	20	13	90	60	90	40	75	30	80	30	60	15	50	10	50
B.LECH	15	95	21.5	30	34.5	95	20	15	90	50	85	45	80	45	85	20	65	20	60	20	60
B.LECH	35	98	73	25	18.5	95	20	20	95	50	90	35	80	50	80	25	60	18	60	20	65
B.LECH	30	98	45.5	20	15.5	90	15	20	90	45	90	35	85	40	80	20	60	15	50	20	60
B.LECH	35	98	66	20	28.5	90				65	90	40	85			35	70	15	60		

Grafico N° 6.2. Porcentaje de motilidad pre-refrigeración, post refrigeración y post descongelación.



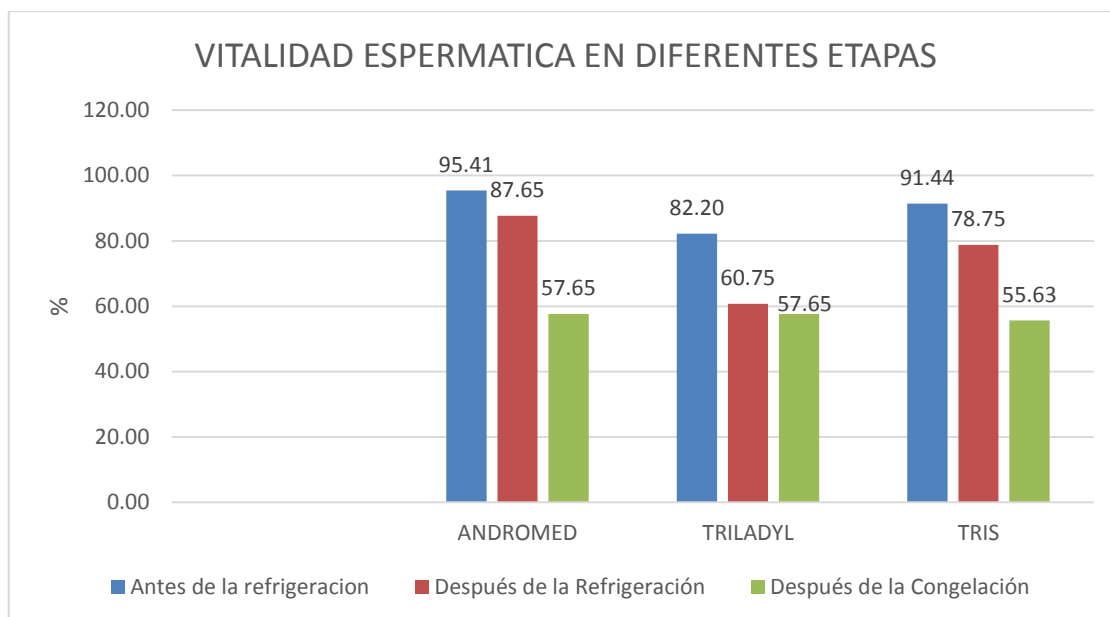
Fuente: Elaboración Propia.

Grafico N° 6.3. Tendencia de motilidad según dilutores en diferentes etapas de la criopreservación



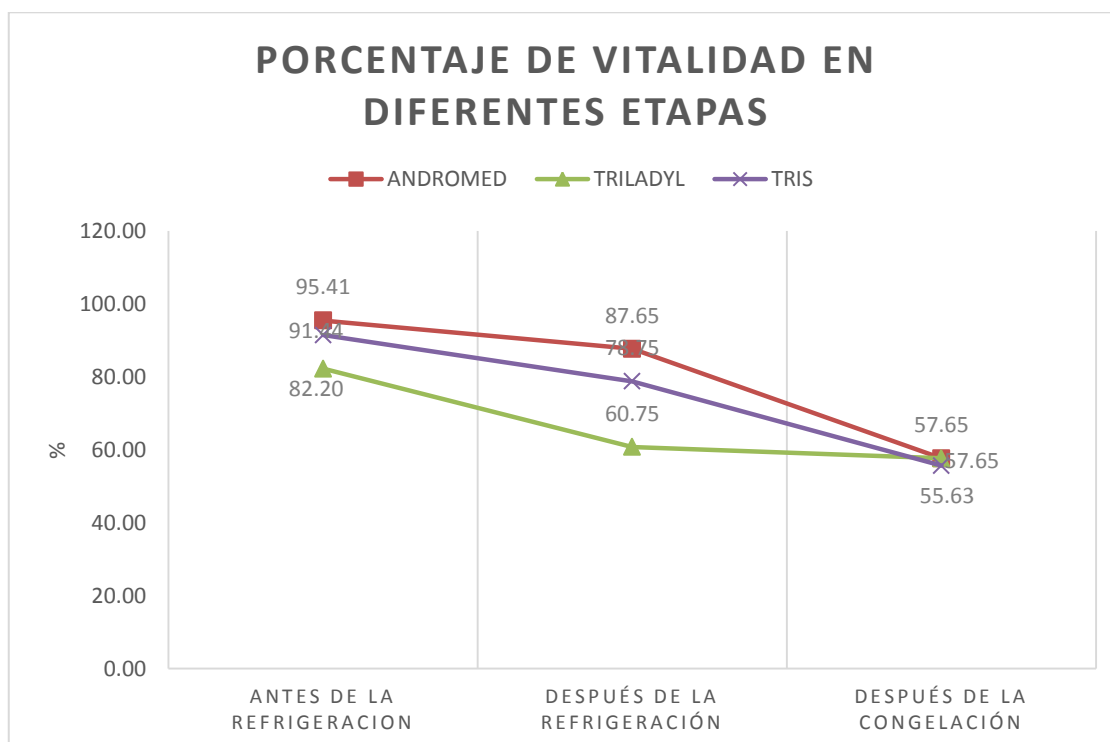
Fuente: Elaboración Propia.

Grafico N° 6.4. Porcentaje de vitalidad utilizando los tres dilutores en diferentes etapas de la criopreservación.



Fuente: Elaboración Propia

Grafico N° 6.5. Porcentaje de vitalidad utilizando los tres dilutores, en las diferentes etapas de la criopreservación.



Fuente: Elaboración propia.

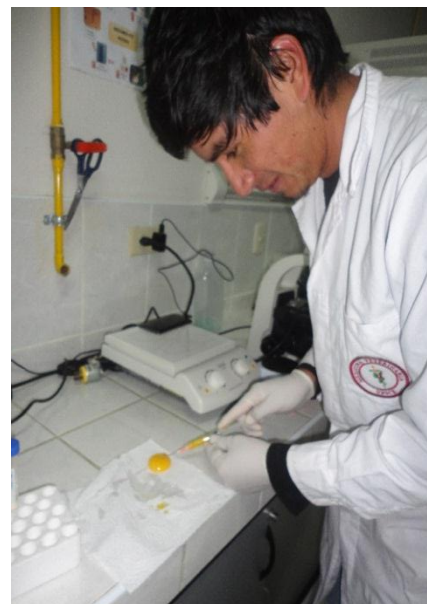
Anexo N° 04: Procedimiento

Foto N° 01: Machos que fueron sacrificados, traslado de muestras del matadero de Pilpichaca Huancavelica.



Fuente: Elaboración propia.

Foto N° 03 y 04. Preparación de dilutores en el laboratorio de biotecnología reproductiva del INIA



Fuente: Elaboración propia.

Foto N° 05. Refrigeración de los dilutores preparados



Fuente: Elaboracion propia

Foto N° 06. Los dilutores se sacaron de la refrigeradora y se atemperaron a 37 °C



Foto N° 07 y 08. Limpiado y recuperación de espermatozoides.



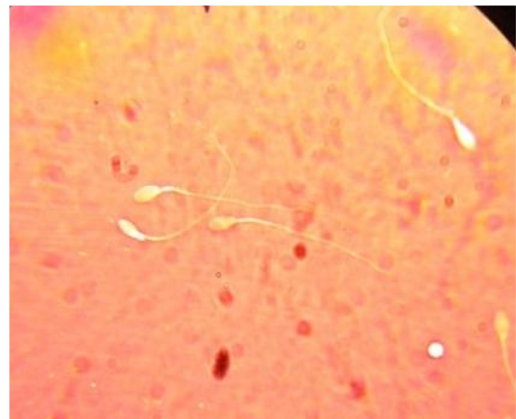
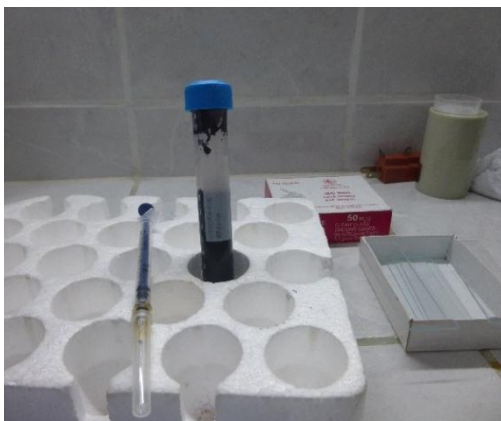
Fuente: Elaboración propia.

Foto N° 09 y 10: Observación y guardado de la dilución en la refrigeradora en tubos Ependorf tiempo 16 horas.



Fuente: Elaboración propia.

Foto N° 08 y 09. Tinción y espermatozoides teñidos con Eosina-nigrosina



Fuente: Elaboracion propia

Foto N° 10 y 11. Preparación de cámara newvauer para la concentración



Fuente: Elaboración propia.

Foto N° 12. Lectura de la concentración de espermatozoides.

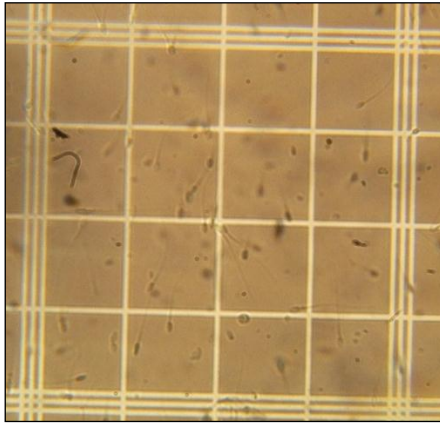


Foto N° 13 y 14. Medición de la canastilla



Fuente: Elaboración propia.

Foto N° 15, 16 y 17 . Enpajillado, sellado y colocación en cubetas con hielo antes de poner al tanque.



Fuente: Elaboración propia.

Foto N°. 18, 19 y 20. Secado e inmersión en el tanque criogénico



Fuente: Elaboración propia.

Foto N° 21 y 22. Proceso de descongelación.



Fuente: Elaboración propia.

Foto N° 23 y 24 observación de la motilidad de espermatozoides post descongelación



Fuente: Elaboración propia.

Anexo N° 05. Materiales.



Fotografía N° 01: secadora.



Fotografía N° 02: Flujo laminar.



Fotografía N° 03: Refrigeradora.



Fotografía N° 04: Baño maría.

Fuente: Elaboración propia.



Fotografía N° 05: Autoclave.



Fotografía N° 06: Vortex genie.

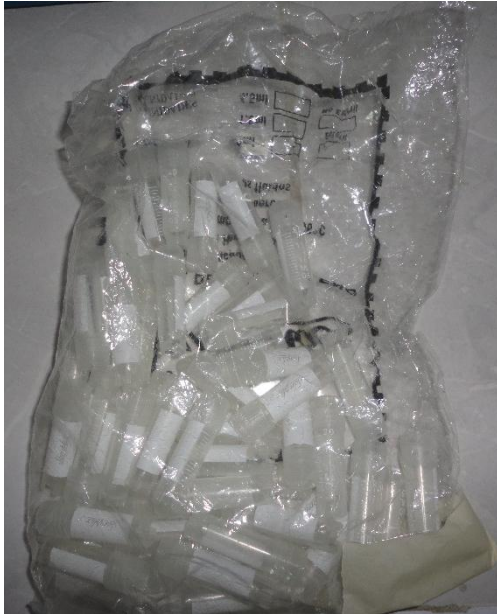


Fotografía N° 07: Platina
térmica de neovot.

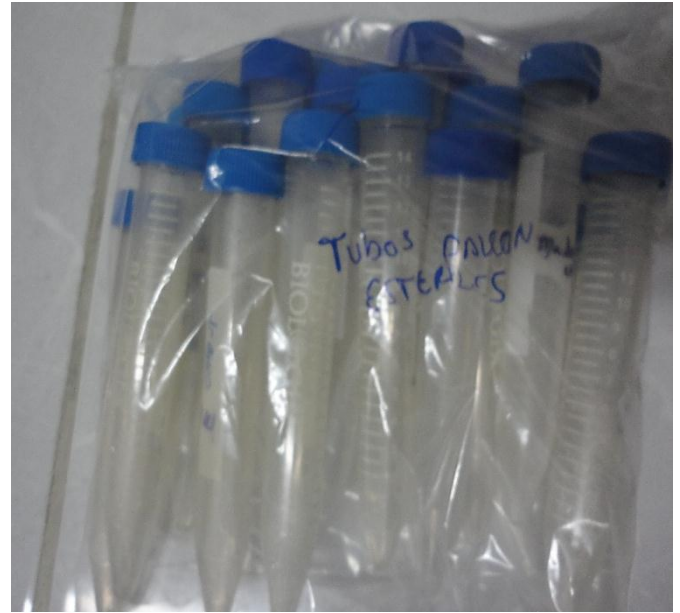


Fotografía N° 08: microscopio
electrónico (50X, 100X, 400X).

Fuente: Elaboración propia.



Fotografía N° 09: tubos Eppendorf.



Fotografía N° 10: tubos falcón de 15 cc.



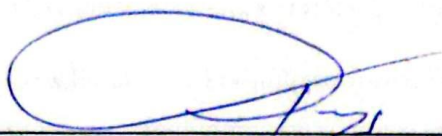
Fotografía N° 11: tips.

Fuente: Elaboración Propia.

**EVALUACIÓN DE TRES DILUTORES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN
DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DEL EPIDÍDIMO DE ALPACAS
(*Vicugna Pacos*) EN LA REGIÓN AYACUCHO**

Recomendado : 24 de junio de 2016

Aprobado : 15 de julio de 2016

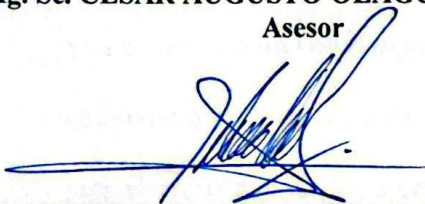


M.Sc. CARLOS ALBERTO PISCOYA SARMIENTO
Presidente del Jurado



Mg. Sc. CÉSAR AUGUSTO OLAGUIVEL FLORES

Asesor



Dr. LUÍS ARTURO RODRIGUEZ ZAMORA
Miembro del Jurado



Mg. JULIO CÉSAR SOTO PALACIOS
Miembro del Jurado



Dr. ANTONIO JERÍ CHÁVEZ
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias