

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**Evaluación de la temperatura sobre la integridad de la
membrana plasmática del semen de alpaca
criopreservados, Ayacucho 2019**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIO**

PRESENTADO POR:

Ever Linares Motta

**Ayacucho – Perú
2020**

A Dios por brindarme la vida, iluminarme, guiarme y darme las oportunidades y la fuerza para salir adelante; por el apoyo y fortaleza en los momentos de dificultad y debilidad.

Con amor a mi madre Nery y mi padre Honorato, quienes me brindaron una maravillosa formación, por su ternura y todo su amor, por contagiarme de sus mayores fortalezas por el constante trabajo y sacrificio abnegado, por su dedicación, por su invalorable ejemplo que me dieron para la vida, a mis hermanos, por su apoyo, el esfuerzo y la comprensión, a mis familiares, quienes hicieron que esta etapa de mi vida concluya satisfactoriamente.

Mis amados hermanos Luz, Jhon, Roly, Mérida, Pablo y Soledad; por los ánimos constantes, por confiar siempre en mí, por ayudarme a descubrir nuevas etapas en vida, por compartir y aprender que las dificultades nos hacen grandes.

A mis queridos amigos, Andrés, Walter, Ronal, Crissthel, Marisol, Harumi y Katherine, por su apoyo durante la ejecución de este trabajo y por darme días felices llenos de risas y compartir conmigo un poquito de cada uno de ustedes.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por albergarme, por abrirme las puertas y brindarme todos los conocimientos para mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, en especial a la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria que aportaron en gran medida para mi formación profesional y personal.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho, por ceder el ambiente y materiales necesarios para este trabajo de investigación.

Al Mg. Sc. César A. Olaguivel Flores, asesor del presente trabajo de investigación, por el gran apoyo, consejos, sugerencias y la confianza para realizar este trabajo.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores, encargada del Programa Nacional de Investigación en Camélidos del INIA-Ayacucho por el apoyo, consejos y abrirme las puertas del laboratorio de biotecnología reproductiva del INIA y brindarme la oportunidad para poder llevar a cabo la realización del presente trabajo de investigación.

Al M.V. Mijaíl Contreras Huamaní, co-asesor del actual trabajo de investigación, por el apoyo firme y constante, por la confianza, afecto y los saberes brindados de manera desinteresada durante el transcurso de la investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de tablas	vii
Índice de figuras.....	viii
Índice de anexos.....	ix
Resumen.....	1
Introducción	2
CAPÍTULO I	
MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Camélidos Sudamericanos	5
1.2.1. La alpaca	6
1.3. Colección de semen	6
1.4. Fisiología reproductiva del macho.....	8
1.4.1. Pubertad	8
1.4.2. Espermatogénesis.....	9
1.5. Peculiaridades del semen de alpaca	10
1.6. Características de los espermatozoides de alpaca	12
1.7. Estructura del espermatozoide	13
1.7.1. Cabeza espermática.....	13
1.7.2. Cuello del espermatozoide	15
1.7.3. Flagelo del espermatozoide.....	15
1.7.4. Acrosoma	15
1.7.5. Membrana plasmática del espermatozoide	16
1.8. Evaluación microscópica del semen de alpacas.....	17
1.8.1. Motilidad espermática.....	17
1.8.2. Concentración espermática	18
1.8.3. Vitalidad espermática.....	19
1.9. Evaluaciones sobre el estado de los espermatozoides	19
1.9.1. Integridad de la membrana espermática.....	19
1.10. Técnicas para evaluar la integridad de la membrana espermática	21

1.10.1. Tinción de Hoechst 33342/IP	21
1.10.2. Test de endosmosis	23
1.11. Preservación del semen de alpacas	24
1.11.1. Refrigeración o enfriamiento del semen	24
1.11.2. Congelación del semen	26
1.11.3. Descongelamiento del semen.....	27

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA.....	29
2.1. Ubicación	29
2.2. Duración.....	29
2.3. Muestra.....	29
2.4. Método procedimental	29
2.4.1. Recursos disponibles.....	29
2.4.2. Materiales y equipos	30
2.5. Problemas específicos	31
2.6. Procesamiento de las muestras.....	31
2.6.1. Armado de la vagina artificial y recolección de semen de alpaca	31
2.6.2. Análisis macroscópico del semen	32
2.6.3. Análisis microscópico del semen.....	33
2.6.4. Refrigeración del semen.....	33
2.6.5. Congelación del semen	34
2.6.6. Descongelación de semen	34
2.6.7. Evaluación de la integridad de membrana espermática	34
2.7. Diseño estadístico	36

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1. Evaluación del volumen de semen (ml).....	37
3.2. Evaluación de la espuma del semen (ml).....	38
3.3. Evaluación de la filancia seminal (cm)	38
3.4. Evaluación de vitalidad espermática (%).....	39
3.5. Evaluación de la motilidad espermática (%).....	40
3.6. Evaluación de concentración espermática (mill/ml).....	41
3.7. Evaluación de color del eyaculado (%).....	41

3.8.	Evaluación microscópica de semen (%)	42
3.9.	Valores promedio de comparación de espermatozoides vivos evaluados a través del test de endósmosis y tinción fluorescente Hoechst 33342/PI	44
CONCLUSIONES		47
RECOMENDACIONES		48
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA		49
ANEXOS.....		59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 3.1. Volumen en semen fresco.....	37
Tabla 3.2. Volumen de espuma en semen fresco.....	38
Tabla 3.3. Filancia en semen fresco.....	38
Tabla 3.4. Vitalidad espermática en semen fresco.....	39
Tabla 3.5. Motilidad espermática en semen fresco.....	40
Tabla 3.6. Concentración espermática en semen fresco.....	41
Tabla 3.7. Porcentaje de color del eyaculado en semen fresco.....	41
Tabla 3.8. Parámetros espermáticos en distintas etapas de criopreservación....	42
Tabla 3.9. Porcentaje de espermatozoides con membrana intacta en distintas etapas de criopreservación y pruebas.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Estructura del espermatozoide de mamífero.....	14

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Resultados del trabajo de investigación.....	60
Anexo 2. Evaluación de la motilidad y vitalidad en las distintas etapas de la preservación del semen de alpaca.....	66
Anexo 3. Evaluación de la integridad de membrana en las distintas etapas de la criopreservación de semen de alpaca.....	67
Anexo 4. Panel fotográfico.....	68

RESUMEN

La evaluación convencional del semen envuelve varios parámetros tanto macroscópicos (volumen, color) y microscópicos (concentración, motilidad y vitalidad). Sin embargo estos solo indican la funcionalidad del macho y no son indicadores de la fertilidad, por ello, el objetivo del presente de investigación fue evaluar el efecto de cambio de la temperatura en la integridad de la membrana plasmática en la preservación de semen de alpaca. La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán-Ayacucho. Se utilizó 31 muestras, colectados por vagina artificial. Las muestras con motilidad mayor al 50% fueron seleccionadas para realizar las pruebas de integridad de membrana empleando dos métodos: Host y tinción Hoechst 33342/PI. Para el test de Host se utilizó 10ul de semen y se adicionó 100ul de reactivo de Host y se llevó a incubar a 37°C, para la tinción Hoechst 33342/PI se utilizó 10ul de semen y se añadió 1.5ul de tinción Hoechst 33342/PI y se incubó a 37°C. Se realizó este proceso en las tres etapas de criopreservación: Fresco, refrigerado y descongelado. Se empleó la prueba de análisis de varianza para poder determinar la existencia de diferencias estadísticas. Obteniendo para la prueba de Host un porcentaje promedio de 52.97%, 45.09% y 29.71% correspondiente a semen fresco, refrigerado y descongelado respectivamente. Para la prueba Hoechst 33342/PI se obtuvo 57.65%, 53.26% y 27.35% correspondiente a semen fresco, refrigerado y descongelado. Encontrándose así discrepancias estadísticas significativa entre etapas de criopreservación de semen fresco y semen congelado ($P>0,05$) en ambos métodos. Así mismo se obtuvo un porcentaje promedio de vitalidad de 74.43%, 68.36% y 48.30% y motilidad de 72.82%, 54.83% y 23.80% para semen fresco, refrigerado y descongelado; se halló discrepancias estadísticas entre las etapas de criopreservación en semen fresco, refrigerado y congelado para ambos parámetros espermáticos. En conclusión, el cambio de temperatura tiene efecto sobre la membrana plasmática y su integridad en la célula espermática.

Palabras clave: Integridad de membrana plasmática, Host, Hoechs

INTRODUCCIÓN

La crioconservación de células seminales es un desafío para el progreso en la crianza de alpacas, quienes forman un recurso genético de mucho valor social, económico, cultural y científico para nuestro país y algunos países de América y Australia. Criogenizar es un método seguro para almacenar y conservar material genético (Cabrita y col., 2014) cuyos beneficios permite la formación de bancos con recursos genéticos, contribuye a la preservación de las especies en peligro de extinción (Bobe & Labbé, 2010) y ha permitido el desarrollo de tecnologías de reproducción asistida de muchas especies domesticas (Fabbrocini y col., 2000), para ello se necesita evaluación estándar de semen que incluye diferentes parámetros que son el volumen, la concentración, la motilidad, viabilidad y morfología. Se ha asumido que dichos parámetros proveen datos sobre la cantidad de la muestra y la calidad de la espermatogénesis (Correa y Zavos, 1994) no obstante, dichas medidas tienen restricciones y no se pueden usar como pronóstico confiable sobre la calidad fertilizante de la célula espermática tanto in vivo como in vitro (Glass y Ericsson, 1979).

Además de la evaluación estándar, se han desarrollado otras pruebas para medir la funcionalidad espermática como la estructura funcional de la membrana espermática es fundamental para mantener la viabilidad y la calidad fertilizante de los espermatozoides, también es necesario la evaluación de la membrana plasmática con pruebas de laboratorio. Al momento de la fertilización como son la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión espermática al oocito, requieren de una membrana activa, la fertilización no ocurre si la membrana esta estructural o físicamente intacta, pero bioquímica y funcionalmente inactiva (Correa y Zavos, 1994) estos cambios ocurre durante congelación y vitrificación de los espermatozoides; por ello la finalidad del trabajo de investigación fue determinar el resultado de cambio de la temperatura sobre la membrana plasmática y su integridad durante la criopreservación de espermatozoides de alpaca.

Objetivo general

Determinar el efecto de cambio de la temperatura en la integridad de la membrana plasmática en la criopreservación de semen de alpaca.

Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de la refrigeración sobre la integridad de membrana plasmática.
2. Determinar el efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Los primeros trabajos en intentar congelar semen en camélidos sudamericanos fueron insatisfactorios hasta la fecha, esto se debe a las características propias que tienen las células espermáticas de los camélidos, el método de colección, escases de información sobre su estructura y uso de diluyentes (Bustinza, 2001) y aún hay pocos trabajos sobre el estado de los espermatozoides desde la colección hasta su descongelación del semen de alpacas.

Los trabajos realizados sobre la estructura y funcionalidad de la membrana espermática con prueba de HOST en semen fresco son reportados, con el uso de los dilutores en la conservación de células espermáticas de alpacas encontraron 24.3%, 19.1% y 17.9% de integridad funcional de membrana para tris, tes y leche descremada respectivamente (Banda y col., 2010). Con una solución hipo osmótico de 50 mOsm/kg demostró 43.13 ± 17.59 positivo al test de endosmosis en semen fresco (Zirena, 2014). A través la colección de conductos deferentes y con 100 mOsm/l diluido en Tris-YH 46.63 %, Tris-YH + Plasma seminal 46.03 % en semen fresco; Tris-YH 33.51%, Tris-YH + Plasma seminal 40.10 % en semen refrigerado y Tris-YH 21.54 %, Tris-YH + Plasma seminal 27.24 % en semen descongelado. Al evaluarse los cambios sobre la membrana plasmática y su integridad durante la conservación en bovinos encontraron 71,85% en los eyaculados frescos (Rubio y col., 2009).

Considerando un motilidad mínimo de 35% en refrigeración y el tiempo total de enfriamiento aproximado fue 2.5 horas, en la cual obtuvo $38.50 \pm 11.16\%$ positivo al test de endosmosis (Zirena, 2014). Con prueba de HOST en refrigeración del semen, diversos trabajos de investigación demostraron que al adicionar la yema de huevo en los dilutores preservan a las células espermáticas de los mamíferos frente cambio de temperatura, y conservar la estructura de la membrana celular en semen de alpaca

(Bravo y col., 2000), llama (Bravo y col., 2013) y camello (Deen y col., 2003), en el cual los componentes que contienen son capaces de interferir con el metabolismo de la célula y así reducir la viabilidad espermática (Moussa y col., 2002); por lo tanto evaluaron la funcionalidad de la membrana celular espermática con test de endosmosis con crioprotectores en las células espermáticas de alpacas con yema de huevo fresco (YHF) y en polvo (YHP), en la cual reportaron 39.8% y 41.4% respectivamente en refrigeración al 5°C durante 24 horas, 52.0% (García y col., 2017).

Considerando un motilidad mínimo de 35% para la congelación del semen de alpacas, obtuvo $22.82 \pm 9.37\%$ positivo al test de endosmosis después de la descongelación (Zirena, 2014). Al evaluarse los cambios sobre la membrana plasmática y su integridad durante la conservación en bovinos encontraron 50,82% en las muestras descongeladas.

Al evaluar los parámetros de la función espermática de alpaca eyaculado mediante citometría de flujo, encontró que el valor promedio para la viabilidad de los espermatozoides de $57 \pm 8\%$. Se empleó análisis por citometría de flujo para procesar las muestras, usando la tinción SYBR-14 / ioduro de propidio, para la evaluación de la estructura y viabilidad de la membrana celular espermática; la estructura acrosomal se realizó usando etiquetado de aglutinina /ioduro de propidio de *Pisum Sativum* conjugado con FITC. Al evaluar la membrana e integridad de las células espermáticas de alpaca, usando el colorante HOECHST 33342/PI, encontró valores media de la integridad de membrana fue 61.73%; 51.60% y 26.13% en semen fresco, semen refrigerado y semen congelado (Hurtado, 2018). Para determinar de la calidad de las membranas espermáticas en porcinos con el método de la tinción fluorocrómica triple en semen fresco y semen refrigerado fue con membrana plasmática intacta (59,6% y 49,92%), lesionada (16,74% y 10,17%) respectivamente.

1.2. CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

Las alpacas forman parte de una familia de mamíferos ungulados (Camelidae) relacionados con los camellos que habitan África y Asia, que se diferencian por algunas peculiaridades típicas (De Lamo, 2011) como la resistencia a climas y factores desfavorable del Altiplano andino, en el cual la posibilidad de la producción económica de muchas especies de domésticas no es factible. Las comunidades campesinas que habitan en esas zonas, la producción de camélidos es el medio principal de subsistencia.

Los camélidos pertenecen a la Familia Camelidae y forman los géneros Lama y Vicugna. Poseen peculiaridades anatómicas y fisiológicas relacionadas con su adaptación a las condiciones desfavorables de escasez de oxígeno y de forrajes de las grandes alturas en las que habitan (Wheeler, 1991).

1.2.1. La alpaca

Es un mamífero doméstico, genéticamente deriva en su mayoría de la vicuña salvaje y en una menor proporción de la llama (Wheeler y col., 2001).

Hace miles de años se viene realizando su domesticación. Las relaciones entre los demás camélidos sudamericanos y la alpaca fueron debatidas desde años atrás. Durante los siglos XVIII y XIX, al recibir los nombres científicos, se consideraba a la alpaca como sucesora del guanaco (*Lama guanicoe*), razón por la cual se denominó *Lama pacos*, desligándose así sus semejanzas de la vicuña en tamaño, la fibra y dentición. Se complica la categorización luego de demostrarse que todas las especies de camélidos sudamericanos consiguen aparearse entre ellos y tener estirpe fecundo. Al desarrollarse las técnicas de estudios de ADN en el siglo XXI, pudo demostrarse que hay una estrecha relación de la alpaca y la vicuña, y por ello la denominación científica correcta es *Vicugna pacos*, aunque aún había una proporción de su ADN relacionado a la llama, por lo que prácticamente es un taxón híbrido intergenérico (Wheeler, 2001).

1.3. COLECCIÓN DE SEMEN

Para conseguir muestra seminal en camélidos tiene dificultades como: el tiempo de la cópula, la posición, el tipo de eyaculación y donde se deposita el semen, también el aspecto de la muestra, la viscosidad elevada y manejo complejo, por eso es que se investigó por varias décadas un método óptimo para obtener el semen y se pueda manipular las células espermáticas sin perjudicar su viabilidad (Solís, 1997).

Las técnicas de obtención de muestra reportados son muchos, el primero (Mogrovejo, 1952) quien obtuvo muestra seminal de camélidos, a través de una envoltura de látex colocada intravaginalmente previo a la cópula, posterior a la monta se extrae la envoltura el cual a la vez servía como depósito para la muestra seminal. Con esta técnica se logró obtener semen sin embargo aún había percances, debido a que alargaba el tiempo de copula más de lo normal e interfería con la misma. También era dificultoso

la colocación y su fijación de la cubierta en el interior del tracto de la hembra y al mismo tiempo lastimaba e inutilizaban a la hembra para su posterior uso. (San Martín, 1961) utilizó otro procedimiento, emplea trozos de esponja que implantan en la porción delantera de la vagina, estos absorben el semen y todos fluidos vaginales, y sirven como contenedores. A través de esta técnica el semen que se obtiene es demasiado contaminado y está combinado con otros fluidos genitales de la hembra, por ende el semen se diluye y contamina con microorganismos, y esto dificulta su evaluación, por ello no se confía el uso de este método si el fin es la inseminación artificial. En consecuencia, ambas técnicas interfieren con la eyaculación normal y el resultado es que acorta el tiempo de copula, los movimientos del macho son continuos, se forma mucha espuma y hay daño a las células espermáticas (Bravo, 1995) por ello no se recomienda su uso (Bravo y col., 2012). La fístula en la uretra peniana fue otro tipo de colección, sin embargo una de las desventajas fue el cuidado post operatorios y la discapacidad que sufría el macho (Von Kubineck, 1974).

(Fernández-Baca y Calderón 1966) otro método fue el empleo de la electro eyaculación para obtener muestra de semen de alpacas, se utilizó un dispositivo con la intensidad no superior a 40 voltios, se obtuvo muestra seminal con la ventaja de colectar sin la necesidad de tener hembras receptivas, realizar la colección en menor tiempo y a lo largo de todo el año. Este método muestra gran variabilidad de muestras entre animales y aun entre el mismo animal, a la vez se obtiene muestras demasiada diluidas y contaminadas por las secreciones de las glándulas anexas y la concentración espermática es baja (Pacheco, 2008). La sedación profunda del animal o anestesia general es uno de los requerimientos, la contaminación de la muestra por la orina, la imposibilidad para evaluar libido, la concentración espermática inconstante y el bienestar animal son las desventajas de este método (Sumar, 1983; Bravo, 1995). Otra práctica no invasiva y fácil es mediante la recolección por aspiración vaginal post cópula, no obstante, las muestras obtenidas habitualmente son incompletas y contaminadas con sangre (Bravo y col., 2000).

Posteriormente se reporta el uso de una vagina artificial adaptada de ovinos, a la vez que mejora esta técnica de colección, todavía tiene dificultades como es la de mantener una adecuada temperatura durante el tiempo que dura la cópula (Sumar y Leyva, 1981). Luego (Gauly y Leindiger 1996) refirieron el empleo de la frazadilla eléctrica que

recubre la vagina artificial, con esto se obtuvo mejoras en la técnica de colección, a la vez facilitó que la temperatura se mantenga. (Sumar y Leyva, 1981; Garnica y col., 1993) refieren el uso de un maniquí el cual es una alternativa para la obtención de una muestra seminal fisiológicamente normal; no obstante, requiere el adiestramiento de los machos y algunos machos no llegan a aceptar el maniquí; en tanto el uso de una hembra receptiva genera trabajo adicional para el operador. No requerir la anestesia general como en el caso del electro eyaculación son algunas de las ventajas de la vagina artificial para la obtención de semen. Por ello, sería la técnica más habitual para obtener muestra seminal para ensayos de inseminación artificial en camélidos (Bravo y col., 2012).

Anteriores trabajos de investigación demostraron que la técnica más empleada para obtener muestra seminal en camélidos influye en la calidad espermática. Algunos investigadores sugieren el empleo de una estructura parecida a la cervix en la vagina artificial, el cual incrementa la duración de la cópula y disminuye la ocurrencia de anomalías en la pieza intermedia y la cola de las células espermáticas. Otra alternativa es colocar hembras en celo durante la colecta, esto no muestra ninguna consecuencia a lo largo de la copula ni en la calidad de la muestra seminal (Morton y col., 2006).

1.4. FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

1.4.1. Pubertad

Para determinar la edad de pubertad se realizó un estudio de la testosterona sérica en alpacas machos de 9 a 12 meses de edad, estudio que reveló que el inicio de la pubertad ocurre a partir del 11vo mes de edad en el cual la producción media de testosterona no solo se hace mayor sino que se encuentra dentro de los rangos de animales machos adultos (Losno y Coyotupa, 1981) esto es confirmado por estudios realizados que los niveles de testosterona son de 0.231 ng/ml, a los de 18 meses y pasan los 1 ng/ml al año de edad (Carpio y col., 1999).

El inicio de 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).

1.4.2. Espermatogénesis

La producción de espermatozoides es un proceso muy complejo que comprende diferentes fases, estas son: Espermatocitogénesis, el cual comprende desde que estas células germinales primordiales cambian a espermatídes; la siguiente fase es la espermiogénesis; en ésta los espermatídes esféricas son transformados en espermatozoides por cambios que se dan en su morfología y por último es la espermiación, el cual es la liberación de estas células germinales dentro de los túbulos seminíferos (Hafez, 2000) este proceso está regulada hormonalmente por la GnRH que estimula la adenohipófisis que libera la LH para la producción de espermatozoides, que en las células testiculares intersticiales provoca la producción de andrógenos.

También es liberada FSH (Hormona Folículo estimulante), 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).

La espermatogénesis dada a nivel del testículo comprende un proceso sorprendente cambios de las células habituales a partir del crecimiento del feto y luego depositarse en el epitelio germinal antes de que requiera la función generativa, y el resultado da una innovación de estas células germinales en células espermáticas libres y viables (De Alba, 1985).

Estas células germinales primordiales viajan desde el saco vitelino hacia las gónadas aún no diferenciadas durante el proceso de desarrollo embrionario; para formar los gonocitos estas células primordiales se dividen muchas veces, son los mismos que se instalan dentro de los túbulos seminíferos del feto en caso sea macho. Estos gonocitos se dividen y después de que nacen dan origen a los espermatogonios, dicho fraccionamiento se da antes de la pubertad (De Alba, 1985 y Hafez, 2000).

De Alba (1985) menciona que en el aspecto multiplicativo se reconocen en primer lugar las células madres las cuales producen dos espermatogonios del tipo A, uno de los cuales permanece en reposo mientras su compañero se multiplica en dos espermatogonios intermedios, estos en 4 del tipo B y estos tienen dos divisiones sucesivas para formar 16 espermatogonios.

Los 16 espermatogonios tipo B pasan por transformaciones preliminares de las divisiones de reducción o meióticas para formar los espermátocitos primarios los cuales realizan cambios a nivel nuclear progresiva de la profase antes de dividirse para luego dar origen a los espermátocitos secundarios. De 16 espermátocitos primarios se obtienen 32 espermátocitos secundarios que tienen una vida muy corta, pues rápidamente se multiplican en la segunda división meiótica y dan origen a 64 espermátides. El proceso divisional completo desde espermatogonios hasta espermátides dura unos 45 días en el toro (Hafez, 2000 y De Alba, 1985).

En el proceso la fagocitosis de residuos citoplasmáticos (espermiación), las espermátides alargadas se orientan sobre la pared tubular perpendicularmente, sobresalen poco a poco hacia la luz del túbulo seminífero. En epitelio seminífero los lóbulos del citoplasma residual, a través de los cuales se conectan grupos de espermátides permanecen incrustados, la extrusión de los componentes espermáticos continúa hasta que solo un delgado tallo citoplasmático conecta el cuello de la espermátides con el cuerpo residual. La gota citoplasmática se forma con la rotura del tallo a nivel del cuello del espermatozoide liberado (gota proximal). La gota citoplasmática emigra desde la región del cuello hasta un sitio cercano al anillo citoplasmático durante el tránsito por el epidídimo. La gota citoplasmática está presente en un buen porcentaje de espermatozoides, el cual es indicativo de falta de madurez de la célula (Hafez, 2000).

1.5. PECULIARIDADES DEL SEMEN DE ALPACA

La secreción seminal es un fluido que contiene células espermáticas que están suspendidas en un medio líquido denominado plasma seminal (Juyena y Stelletta, 2012). En el caso de la alpaca el eyaculado comprende de 88.5% de plasma seminal y 11.5% de células espermáticas (Garnica y col., 1993). Las particularidades del semen de alpacas es muy inconstante, existen diferenciaciones entre individuos, esto probablemente sea debido a factores ambientales o de la misma especie; dentro de estas peculiaridades asumimos la viscosidad elevada y la concentración baja en células espermáticas (Juyena y col., 2013) la presencia de filancia seminal (Giuliano, 2012) la motilidad progresiva baja (Casaretto y col., 2012) y concentración disminuida de células espermáticas (Morton y col., 2008); la baja concentración de espermatozoides y la

reducida cantidad de volumen de eyaculado se debe al lugar de depósito intrauterino de semen durante la copula, en esta especie (Urquieta y col., 2005).

A comparación de otras especies, el semen de alpaca es muy viscoso, el cual afecta la motilidad (Garnica y col., 1993) y esto dificulta su evaluación, por ende es el principal obstáculo para desarrollar técnicas de reproducción asistida. Aun no se ha documentado el origen de la viscosidad del semen en alpacas, aunque los postulados apuntan que se da por la presencia de glicosaminoglicanos (GAG) o proteoglicanos que son secretadas por las glándulas bulbo uretrales (Perk, 1962). Se encontró que la proteína mucina 5B es la más abundante en muestras de eyaculado de alpaca con una viscosidad elevada en comparación con muestras que tienen una viscosidad baja, por ello se considera a esta proteína como la responsable por la elevada viscosidad; asimismo las enzimas que se encargan de la degradación de los GAG no degradan por completo la viscosidad, en tanto que las proteasas si lo logran, lo que apunta que estas proteínas serían la responsable de la viscosidad en semen de alpacas; siendo la glándula bulbo uretral una de las fuentes predominantes de mucina 5B en semen de alpacas. Así mismo, la viscosidad se reduce con el incremento por el aumento de eyaculados por día (Kershaw-Young y Maxwell, 2012). Indican que la viscosidad del eyaculado de camélidos colectados por vagina artificial disminuye a partir de la tercera colecta (Bravo y col., 1997b).

En el eyaculado de muestra seminal de alpaca, el volumen es demasiado variable, influenciado por la técnica de colecta; no obstante con la vagina artificial y la fistula uretral se obtuvieron mejores resultados (Hafez E. y Hafez B., 2002). El volumen bajo en alpacas y llamas que promedia de 1 a 2 ml es debido a la ausencia de la vesícula seminal (Kershaw-Young y maxwell, 2012). En cuanto al volumen no va a ser afectado por la frecuencia de servicio ni por la raza (Choez y col., 2015b) otros estudios revelan que las muestras de semen colectadas mediante la vagina artificial bajan en volumen al ampliarse la frecuencia de colección (Bravo y col., 2002). En el caso del color del eyaculado de camélidos, depende de la presencia de células espermáticas y la secreción de las glándulas accesorias (Tibary y Vaughan 2006). Predomina el blanco lechoso, sin embargo ocasionalmente es blanco cremoso (Garnica y col., 1993) se observa el aumento de muestras de color translucidos e incoloros al paso que avanza la frecuencia de monta (entre los días 1 y 12) (Urquieta y col., 2005).

Los valores de pH están entre 7.2 a 7.5, ello es un indicativo que tiende a la alcalinidad (Bravoy col1997) la frecuencia de la colecta no poseen un efecto relevante sobre el pH (Galindo, 1995). Las células espermáticas del camélido presenta un movimiento particular oscilatorio del flagelo (Bravo y col., 1997a). En camélidos sudamericanos no se puede apreciar el movimiento progresivo que se da en otras especies, esto se debe a la elevada viscosidad que presenta la muestra (Casareto et al., 2012) cuando el eyaculado va volviéndose más líquido, la motilidad progresiva aumenta (Tibary y col, 1999). Indican que el movimiento oscilatorio se puede observar en muestras con viscosidad elevada y las muestras con una viscosidad baja tienen una motilidad progresiva (Morton y col., 2010b).

Por medio del recuento de células espermáticas en un hemocitómetro se determina la concentración, que esta expresada como el número de espermatozoides por ml de eyaculado (Bravo y col., 1997a). La edad, método de colección, la frecuencia de colecta influyen sobre la concentración, el cual es variable entre reproductores (82 a 250 millones de espermatozoides/ml) (Tibary y Vaughan 2006); también se observó que al interrumpir al macho durante la copula provoca una reducida concentración (Bravo y col., 2002).

1.6. CARACTERISTICAS DE LOS ESPERMATOZOIDEOS DE ALPACA

En el interior de los túbulos seminíferos de los testículos se forman las células espermáticas; el cual tiene una compleja serie de células germinales en desarrollo que posteriormente participaran en la formación de los gametos masculinos (Hafez E. y Hafez B., 2002). En la espermatogénesis, la cual es una compleja cascada de reacciones y eventos como la espermatocitogénesis, donde las células germinales experimentan una sucesión de fraccionamientos mitóticos que dan origen a los espermatogonios tipo A, éstas a su vez pasan por fraccionamientos mitóticos para luego diferenciarse en otros tipos (A1 y A4), las células tipo A4 se diversifican en espermatogonios intermedios, posteriormente se fraccionan una vez más y forman espermatogonios tipo B, que al pasar por una división mitótica generan espermatocitos primarios tetraploides, estos se son sometidos a meiosis I para originar espermatocitos secundarios diploides; luego de culminar la meiosis II se forman espermátides haploides de cada espermatocito secundario; posterior a ello, en la espermiogénesis las espermátides se convierten en espermatozoides por cambios morfológicos graduales, estos cambios implican la

compactación y alargamiento del núcleo, la formación del acrosoma y el flagelo; posterior a ello, en la espermiación las espermátides alargadas que terminaron su madurez y están alineadas en la superficie del lumen del túbulo seminífero serán liberadas (Nishimura y L'Hernault, 2017).

Las células espermáticas maduras serán células alargadas con una cabeza aplanada en el cual se encuentra el núcleo y la cola donde se encuentra la estructura necesaria para la motilidad celular. La célula espermática consta de una membrana plasmática. El acrosoma tiene una pared doble que esta entre la membrana plasmática y la fracción delantera de la cabeza de la célula espermática. La cabeza y la cola está unida por el cuello del espermatozoide, a la vez ésta se divide en segmentos medio principal y caudal (Garner y Hafez, 2002). Las células espermáticas maduras de la alpaca presentan todas las características anatómicas que otros, hallándose anormalidades en su morfología como en otras especies que incluyen anomalías en la cabeza, parte intermedia y cola. Aun no determino el efecto de dichas anormalidades en la fertilidad (Tibary y Vaughan, 2006).

1.7. ESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE

Las células espermáticas de los mamíferos poseen de 3 regiones; cabeza, cuello y flagelo, donde se encuentran la parte media, principal y terminal. A partir de un punto de un panorama funcional, es el transportador de la información genética. Consiguientemente, cabe resaltar que el núcleo está muy condensado y un plasmolema altamente sensible a cualquier cambio térmico y osmótico. (Ampudia, 2017).

1.7.1. Cabeza espermática

La cabeza del espermatozoide tiene una forma aplanada que está formada por el núcleo, acrosoma, parte de la estructura del cito esqueleto y una escasa porción del citoplasma. La cromatina que se encuentra muy condensada, acrosoma, segmento ecuatorial y fosa de implantación constituyen el núcleo. Mediante las proteínas específicas (protaminas) que están unidas entre sí por puentes disulfuro la Cromatina se encuentra compactada. (Ampudia, 2017).

En la fracción anterior del núcleo se localiza el acrosoma, el cual es una cavidad especializada donde se encuentran enzimas hidrolíticas, que son imprescindibles para

que pueda penetrar la zona pelúcida del ovocito durante la fertilización. En el acrosoma se puede distinguir la membrana acrosomal interna y externa (cerca de la cara interna del plasmalema). Durante la reacción acrosómica, la membrana acrosomal y el plasmalema se fusionan y liberan el contenido acrosomal al exterior. Este contenido está mayormente constituido por enzimas hidrolíticas, en el cual las enzimas principales son la hialuronidasa y la acrosina, (estos son fundamentales para penetrar la zona pelúcida del ovocito) (Ampudia, 2017).

La acrosina es una enzima que está presente en el acrosoma en un estado de proacrosina, que luego se convierte en su forma activa en el proceso de reacción acrosómica. Dicha proteasa es diferente de otras similares que están en otros tejidos por su peso molecular y su sustrato, el cual indica que es una isoenzima muy específica de la célula espermática. Por otro lado, la hialuronidasa es una glicosamidasas y al parecer es la enzima específica de la célula espermática, esto debido a que difiere de la forma común de la que se encuentra en el lisosoma en las células somáticas (Ampudia, 2017).

Las alteraciones del plasmalema o del acrosoma son irreparables e irreversibles y pueden producirse por muchos factores, los cuales pueden ser el cambio osmótico, el shock térmico e incluso la alteración del pH. La fracción ecuatorial es debido a una invaginación del plasmalema de la célula espermática, esta se localiza en la parte intermedia de la cabeza. Dicha función con el plasmalema del ovocito es primordial para la fertilización y fecundación (Ampudia, 2017).

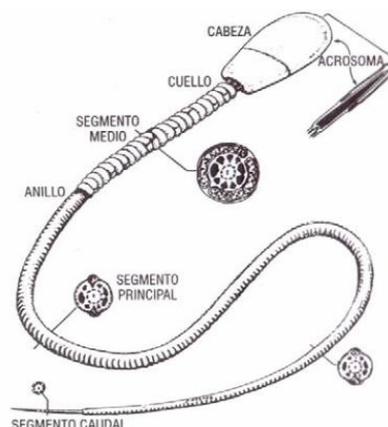


Figura 1.1. Estructura del espermatozoide de mamífero

Fuente: (Hafez, 2000)

1.7.2. Cuello del espermatozoide

Es la estructura que une la cabeza con la pieza intermedia, formada por el capítulo, mitocondrias, centriolo proximal y una serie de estructuras laminadas que proveen una alta flexibilidad a la célula espermática para pueda moverse de lado durante la batida flagelar. Dichos componentes están formadas de tal manera que se alinean al centriolo, del cual se originan las fibras y los micro túbulos de la cola, estas sirven como el eje que organiza para la formación del axonema y las estructuras estiradas. No obstante, no es necesaria la presencia del centriolo para iniciar y propagar el movimiento oscilatorio de la cola (Ampudia, 2017).

1.7.3. Flagelo del espermatozoide

Esta estructura es la que le da el movimiento al espermatozoide y está compuesta de tres regiones: la parte intermedia, principal y terminal. Está constituido en su conjunto por el “axonema” el cual le otorga el movimiento. El axonema está constituida micro túbulos que se agrupan que se agrupan en pares y luego se distribuyen en una central y el resto en periféricos (Ortega, 2011).

La pieza intermedia está caracterizada por contar con una doble hélice de mitocondrias. Dichas estructuras son las responsables del metabolismo celular y la regulación de la muerte celular, se han demostrado últimamente que estas son la fuente de energía intracelular en las especies reactivas de oxígeno. La mitocondria se sitúa alrededor de nueve pares de fibras longitudinales que se denominan como “fibras densas”, las cuales rodean el axonema. La parte intermedia está delimitada por la parte caudal con el anulus, en el cual el plasmalema se condensa. La mayor porción de la cola constituye la pieza principal, conformada por las nueve pares de fibras y el axonema que se extienden a partir de la porción intermedia. Estas fibras van reduciendo en su tamaño para luego desaparecer en la parte final de la pieza principal, la pieza terminal forma la parte final de la cola, dicha porción es conformada por el axonema, el cual no posee vaina fibrosa (Ortega, 2011).

1.7.4. Acrosoma

Es una estructura membranosa que posee una capa doble que se encuentra en la porción anterior de la cabeza de la célula espermática, ésta tiene enzimas hidrolíticas como son la acrosina y hialuronidaza (Ramalho, 2002).

El acrosoma es un orgánulo el cual contiene una serie de enzimas que confieren a la célula espermática la capacidad de penetrar las capas que cubren al ovocito. Luego se liberan al exterior por exocitosis denominada reacción acrosómica. Esto se convierte en el nuevo parámetro que se emplea para evaluar la morfología del espermatozoide, el cual radica en describir la secuencia de malformaciones que puede presentar el acrosoma de la célula espermática en el transcurso en que va avanzando el tiempo. Es por ello que la integridad acrosomal es empleado para evaluar la calidad seminal en todas las especies domésticas. Es fundamental el papel del acrosoma en la fecundación en el cual se distinguen las regiones bien diferenciadas: La parte apical, post apical y la fracción ecuatorial, las cuales suelen fragmentarse durante el proceso de criopreservación. Las muestras que tienen una elevada alteración de daño acrosomal por lo general poseen una fertilidad muy por debajo (Ramalho, 2002).

La integridad del acrosoma es un requisito indispensable para la fecundación, los espermatozoides que son capaces de realizar la reacción acrosómica sincronizada durante la penetración del ovocito tienen la capacidad de atravesar la zona pelúcida, para luego fusionarse con este y dar origen al embrión (Vargas, 2015).

1.7.5. Membrana plasmática del espermatozoide

La célula espermática posee un plasmalema, que recubre al espermatozoide y se amplía en ciertas zonas específicas y es la estructura más externa de la célula espermática. Ésta se encuentra intacta, menos en la porción del acrosoma previo y durante la fecundación o como resultado de la muerte de la célula espermática.

Está compuesta por tres capas: una bicapa lipídica, interfase de fosfolípidos-agua y glycocalix. La primera capa se sub divide en fosfolípidos polares, orientados de una forma en que los grupos polares hidrofílicos se sitúan externamente y los ácidos grasos hacia el interior. En mayor parte de estos lípidos son fosfolípidos y colesterol, a razón de 0.64 a 0.36. La fluidez de la membrana está determinada por la cantidad de colesterol. Cuanto mayor sea la concentración de fosfolípidos mayor será la fluidez del plasmalema. Consecuentemente, el colesterol funciona en conjunto con las proteínas integrales estabilizando y asegurando una configuración de fosfolípidos en una bicapa. Se sabe que el colesterol se concentra en diferentes proporciones en las distintas partes

del plasmalema, donde la mayor concentración se encuentra en la porción del acrosoma (Davies, 1999).

La capa externa (glycocalix), en el espermatozoide de alpaca está formada por polisacáridos. Su función no es muy clara, sin embargo se especula que estaría implicado en la antigenicidad, la permeabilidad específica y la adherencia celular. También se sabe que el glycocalix en su interior posee uniones para las proteínas periféricas. Dichas proteínas periféricas provienen del plasma seminal e intervienen en la estabilización de la célula espermática al momento del paso por el tracto masculino y femenino. Asimismo suelen estar involucradas en el proceso de la capacitación celular (Davies, 1999).

a) Función de la membrana plasmática

A través de la funcionalidad del plasmalema se ha podido apreciar la calidad y viabilidad seminal, ya que es la encargada para que se lleve a cabo la interacción celular y metabolismo espermático normal, no obstante, no es solo significativo para el metabolismo de la célula espermática, si no también es necesario el adecuado intercambio de las propiedades físicas y químicas de la membrana celular para poder facilitar la unión entre el espermatozoide y el ovocito durante la fertilización (González, 2016).

Estas propiedades del plasmalema permiten el intercambio selectivo de las moléculas entre el medio intracelular y el medio extracelular, por ello, al someter a la célula a cambios como el medio hipo-osmótico, el agua ingresa hacia el interior de la célula con la finalidad de equilibrar ambos medios tanto externo e interno de la célula, el cual se denomina equilibrio osmótico. Las células espermáticas que son sometidos a cambios como el medio hipo-osmótico, suelen presentar cambios en su morfología celular, estos cambios son expresados con un hinchamiento del flagelo del espermatozoide (González, 2016).

1.8. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN DE ALPACAS

1.8.1. Motilidad espermática

Es el parámetro más importante durante la evaluación seminal, el cual evalúa el movimiento de las células espermáticas, dicha motilidad es muy importante para que se

lleve a cabo la fertilización (Rivera, 1998). En camélidos no está presente la motilidad total como en otras especies, en este caso, la mejor forma de referirse sería como la motilidad individual y oscilatoria, en cual es un movimiento muy lento debido a la alta viscosidad que presenta el semen de alpaca (Bravo, 1995).

La presencia de viscosidad y filancia dificulta la motilidad, esto se muestra debido a la contracción de la cola en su mismo sitio con un movimiento oscilatorio. Este movimiento debe ser observado seguidamente al terminar la colecta, en el tiempo más corto posible, (Bravo, 2002). Cuando el eyaculado se vuelve más líquido, el espermatozoide incrementa su motilidad progresiva (Tibary y Memon, 1999). Se han reportado porcentajes de motilidad de 34.2 ± 5.3 (Dávalos y Olazábal, 2002).

a) Motilidad individual

Al realizar una mezcla de solución salina fisiológica con una porción de semen se puede observar el movimiento individual de las células espermáticas, esto es observado en el microscopio con aumento de 40X del objetivo del microscopio (Pérez y Pérez, 1990). Dicha motilidad debe ser en forma recta y progresiva hacia adelante, así mismo los espermatozoides que tienen una motilidad progresiva no debe ser menor a 70% de movimiento progresivo y así garantizar la fertilización. (Jara, 2000).

1.8.2. Concentración espermática

La elevada viscosidad del en las muestras seminales de camélidos dificulta la adecuada colección y extensión del semen en el hemocitómetro, cabe precisar que la concentración espermática en la alpaca no es tal alta como en el toro, morueco o sementales, más bien esta entre cientos de miles (Bravo, 1995), en el caso de camélidos es inconstante, posiblemente sea debido a diferencias individuales entre animales y se ven influenciada por el método empleado para la obtención de muestras (Sumar, 1997).

Este parámetro está determinada por la concentración de células presentes en el eyaculado, que se expresa habitualmente en millones por ml (mil/ml). Las técnicas empleadas para calcular dicho parámetro varían en función a la exactitud y rapidez con la que se realizan. Los métodos son diversos, los cuales nos permiten establecer la cantidad de espermatozoides en un eyaculado. Los principales son; el conteo en la cámara de Neubauer y la técnica del fotocolorímetro. Las dos técnicas son muy precisas,

sin embargo aunque la técnica del fotocolorímetro es muy precisa y rápida, el costo de esta técnica es muy elevada a diferencia de la cámara de Neubauer (Delgado, 2013).

1.8.3. Vitalidad espermática

La vitalidad se refiere a la supervivencia de espermatozoides en relación de los muertos después de la colecta. Se reporta una vitalidad de 34.3 ± 4.2 por ciento (Dávalos y col., 2002), también hay reportes que son mayores a 66.50% (Cavalcanti, 2013).

Hay pruebas que permiten evaluar la vitalidad espermática, como las tinciones, las cuales ayudan a diferenciar aquellos espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos, las células espermáticas muertas tienen la facilidad de admitir el paso de estos colorantes por el daño a nivel de la membrana plasmática, a diferencia de las células vivas que impiden el paso de estos colorantes (Lubos, 1983). Es así que clasificando espermatozoides viables y no viables, se observa que las muestras con alta motilidad tienen un promedio mayor del 60% de espermatozoides vivos, las muestras con una motilidad regular se encuentran en un 40 a 60% y aquellas muestras con una baja motilidad, el porcentaje de espermatozoides viables se encuentran por debajo del 40% (Quispe, 1987).

1.9. EVALUACIONES SOBRE EL ESTADO DE LOS ESPERMATOZOIDEOS

Uno de los principales objetivos en la biotecnología reproductiva suele ser el de tener reproductores con una fertilidad probada, esto se logra realizando la evaluación de la calidad espermática, uno de los parámetros es la morfología espermática, que es útil para predecir la capacidad fecundante, la cual se basa en la medición de las estructuras de las células espermáticas y clasificarlas de acuerdo a su calidad y viabilidad, esto permite revelar las anomalías que se pueden encontrar a nivel de la cabeza, pieza intermedia y la cola, otros defectos a nivel del acrosoma y variaciones en su morfología (Maroto, 2012).

1.9.1. Integridad de la membrana espermática

La estructura y funcionalidad de la membrana celular es uno de los parámetros más estudiados, ya que su función es fundamental para la viabilidad espermática. El estado de la membrana celular espermática define la integridad morfológica y funcional de la célula (Rodríguez y col., 1997). Las técnicas como la óptica de contraste diferencial o de Normarski, óptica de contraste de fases y algunas tinciones supra vitales que se

emplean como el verde rápido/eosina, eosina/azul de anilina, azul tripán/Giemsa, el amarillo de naftol/eritrosina son algunas de las técnicas empleadas para la evaluación morfológica. Asimismo los exámenes con la microscopia electrónica de barrido o de transmisión se han empleado establecer los aspectos de la integridad de membrana celular (Rodríguez y col., 2001). No obstante, la mayoría de dichos métodos solo indican información parcial de la estructura y a la vez son costosas y tediosas. Al mismo tiempo, aunque algunos métodos morfológicos informan el daño de la celular, no tienen correlación con la fertilidad, a menos que el daño sea muy importante (Rodríguez y col., 200). Probablemente la técnica más empleada sea la eosina/nigrosina, que tiene un costo bajo y es fácil de realizar. Dicho método permite visualizar espermatozoides muertos y con una membrana alterada de color rosado y los espermatozoides vivos de un color blanco sobre un fondo de color púrpura (García y col, 1994).

Para que el espermatozoide sea móvil, la integridad de membrana celular es el requerimiento mínimo. Las células espermáticas con la membrana plasmática dañada o alterada no son capaces de conservar las concentraciones de iones citoplasmáticos y de cofactores fundamentales como el nucleótido adenina, que son imprescindibles para su movimiento flagelar del espermatozoide. Posiblemente una fracción de células inmóviles mantiene aparentemente algún grado de integridad del plasmalema y aún tiene la capacidad de excluir los marcadores que suelen indicar la muerte celular a pesar de que algunos cambios hacen que se encuentre inmóvil (Rota y col.,, 1998).

Se han realizado diversos trabajos de investigación, las cuales permitieron diferenciar células espermáticas viables y no viables utilizando esta tinción, simultáneamente otros métodos (Bamba, 1988). En la actualidad se utilizan varias técnicas de tinciones fluorescentes, estas técnicas presentan una mayor precisión para el estudio de la membrana plasmática y sus características (Harkema y Boyle, 1992). Es así que, se ha empleado bastante el di acetato de carboxifluoresceína y el Ioduro de Propidio, dichos métodos permiten percibir los espermatozoides viables de color verde y los no viables de color naranja (Magistrini y col, 1997). A la vez hay otros métodos que valoran la membrana celular y su integridad, en el cual no hay inclusión de colorante ya que esta integra la membrana celular y son conocidas como conteo de células vivas y muertas, en el cual se requieren combinaciones como la eosina/nigrosina/Giemsa, Hoeschst 33342/Ioduro de Propidio y SYBR-14/ Ioduro de Propidio (Smith y Murray 1997).

1.10. TÉCNICAS PARA LA EVALUACION DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

1.10.1. Tinción de Hoechst 33342/IP

Para la evaluación del plasmalema se utiliza un método de doble tinción fluorescente con Hoeschst 33342/PI o SYBR14/PI.

La tinción Hoechst 33342 ingresa a través de la membrana celular y se adhiere específicamente al ADN. Los espermatozoides son marcados de color azul. La tinción PI (yoduro de propidio) ingresa exclusivamente a las células con membrana dañada. Se sobrepone al colorante Hoechst las células espermáticas con membranas dañadas se tiñen de un color rojo/ violeta. Sobre esta base, el sistema AndroVision® establece el porcentaje de espermatozoides con membranas dañadas o intactas. Por otro lado se puede evaluar el daño del acrosoma a través de la tinción de fluorescencia con H33342/FITC-PNA. (Muiño, 2007).

El yoduro de propidio es una de las técnicas más empleadas para reconocer células no viables. Este colorante ingresa a las células que tienen daño a nivel de la membrana o alterada, ésta se adhiere al núcleo, al excitarse por la longitud de onda adecuada (510-560nm), expresa fluorescencia de color rojo. Aparte del yoduro de propidio, hay otros marcadores específicos para las células no viables que tienen un efecto similar como es el Hoeschst 33258 (Muiño, 2007).

El colorante que posee el mecanismo similar al de SYBR-14, que tiene la capacidad de diferenciar espermatozoides vivos es el Hoechst 33342. Dicha tinción ingresa a las células vivas y tiene la capacidad de unirse al ADN, no obstante, el uso se limita por la longitud de onda que emplea para su espectro de excitación, el cual se encuentra dentro del rango UV. Los citómetros en su mayoría cuentan con un láser que posee una longitud de onda de 488nm, y al evaluar las muestras marcadas con Hoeschst 33342 es necesario contar con un láser de longitud de onda menor (Muiño, 2007).

Los espermatozoides bovinos se tiñeron con Hoechst 33342. La distribución de fluorescencia de los espermatozoides teñidos era compleja. Los espermatozoides no móviles mostraron una fluorescencia más alta que los espermatozoides móviles.

El perfil de fluorescencia de los espermatozoides móviles fue bimodal (Keeler y Col., 1983).

La tinción Hoechst es un fluorocromo de ADN que se emplea para la microscopia de fluorescencia y para la disociación celular por la citometría de flujo (FACS). Esto ya que tiene la capacidad de tinción del ADN, a la vez se utiliza para la visualización del núcleo y mitocondria de las células. Habitualmente utiliza dos bisbenzimidazoles que están relacionados: Hoeschst 33258 y 33342. Uno y otro colorante es excitado por una luz ultravioleta con una longitud de onda muy cercana a 350nm que emiten una fluorescencia azul con una emisión máxima de 461nm (Muiño, O.R., 2007).

Esta tinción se puede emplear en células vivas como en células fijadas, a menudo se usan en reemplazo de otra tinción de ácidos nucleicos. El DAPI es diferente porque tiene el grupo etilo adicional de Hoeschst 33342, el cual le confiere un comportamiento más lipófilo, es por ello que atraviesa fácilmente la membrana de la célula (Keeler y Col., 1983).

a) Características de la mancha fluorescente Hoechst 33342

- Tinción fluorescente de colorante azul Hoechst específica para ADN (es decir, núcleos de células eucariotas)
- Proporcionado convenientemente como una solución de colorante Hoechst fácil de usar (20 mM)
- El colorante celular permeable a las células es eficaz para la tinción de células fijas y células vivas
- Cotratinción: ideal para usar junto con la detección de dianas específicas con anticuerpos fluorescentes para microscopía de fluorescencia o detección de alto contenido (HCS) (Keeler y Col., 1983).

b) Propiedades del tinte fluorescente Hoechst

Como colorante de contraste en las imágenes fluorescentes, el colorante Hoechst es compatible con anticuerpos y otras sondas marcadas con fluoresceína y colorantes de rodamina, así como con Thermo Scientific DyLight Fluors. La solución madre acuosa estable 20 mM está esencialmente listo para usar (Keeler y Col., 1983).

Hoechst 33342 se utiliza para teñir específicamente los núcleos de células y tejidos vivos o fijos. Esta tinción se usa comúnmente en combinación con la marcación 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) para distinguir la cromatina compacta de los núcleos apoptóticos, para identificar las células replicantes y para clasificar las células en función de su contenido de ADN. Hoechst 33342 y el yoduro de propidio se utilizan con frecuencia conjuntamente para el análisis simultáneo de imágenes de fluorescencia y citometría de flujo de las etapas de la apoptosis y la distribución del ciclo celular (Muiño, 2007).

1.10.2. Test de endosmosis

La evaluación convencional del semen se ciñe a varios parámetros tanto macroscópicos (volumen, color) y microscópicos (concentración, motilidad y vitalidad). Sin embargo estos solo indican la funcionalidad del macho y no son indicadores de la fertilidad, así como también de su ciclo hormonal y espermatogénico (Calamera, 2004).

Pese ello, la mayoría de estudios que se realizan en nuestro medio están orientados al manejo y conservación de células espermáticas de animales domésticos que incluyen parámetros limitados. Sin embargo, existen técnicas especializadas que están diseñadas con la finalidad de estimar la capacidad fecundante de una muestra de células espermáticas. En ese sentido, se evalúa la estructura, integridad y funcionalidad de la membrana plasmática, así como de la integridad acrosomal podría ser un indicador de la funcionalidad de las células espermáticas de ovinos. De esta manera, diseñaron el método de la doble tinción que contribuye en la evaluación en simultáneo de la viabilidad espermática con la integridad acrosomal para diferentes especies domésticas, entre ellas el ovino (Didion y Graves, 1986).

Por otro lado, se ha desarrollado una técnica (prueba hipo osmótica) el cual permite la evaluación de la integridad de la membrana plasmática en espermatozoides de humanos, la cual ha sido relacionada (Jeyendran y col., 1984).

El test hipo osmótico (HOST) es un método de prueba funcional, en el cual las células espermáticas vivas se someten a una incubación en un medio hipo osmótica, los espermatozoides que poseen una estructura funcional de la membrana permiten el

ingreso de agua hacia el interior por ósmosis, el cual se evidencia por el abultamiento o enrollamiento de la cola (endósmosis) (Jeyendran y col., 1984).

Para que se pueda hacer efectivo la fecundación no puede atribuirse solo a la total de espermatozoides vivos, motiles y normales que se depositan en el interior del tracto de la hembra, lo más importante es su funcionalidad (Petrunkina y col., 2007). Anteriores estudios muestran que aquellos espermatozoides colectados del epidídimo al ser sometidos al test hipo osmótico en una solución de 100 mOsmol, lograron respuestas de 89.09% (Rodríguez, 2009), así demostrando una respuesta mayor en espermatozoides libres de plasma seminal. El rango de porcentaje de endosmosis en semen de alpaca obtenido por electro eyaculación utilizando solución hipo osmótica de 100mOsmol fue de 20 a 62 % (Giuliano y col., 2010) a diferencia de semen entero de alpacas, donde se empleó solución hipo osmótica de 150 mOsmol se obtuvo un porcentaje de 23.5% (Pacheco y col., 2011). En muestras colectadas por vagina artificial que fueron sometidas al test hipo osmótico, se reportó una respuesta positiva de 40% empleando un medio de 100 mOsmol (Giuliano y col., 2007). Demás informes en llamas muestran 33.48% en muestras colectadas por electro eyaculación y 30.15% en muestras colectadas mediante la vagina artificial empleando un medio hipo osmótica ajustado a 50 mOsmol (Giuliano y col., 2008).

1.11. PRESERVACIÓN DEL SEMEN DE ALPACAS

Para mantener viable las células espermáticas se necesita conservar en un medio neutro, para ello hay tipos de conservación.

1.11.1. Refrigeración o enfriamiento del semen

El proceso de refrigeración de la muestra seminal tiene por finalidad bajar el metabolismo energético de las células espermáticas, así extendiendo la viabilidad y su capacidad fecundante al paso del tiempo. Las muestras seminales de mamíferos, son muy sensibles descenso de temperatura (shock térmico), dando como consecuencia el aumento de espermatozoides muertos, cambio en distribución de lípidos en la membrana y el incremento de la presencia de calcio intracelular. La refrigeración a 4° y 5°C permite conservar el semen por un lapso de 2 a 3 horas (Manosalva, 2005).

Poder conservar las muestras seminales in vitro requiere de un importante y especial cuidado en cómo se realiza el enfriamiento, ésta ser lenta y progresiva. El descenso de temperatura a 15°C y 5°C se debe realizar en un lapso de 1 a 1,5 h y de 2 a 3 h, respectivamente. La técnica más empleada para preservar la muestra seminal por un tiempo mayor a 24 horas se realiza con un descenso progresivo de la temperatura. La movilidad se detiene por completo a 5°C, esto se reestablece al elevar la temperatura a los niveles normales, esto será posible si es que no hubo daños de la estructura ocasionada por el shock térmico (Delgado, 2013).

Una lenta velocidad de enfriamiento provoca inicialmente la formación de hielo extracelular. Esto motiva concentraciones crecientes de sales y superiores de osmolaridad, así como un cambio de pH del medio líquido extracelular. La salida compensatoria de agua puede provocar alteraciones irreversibles del volumen celular (encogido), el aumento de la concentración iónica dentro de la célula y alteraciones de membrana, y enfriamientos rápidos evitan la salida de agua intracelular y origina la formación de cristales de hielo intracelular, con la consecuencia de lesiones mecánicas de la membrana espermática. Otra consecuencia puede ser la formación de indeseables estados eutecticos intracelulares (Busch y Waberski, 2007).

La preservación de la células espermáticas a 5°C puede tener muy nocivos, como el descenso de un 40% de la actividad metabólica intracelular de los iones Na^+/K^+ , esto ocasiona un marcado descenso el en transporte de iones a través de la membrana plasmática, provocando un descenso en la sobrevivencia de las células espermáticas (Delgado, 2013).

a) Efecto de la refrigeración en la membrana espermática

El efecto de enfriamiento durante la refrigeración ocasiona un cambio a nivel de la estructura de la membrana plasmática, esto es similar a lo que sucede durante la capacitación, independientemente del diluyente que se emplea, la tasa de dilución, la temperatura o condiciones de almacenamiento; los daños a nivel celular es debido al aumento en el tiempo de almacenamiento y la disminución de la capacidad en el control del ingreso de iones de calcio. Este último se asocia con el proceso de capacitación, hiperactivación y la reacción acrosómica. En los espermatozoides de mamíferos, hay una distribución heterogénea de proteínas del cito esqueleto que están asociadas a la

membrana plasmática, por ello son más sensibles a algunos cambios como el de la temperatura (Delgado, 2013).

La membrana celular de los espermatozoides al ser dañada por el cambio de temperatura tiende a sufrir alteraciones en su permeabilidad y estructura, éstos se ven reflejados en las funciones metabólicas, estas a su vez perjudican la movilidad y su capacidad de fecundación. Para la interacción con el ovocito, las células espermáticas tienen que estar motiles, viables y tener la membrana celular y acrosomal funcionalmente intactas (Vargas, 2015).

1.11.2. Congelación del semen

Los espermatozoides actualmente pueden conservarse en nitrógeno líquido a una temperatura baja de -196°C y sobrevivir con fertilidad relativamente alta después de su descongelamiento, sin embargo muchos de los espermatozoides existentes mueren o se encuentran inmóviles como resultado de la congelación y descongelación (Gómez, 1984). Se teoriza respecto a la congelación y descongelación que por lo menos el 50% de las células espermáticas mueren o se hacen inmóviles en el proceso de congelación y descongelación (Salisbury y col., 1982).

Al paso en que la temperatura desciende inferior al de la congelación, el semen pasa por un enfriamiento elevado, cuando la temperatura baja más del sobre enfriamiento, se empiezan a formar cristales de hielo extracelular. La acumulación de estos cristales eleva la acumulación de solutos como el azúcar, minerales y proteínas. Como consecuencia a este proceso de presión osmótica de un desarrollo nuevo y por ende el líquido dentro de la célula espermática es más lento en formar cristales de hielo a comparación con el líquido extracelular, el agua sale al exterior de la célula espermática, como consecuencia la célula espermática se deshidrata. El nivel de líquido en los espermatozoides va a función de la velocidad de descenso de temperatura, cuanto más sea el tiempo para la salida de agua, la deshidratación será mayor. En consecuencia se disminuye la posibilidad de que se puedan formar cristales de hielo dentro de la célula espermática, el cual causaría un daño físico considerable (Vargas, 2015).

Para tener éxito durante la conservación de semen, son importantes numerosos factores: la interacción de los crioprotectores, las características del diluyente, la rapidez de

enfriamiento, la rapidez con que se descongela y almacena, también las características y peculiaridades del reproductor. Un buen porcentaje del descenso de la viabilidad de los espermatozoides es irreversible, esto se debe al manejo pre y post proceso de congelación del semen (Vargas, 2015).

a) **Efecto de la congelación sobre la membrana plasmática**

El componente principal del plasmalema celular de los espermatozoides es, una doble cadena de fosfolípido, donde los complejos proteicos se localizan distribuidos al azar. Al estar intactos, estas están en estado fluido que es primordial para su funcionalidad normal. Al momento del descenso de temperatura, estos lípidos pasan una transición a la fase cristalina y luego a una fase de gel. Cuando llegan al estado de gel, estos lípidos suelen agregarse, estas forman pequeños dominios en áreas aun fluidas. Los lípidos agregados son incapaces de integrar con aquellas proteínas que están agrupados con otros lípidos. Los extremos de estos micro dominios cambian a áreas más sensibles que están propensas a la fusión o ruptura, también son más permeables a los iones. Los espermatozoides al estar perturbados en los iones Na^+ y Ca^{++} que ingresan a la célula, estas son extraídas por un proceso de transporte activo con gasto de energía (Vargas, 2015).

Después del descongelamiento las lesiones producidas en la estructura de la membrana antes y durante la criopreservación solo serán revertidos parcialmente, especialmente la membrana celular a nivel de la pieza principal, media y cabeza, siendo dañada inevitablemente (Canorio, 2008). Durante la separación de la fase lipídica estas proteínas integrales que se encuentran en la membrana plasmática se agrupan y con ello alterar su funcionalidad, en especial aquellas proteínas de los canales iónicos. En consecuencia la se incrementa la permeabilidad de la membrana después del proceso de congelación. El calcio y su regulación se ven alterados y esto afecta la función celular. En casos más severos, se vuelve incompatible con la viabilidad de la célula espermática. El estrés osmótico y la formación de hielo dentro de la célula ocasionan un descenso notable en la viabilidad espermática como se menciona con anterioridad. A la vez la criopreservación afecta a las proteínas intracelulares. Como consecuencia las proteínas que están involucradas en el transporte de sustancias por la membrana plasmática como las funciones enzimáticas disminuyen en su actividad a bajas temperaturas (Vargas, 2015).

1.11.3. Descongelamiento del semen

La descongelación rápida minimiza esencialmente los daños por descongelación, ya que se reduce al mínimo la cristalización del agua exterior, lo que podría lesionar la membrana. Un problema potencial de la descongelación lenta son las alteraciones osmóticas, ocasionadas por el ingreso de agua en las células, que se considera superior frente a la salida de agua en la congelación. Al realizar la descongelación las células espermáticas se encuentran susceptibles realmente a un cambio considerable en el gradiente osmótico que se origina al disminuir la concentración salina del medio circundante. Durante la descongelación lenta, las células están expuestas más tiempo a un continuado estrés hipo osmótico, sin que la reducción compensadora del volumen que esto lleva consigo pueda provocar una reducción del volumen celular. En términos generales los espermatozoides descongelados a temperaturas elevadas originan superiores resultados. Sin embargo, en un estudio de campo no pudieron evidenciar diferencias entre descongelaciones practicadas a 35°C y temperatura ambiente (Busch y Waberski, 2007).

a) Efecto de la descongelación sobre la membrana plasmática de espermatozoides

La estructura, función y la funcionalidad fisiológica celular se ven afectadas después de la congelación, esto posiblemente a los cambios ocurridos durante la conservación, aunque esto podría ser reversible. El grado de lesión a nivel de la membrana celular y la posibilidad de que se pueda recuperar luego del descongelado, dependen en gran medida del área recorrida por los crioprotectores a partir de punto fisiológico normal hasta el área de formación de los grupos durante la criopreservación (Drokin, 1998).

En el área celular, en el cual no se forman grupos, supuestamente el daño se debe a una deficiente diferenciación y maduración de la membrana celular, en consecuencia no se lleva a cabo el proceso de difusión lateral de las moléculas, el cual conlleva a la distorsión y daño celular, a comparación con las células espermáticas que tuvieron una mayor diferenciación de la membrana celular el cual sí permite una adecuada formación de grupos (Drokin, 1998).

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. UBICACIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Asistida, en 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., con una temperatura promedio de 12 - 18°C, precipitación pluvial promedio de 500 mm, humedad relativa de 40 – 50%, latitud sur a 13°10'09" y 74°11'53" longitud oeste (SENAMHI, 2013).

2.2. DURACIÓN

El trabajo de investigación se realizó en un tiempo de tres meses, desde el mes de enero a marzo del 2019.

2.3. MUESTRA

31 muestras de eyaculados de alpaca. El tamaño muestral se determinó por un muestro no probabilístico.

2.4. MÉTODO PROCEDIMENTAL

2.4.1. Recursos disponibles

a) Recursos humanos

- Tesista
- Asesor

b) Recursos biológicos

Plantel de reproductores de alpacas machos del INIA – CANAAN- Ayacucho

2.4.2. Materiales y equipos

a) Materiales

- Tubos eppendorf de 250µl color marrón y transparente.

- Tubos eppendorf de 2.5ml
- Tubos falcon de 15ml y de 50ml
- Tips para Micropipetas de 10, 20, y 1000µl
- Micropipetas de 10, 20,1000µl
- Bolsas plásticas 12x10 cm
- Cinta masking tape de 24 mm x 40 m
- Guantes descartables
- Tubos PVC de 2"
- Conos y fundas de látex
- Pajillas de 0,5 ml
- Portaobjetos de 75 X 25 mm
- Cubreobjetos de 20 x 20 mm
- Gradillas

a) Equipos

- Equipo de análisis seminal (Sistema CASA)
- Microscopio óptico
- Microscopio de contraste de fases
- Baño María
- Incubadora
- Refrigeradora
- Autoclave
- Vortex
- Balanza analítica
- Platina térmica
- Estufa

b) Otros

- Mameluco
- Guardapolvo
- Cámara fotográfica
- Cronómetro

- Frazadillas y franelas
- Maniquí de alpaca
- Tijera y Papel toalla
- Inflador
- Tanque de nitrógeno líquido
- Nitrógeno líquido
- Agua destilada
- Dilutor Optixell

c) Reactivos

- Tinción Hoechst 33342/PI
- Reactivo de HOST
- Tinción eosina (2%) nigrosina (4%)

2.5. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

1. ¿Cuál será el efecto de la refrigeración sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoide de alpaca?
2. ¿Cuál será el efecto de la criopreservación sobre la integridad de membrana plasmática de espermatozoide de alpaca?

2.6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

2.6.1. Armado de la vagina artificial y recolección de semen de alpaca

- Por el interior de un tubo de PVC, se pasó la funda de látex, doblando uno de sus extremos.
- La bolsa cortada de polietileno se fijó al tubo antes de la recolección de semen.
- La bolsa con el tubo falcón se fijó al tubo de PVC para la colección de semen.
- Se procedió a realizar un ligero jalón al látex y luego el llenado de agua atemperada a 42°C en el espacio entre el tubo y el látex, después se fijó con las cintas de jebe.
- Se infló aire por el pitón, para una ligera presión en el interior de la vagina.
- Se colocó un capuchón al tubo falcón para mantener la temperatura y evitar la exposición a la luz la muestra para que los espermatozoides recolectados puedan sobrevivir.

- Se envolvió la vagina armada con una bolsa de agua (chola) que contenía agua caliente y se recubrió con la franela exteriormente para poder mantener la temperatura.
- Se procedió a limpiar la zona del periné del maniquí y se adiciono gel para facilitar la entrada de la vagina artificial,
- Se colocó la vagina armada al maniquí.
- Se procedió a la colección de semen registrando el tiempo de inicio y fin de la copula.
- Una vez que el macho ha terminado la cópula, se retiró la vagina del maniquí. Inmediatamente se retiró el tubo falcon protegido con el capuchón.
- Se realizó la evaluación macroscópica y microscópica del semen

2.6.2. Análisis macroscópico del semen

- Después de la colección de semen el tubo con la muestra se colocó inmediatamente a Baño María a 37°C.
- Se observó el eyaculado en laboratorio, tratando de evitar el contacto directo con la luz solar, y se evaluó las siguientes características macroscópicas.

a) Volumen

- Se evaluó el volumen de la muestras seminal

b) Color

- Se evaluó el color de la muestra; esto se realizó mediante una valoración subjetiva, ya que no hay parámetros e indicadores específicos para la evaluación del color de las muestras de semen.

c) Espuma

- Se evaluó la cantidad de espuma en la muestra.

d) Filancia

- Con una micropipeta se extrajo 10ul de semen, realizando un jalón de la muestra hacia arriba hasta que se rompa el hilo formado y esto se midió con una regla graduada en cm.

2.6.3. Análisis microscópico del semen

Después del análisis microscópico se realizó la evaluación microscópica, se evaluó los siguientes parámetros.

a) Motilidad individual

- Con un micropipeta se tomó 10µl de semen puro y se colocó en una lámina atemperada.
- Se observó al microscopio óptico de campo claro a 40x, la motilidad con valores de porcentaje de 0 a 100% de acuerdo a su movilidad.
- Se realizó la dilución de la muestra, se usó el dilutor Optixel para la evaluación en refrigerado y congelado.

b) Vitalidad

- Se usó la solución acuosa de eosina al 2% y de nigrosina al 4%, como medio de contraste (mezcla) para la evaluación de la vitalidad.
- Se tomó con una Micropipeta de 10 micro litros de semen y se agrega 10 micro litros de colorante mezclado que se colocó en lámina portaobjeto, se homogenizó y se efectuó un frotis espermático.
- El frotis se secó a temperatura ambiente y luego se visualizó en el microscopio óptico con un aumento de 100X con aceite de inmersión.
- Se observó espermatozoides muertos de color rojo o violeta y los vivos color transparentes.
- Se contó 100 espermatozoides entre muertos y vivos, se realizó cuatro repeticiones. Este parámetro se expresa en porcentaje (%) de espermatozoides vivos.

2.6.4. Refrigeración del semen

- En un Baño María a 37°C se preparó el diluyente Optixell en un tubo falcon y se atemperó.
- Se procedió a efectuar la dilución de un solo paso para la refrigeración y congelación del semen, dicha dilución se realizó en una proporción de 1:1 de la muestra del semen y diluyente.

- Una vez terminada la dilución, se procedió al acondicionamiento a medio ambiente y luego enfriamiento o refrigeración del semen, con el objetivo de lograr que el semen baje de una temperatura de 37°C a 5°C en un tiempo promedio de 2 horas.

2.6.5. Congelación del semen

- Se evaluó la motilidad y concentración de la muestra diluida y refrigerada, las muestras con una motilidad mayor al 50% serán congelados.
- Las pajillas se colocó en la refrigeradora a 5° C por 10 min para adaptar a la misma temperatura del semen.
- Se preparó un envase con agua y cubos de hielo a 5°C para adaptar las pajillas con el semen que se congelará evitando el shock térmico.
- Para el llenado se utilizó una jeringa de tuberculina adaptado con un tips de 20µl.
- Se absorbió el semen en las pajuelas de 0.5 ml y se selló con alcohol polivinílico con 3 a 4 golpes y se sumergió rápidamente en el agua a 5°C este proceso se realizó lo más rápido posible para evitar cambios de temperatura
- Con una regla se midió el nivel de nitrógeno en el tanque criogénico
- Del nivel se midió 10 cm hasta donde llega la base de los cilindros del tanque y se acondiciono la canastilla de congelación a ese nivel.
- Se introdujo la canastilla con las pajillas y se congelo, la congelación se realizará en tres tiempos graduales de 5 minutos cada uno con un descenso de 3 cm cada cinco minutos. Transcurrido los 15 minutos se sumergió al nitrógeno líquido.
- Se cambió a otro tanque apto para congelar y se sumergió en el nitrógeno líquido a -196°C.

2.6.6. Descongelación de semen

- Para la descongelación de semen se sacó al azar una pajilla del tratamiento correspondiente y se sumergió inmediatamente en agua tibia a 37° C contenida en un termo de descongelación, por un tiempo de 30 segundos.
- Cumplido el tiempo se sacó la pajilla del agua y se secó con papel toalla.
- Se cortó un extremo de la pajilla con la corta pajuela y se colocó una gota de semen sobre la lámina portaobjetos atemperada a 37°C.

2.6.7. Evaluación de la integridad de membrana espermática

Después de realizar la valoración de los parámetros espermáticos de la muestra se procedió a la evaluación de la integridad de membrana espermática en semen fresco, refrigerado y descongelado a través de dos técnicas: (Hoechst 33342/PI), y la prueba de HOST (test endosmótico), además se realizó las pruebas de motilidad y vitalidad.

a) Evaluación de la integridad de la membrana espermática (Tinción fluorescente Hoechst 33342/PI)

- Se atempero las muestras de semen de alpaca a 37°C
- Se usó un tubo eppendorf color café con 250µl Hoechst 33342/PI
- Para 10µl de la muestra de semen precalentada se agregó 1.5µl de la mezcla colorante de Hoechst 33342/PI.
- Se homogenizó en el tubo eppendorf.
- Se Incubó la muestra de 10µl de semen más 1.5µl de Hoechst 33342/PI por 15 min a 37°C.
- Se colocó una gota sobre el portaobjetos y cubrió la laminilla cubreobjetos.
- Se entró al sistema Androvisión CASA luego en “análisis avanzado” después modulo “viabilidad”
- Se observó a un aumento de 20x con fluorescencia en Androvisión (Sistema CASA)
- El análisis de integridad de membrana se realizó en semen fresco, semen refrigerado y semen congelado.
- Se analizó en cinco campos diferentes para sacar un promedio, luego se observó las células espermáticas con la membrana dañada que aparecen de color rojo y las células espermáticas de color azul tienen membrana intacta. El análisis de los datos se realizó con el Análisis estadístico de ANVA con el DCA, se aplicó análisis de varianza con una confianza de 95% ($\alpha=0,05$).

b) Evaluación de la integridad de la membrana espermática (Test de endosmosis)

- Se preparó el reactivo de test de endosmosis de acuerdo al siguiente protocolo.
- Se pesó el Citrato de sodio (0.06125g) y la fructuosa (0.1125g), esto se mezcló en 50ml de agua milli Q y se guardó en refrigeración como solución stock
- Se atempero las muestras de semen de alpaca a 37°C.
- Se usó un tubo eppendorf de 250µl.

- Se tomó 100µl de la solución del test de host y se adiciono 10µl de semen, luego se homogenizó.
- Se llevó a incubación a 37°C por una hora.
- Se obtuvo 10µl de muestra de la mezcla incubada y se colocó en una lámina porta objetos.
- Se realizó un frotis, se dejó secar al aire.
- Se realizó el conteo a un aumento de 40x, se contó un total de 200 células y se sacó en porcentaje. Los espermatozoides con respuesta positiva tendrán una reacción con cola enrollada y en los negativos no habrá ninguna reacción.

2.7. DISEÑO ESTADÍSTICO

Se realizó el Análisis estadístico de ANVA con el diseño completamente aleatorizado (DCA), se aplicó análisis de varianza con una confianza de 95% ($\alpha=0,05$). Los datos se organizaron en tablas y figuras para determinar la integridad de membrana espermática en los tres tipos de semen (fresco, refrigerado y congelado) y saber si hay diferencias o no en la integridad en los tres tipos de semen, correlacionando con sus características microscópicas.

$$Y_{(ij)} = \mu + t_i + \xi_j(i)$$

Dónde:

Y = es la variable de respuesta de interés.

μ = promedio general de la población sobre la cual se está trabajando

t = es la variación que se atribuye a los niveles del factor que se está evaluando (efecto de los tratamientos).

ξ = es la variación de los factores no controlados (el error experimental)

i = i -ésimo tratamiento

j = j -ésima repetición de cada tratamiento

$j(i)$ = es la variación de las unidades experimentales anidado en los tratamientos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DE SEMEN (ml)

Tabla 3.1. Volumen en semen fresco

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio ± D.E. (ml)	C.V. %
31	0.3°	2	1.22± 0.55	45.08

En la (tabla 3.1) se observa el volumen de semen fresco promedio de 1.22 ± 0.55 ml obtenido mediante vagina artificial, este resultado es ligeramente superior a lo reportado por (Cavalcanti, 2013) de 1.17 ± 0.91 ml realizados en inicios de época reproductiva (noviembre y diciembre). Estas investigaciones demostraría que el volumen seminal está influenciada por las épocas del año (Huanca et al., 2011). A si mismo hay reportes superiores al presente trabajo de investigación presentados por (Ramírez, 2017) y (Raymundo y col., 2000) quienes obtuvieron promedios de 1.68 ± 0.88 ml y 2.7 ml, el primer autor reportó en finales de la época reproductiva suplementado con heno de alfalfa, el segundo trabajó se realizó durante los meses de febrero y marzo; (Bravo y col., 2002) quien indica 2.4ml de volumen. Se podría afirmar que en la época reproductiva media hay mayor producción de semen correlacionado a la producción hormonal, esto demuestra la influencia de la época reproductiva al volumen espermático (Ramírez, 2017).

Estos resultados nos permiten afirmar que los parámetros espermáticos se mantienen muy poco alterados sin importar la época del año ya que el presente trabajo de investigación se realizó en temporada reproductiva a diferencia de los trabajos citados. Además el bajo promedio del volumen en el presente trabajo de investigación se deba probablemente a la presión de colección a los que fueron sometidos los machos, ya que

la frecuencia elevada de colectas afecta de forma negativa el volumen del eyaculado (Pacheco, 2008).

3.2. EVALUACIÓN DE LA ESPUMA DEL SEMEN (ml)

Tabla 3.2. Volumen de espuma en semen fresco

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio ± D.E. (ml)	C.V. %
31	0.0	4.5	1.5±1.43	95.33

La (tabla 3.2) demuestra el volumen promedio de espuma en semen fresco de alpacas que fue 1.5±1.43ml, este resultado es similar a lo reportado por (Ramírez, 2017) quien obtuvo 1.13 ± 2.09 en machos adultos y en finales de época reproductiva; a la vez es similar al trabajo de (Mendoza, 2015) quien obtuvo 1.44 ± 1.98 ml, trabajando con 28 muestras de eyaculados a comparación que en el presente trabajo de investigación se realizó con 31 muestras de eyaculado. Por otro lado hay trabajos que demuestran la superioridad al presente estudio reportados por (Olaguivel y Naveros, 2014) demostraron 3.60±1.11ml de espuma en promedio utilizando hasta 84 eyaculados; (Cavalcanti, 2013) quien encontró un promedio de 3.03 ± 3.32ml trabajando con 48 eyaculados para la evaluación respectiva. Por lo tanto es posible que a mayor números de eyaculados y mayor tiempo de cópula se observará mayor medida de la espuma colectados a través de la vagina artificial (Ramírez, 2017) dónde genera movimientos de rotación del pene a través del proceso uretral dentro del tubo de la colecta en la cual el animal intenta simular lo que sucede en la hembra al eyacular en uno y otro cuerno uterino (Giuliano, 2012) por ende la colecta de semen con vagina artificial presenta altos porcentajes de presencia de espuma (Von Baer y Hellemann, 1998).

3.3. EVALUACIÓN DE LA FILANCIA SEMINAL (cm)

Tabla 3.3. Filancia en semen fresco

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio ± D.E. (cm)	C.V. %
31	0.2°	3.0	1.33±0.73	54.89

En la (tabla 3.3) se observa la evaluación promedio de la filancia seminal medido en centímetros (cm) en semen fresco fue 1.33 ± 0.73 , es similar al reporte de (Raymundo y col., 2000) quien determinó 1.04 ± 0.28 cm realizado en tiempo reproductivo en alpacas mayores a 6 años, al trabajo de (Huanca y col., 2011) quienes obtuvieron un promedio de 0,99 cm. En cambio el presente trabajo de investigación resultan inferiores a los reportes de (Bravo y col., 2000) en alpacas 1.5cm con un rango de 0.4 ± 4.9 , mantenidos en pastos naturales y con una hembra al lado del maniquí. A 1.86 ± 1.51 cm (Ramírez, 2017) realizado en finales de la época reproductiva abril a junio; a 2.08 ± 1.57 cm (Meza, 2011) y 2.23 cm reportados por (Naveros y Contreras, 2014) los últimos con los mismos machos pero hicieron el trabajo en época reproductiva, esto nos permitiría afirmar que la variabilidad de filancia difiere entre machos, épocas del año (Bravo et al., 1997) pero esta filancia disminuye si se colecta repetidas veces (Bravo et al., 1997a) como indica el presente trabajo de investigación, y sin duda son propias de la especie (Giuliano, 2012). (Villanueva y col., 2015) encontró valores de (5.9 ± 3.4 cm) y (3.7 ± 2.0 cm) evaluadas en verano e invierno de forma respectiva, la superioridad posiblemente es debido a la edad del macho y la frecuencia de la colecta, podría también explicarse por posibles mecanismos de protección del plasma seminal sobre la calidad de los espermatozoides en cada estación del año (Troedsson y col. 2005).

3.4. EVALUACIÓN DE VITALIDAD ESPERMÁTICA (%)

Tabla 3.4. Vitalidad espermática en semen fresco

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio \pm D.E. (%)	C.V. %
31	48.40	87.70	75.56 ± 10.43	13.80

La (tabla 3.4) demuestra la vitalidad espermática en un promedio de $75.56 \pm 10.43\%$ que mantiene similitud a (Dávalos y Olazábal, 2002); (Alarcón y col., 2012) y (Ramírez, 2017) quienes lograron demostrar 72.1%; 70.8% y $70.64 \pm 8.80\%$ en promedios respectivamente de vitalidad de espermática en alpacas, el último consideró hasta 55 minutos del tiempo de cópula en finales del tiempo reproductivo; de igual manera a (Zirena, 2014) quien obtuvo $68.52 \pm 14.07\%$ en condiciones similares colectado mediante vagina artificial, considerando como tiempo de monta máximo 20 minutos. Sin embargo hay reportes superiores al presente trabajo de investigación como de

(Mendoza, 2015) quien obtuvo 88.0 ± 16.86 %, trabajados en animales menos de 6 años al igual a (Naveros y Contreras, 2014) quienes también demostraron 78.27 ± 5.88 % de vitalidad, similar al presente estudio; esta característica se debe a factor edad de los machos (Mendoza, 2015) y mayor a los tres años que posibilitan los mejores rangos de calidad seminal, entre ellas de vitalidad (Medina y Bautista, 2012) a la vez se debe a la influencia de efectos naturales (temperatura, rayos solares) durante la colección (Ramírez A, 2017) el tiempo de copula está relacionado directamente con los parámetros espermáticos al igual a diferencias individuales y a cada colecta del mismo macho.

3.5. EVALUACIÓN DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA (%)

Tabla 3.5. Motilidad espermática en semen fresco

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio \pm D.E. (%)	C.V. %
31	50	85	71.65 ± 10.32	14.40

La (tabla 3.5) demuestra la motilidad espermática encontrada en semen fresco en un promedio de 71.65 ± 10.32 %, es superior al encontrado por (Ramírez, 2017) quien encontró 52.50 ± 22.67 % en finales de época reproductiva con vagina artificial, a (Zirena, 2014) quien obtuvo 43.33% de motilidad en condiciones similares colectado mediante vagina artificial, considerando como tiempo de monta máximo 20 minutos; esta se debe probablemente por la frecuencia de colecta 6 a 7 veces por semana a cada animal, donde pudo haber ocurrido la sobrecarga en la producción de espermatozoides y la condición ambiental, además se consideró mayor a 50% de motilidad en el presente estudio. Un factor que influye en la motilidad es el porcentaje de eyaculados viscosos, lo cual permite solamente motilidad oscilatoria (Sumar, 1983) además del método de evaluación propia de cada investigador que resulta muy subjetiva (Coulter y Foote, 1973). También tiene influencia el tiempo de copula, ya que con tiempos más prolongados durante la colecta reducen significativamente la motilidad de los espermatozoides (Bravo et al., 1997a) y se reduce la fuente energética circundante necesaria para la actividad flagelar (Hafez, 2000). También hay trabajos que muestran superioridad al presente estudio (Mendoza, 2015) quien obtuvo 79.6%, puede deberse a que el autor obtuvo la muestra en menor tiempo a la vez utilizó la frazadilla eléctrica cual mantuvo la temperatura constante, a la vez existe diferencia individual.

3.6. EVALUACIÓN DE CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA (Mill/ml)

Tabla 3.6. Concentración espermática en semen fresco

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio ± D.E. (Mill/ml)	C.V. %
31	52°	370	211.30±85.74	40.58

La (tabla 3.6) demuestra el promedio de concentración espermática en semen fresco de alpacas fue 211.30±85.74 mill/ml, al comparar con trabajos de investigación previos colectando semen mediante vagina artificial, es superior al reportes 81.13 ± 74.54 mill/ml (Ramírez, 2017) en época reproductiva en alpacas mayores de 4 años, de igual manera; a 112.36 ± 19.09 millones/ml y 134.5 ± 93.55 millones/ml en promedio obtenidos por (Naveros y Contreras, 2014) y (Mendoza, 2015) utilizando los mismos machos trabajados en época reproductiva y finales de la época reproductiva, esta se puede explicar por diferencia individual entre machos; los reportes de (Garnica y col.,1993) y (Meza, 2011) demostraron 150 y 152.98 millones/ml de forma respectiva, también a 135.9 ± 88.7 y 242.4 ± 140.9 logrado en verano e invierno por (Villanueva y col., 2015) respectivamente. Esto nos demuestra que en las alpacas hay mucha influencia la época reproductiva en la concentración espermática y es muy variable, posiblemente debido a diferencias individuales y de método de colección (Sumar, 1997). Sin embargo hay trabajos superiores al presente estudio de hasta 339.4 millones/ml (Cárdenas et al., 1987). La alpaca macho es capaz de producir eyaculados fértiles todo el año, pero al igual que en otras especies domésticas, la calidad del semen, se ve afectado por la época del año y la reserva del alimento (Montalvo et al, 1977).

3.7. EVALUACIÓN DE COLOR DEL EYACULADO (%)

Tabla 3.7. Porcentaje de color del eyaculado en semen fresco

Color	N° de muestras	%
Blanco lechoso	3	8.7
Lechoso	27	86.96
Semi lechoso	1	4.35

La (tabla 3.7) demuestra el promedio de colores del eyaculado colectado por vagina artificial. En el presente trabajo presenta un mayor porcentaje el color lechoso en un 86.96%, este demostraría la concentración espermática alcanzada en el presente trabajo de investigación (tabla 3.6), seguido por el color blanco lechoso en un 8.7% y por último el color semi lechoso en porcentaje menor presentándose en 4.35%. Los trabajos anteriores demuestran superioridad para el color blanco lechoso (Alarcón et al., 2012; Bravo et al., 1997) quienes obtuvieron en un 60 % colectado por vagina artificial, también para color blanco lechoso que obtuvo en un 89.3% (Mendoza, 2015) obtenidos por (Olaguivel y Naveros, 2014) los colores varían en 54.76%; 26.19% y 19.04%; para blanco lechoso; blanco opaco y blanco translucido, respectivamente. Se afirma que los colores son designados por cada autor de forma subjetiva y no específico, ya que no hay parámetros o indicadores para evaluar esta característica de la muestra, sin embargo los colores de los eyaculados varían de blanco lechoso a blanco cristalino, de acuerdo a la concentración de células espermáticas y el estado de contaminación con otros fluidos, de igual forma el color puede ser modificado por la presencia de otros elementos anormales (Sumar y Leyva, 1981).

3.8. EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DE SEMEN (%)

Tabla 3.8. Parámetros espermáticos en distintas etapas de criopreservación

Parámetros	Fresco	ETAPAS	
		Refrigerado	Descongelado
		Promedio ± D.E. (%)	
Vitalidad	74.43±11.72 ^a	68.36±10.15 ^b	48.30±12.07 ^c
Motilidad	72.82±9.55 ^d	54.83±14.37 ^e	23.80±16 ^f

Etapas: Fresco (EI); Refrigerado (EII) y Descongelado (EIII).

^{a, b, c, d, e, f} Superíndices diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$).

La (tabla 3.8) demuestra el promedio de la vitalidad y motilidad espermática pos dilución con dilutor comercial optixel en (EI); (EII); (EIII) presentando 74.43 ± 11.72 ; 68.36 ± 10.15 ; 48.30 ± 12.07 y 72.82 ± 9.55 ; 54.83 ± 14.37 ; 23.80 ± 16 respectivamente, existen diferencias estadísticas ($p < 0.05$) entre etapas en cada parámetro evaluado. Existen reportes similares en semen fresco (EI) disuelto donde demuestra $43.33 \pm 24.30\%$ (Zirena, 2014) posiblemente se deba a la frecuencia de colecta de 6 a 7 colectas por semana, de igual manera en semen fresco promedio para el

grupo Tris - taurina y grupo AndroMed fue $63.39 \pm 16.16 \%$ y $67.86 \pm 15.30 \%$ respectivamente (Mendoza, 2015) es inferior al presente trabajo, posiblemente debido al tipo de dilutor utilizado. (Hurtado, 2018) demostró una motilidad de 71,13% en alpaca colectado a través la vagina artificial, similar al presente estudio, esto posiblemente se debe a que se trabajó con la misma metodología. En semen refrigerado (EII) los trabajos anteriores con dos tratamientos al semen, pasajes por aguja y agitación manual, los porcentajes de motilidad promedio fueron 46.11% y 48.83% inferior al presente trabajo; (Mendoza, 2015) demuestra motilidad de semen con dilutor AndroMed $56.18 \pm 17.00 \%$; (Naveros y Contreras, 2014) da $57.73 \pm 6.84 \%$ similar a nuestros resultados, probablemente porque usó la misma metodología para congelación, de igual modo utilizando la misma metodología de colección (Hurtado, 2018) muestra 63,67% de motilidad. A comparación la presente investigación es superior a los trabajos anteriores, debido a que el tiempo reproductivo y la lividez sexual influye sobre la motilidad espermática. En semen congelado (EIII) se obtuvo 22,60% (Hurtado, 2018) de espermatozoides móviles; la motilidad espermática promedio para muestras con dos tratamientos fueron de 21.43% y 15.93% respectivamente (Zirena, 2014) con dilutor AndroMed mostró $16.96 \pm 10.48 \%$ de motilidad (Mendoza, 2015). La superioridad del presente trabajo posiblemente es debido al dilutor utilizado y también la motilidad inicial.

Los trabajos anteriores sobre la vitalidad espermática para semen fresco (EI); refrigerado (EII) y congelado (EIII) demuestran 68.52 ± 14.07 ; 62.17 ± 13.40 y 34.00 ± 20.61 respectivamente (Zirena, 2014) similar al presente trabajo, posiblemente debido a que el autor consideró mayor de 35% de motilidad para el proceso de refrigeración y congelación. Con yema de huevo fresco (YHF) y en polvo (YHP) demostraron $71.6 \pm 2.2\%$ y $58.3 \pm 3.1\%$; $60.3 \pm 3.3\%$ para semen fresco y refrigerado correspondientemente. A pesar de ser el protector no penetrante más empleado por su capacidad de estabilizar la membrana plasmática del espermatozoide, también contiene sustancias que pueden interferir en el metabolismo celular, disminuyendo la motilidad espermática (Moussa et al., 2002).

3.9. VALORES PROMEDIO DE COMPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES VIVOS EVALUADOS A TRAVÉS DEL TEST DE ENDÓSMOSIS Y TINCIÓN FLUORESCENTE HOECHST 33342/PI

Tabla 3.9. Porcentaje de espermatozoides con membrana intacta en distintas etapas de criopreservación y pruebas

Etapas	Pruebas	
	HOST	HOECHST
	Promedio \pm D.E. (%)	
Fresco	52.97 \pm 14.34 ^a	57.65 \pm 16.79 ^a
Refrigerado	45.09 \pm 13.78 ^b	53.26 \pm 12.26 ^c
Congelado	29.71 \pm 11.61 ^d	27.35 \pm 10.83 ^d

Etapas: Fresco (EI); Refrigerado (EII) y Descongelado (EIII).

^a Superíndice iguales indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$).

^{a, b, c, d} Superíndices diferentes indican que existe diferencia significativa ($p < 0.05$).

La (tabla 3.9) demuestra el promedio de espermatozoides positivos a dos pruebas evaluadas en tres etapas; donde en (EI) fue 52.97 \pm 14.34%; 57.65 \pm 16.79% y al igual en (EIII) fue 29.71 \pm 11.61%; 27.35 \pm 10.83% para Host y Hoechst respectivamente sin haber una diferencia estadística ($p > 0.05$) en las dos pruebas, pero resultó altamente significativo para grupo Hoechst de la primera etapa y grupo Host en el tercer etapa; mientras en (EII) existe una diferencia estadística ($p < 0.05$) entre 45.09 \pm 13.78% y 53.26 \pm 12.26% para Host y Hoechst respectivamente. El resultado entre etapas demostraron que existen diferencia estadística ($p < 0.05$) en cada prueba; pero en grupo de Hoechst entre la (EI) 57.65 \pm 16.79% y (EII) 53.26 \pm 12.26% no existen diferencia estadística ($p > 0.05$); sin embargo es altamente significativo en (EI) frente a la (EIII) con 52.97 \pm 14.34 y 29.71 \pm 11.61%; respectivamente; del mismo modo en la prueba de Host existen diferencia estadística ($p < 0.05$) entre las etapas de criopreservación (EI) 52.97 \pm 14.34, (EII) 45.09 \pm 13.78 y (EIII) 29.71 \pm 11.61%; a la vez es altamente significativo en (EI) frente a la (EIII) con 52.97 \pm 14.34 y 29.71 \pm 11.61%; respectivamente.

Existen trabajos similares al porcentaje con reacción positiva al test de endosmosis (HOST) en muestras sometidas a dos tratamientos A y B, demostrando 43.13 \pm 17.59% en semen fresco; A (36.20 \pm 11.5%) y B (40.80 \pm 10.63%) en semen refrigerado; A (20.18 \pm 8.48) y B (25.45 \pm 9.86) para semen congelado (Zirena, 2014), sin embargo es

inferior al encontrado posiblemente se deba a la frecuencia de colección que fue de 6 a 7 colectas una semana, también en el presente trabajo se consideró mayores a 50% de motilidad espermática.

A través la colección de conductos deferentes y con 100 mOsm/l diluido en Tris-YH 46.63 %, Tris-YH + Plasma seminal 46.03 % en semen fresco; Tris-YH 33.51%, Tris-YH + Plasma seminal 40.10 % en semen refrigerado y Tris-YH 21.54 %, Tris-YH + Plasma seminal 27.24 % en semen descongelado (Calderón, 2015) reportaron inferior al presente trabajo, posiblemente se debería principalmente al método de colección utilizado y la mayor osmolaridad utilizada para la evaluación de la prueba de HOST y estas diferencias se deben al tiempo de refrigeración de semen a 5°C por 4 h y al tipo de congelación descrito por dicho autor.

En carneros con dos diluyentes Tris y Agua de coco encontraron 67.33% y 49.93% semen refrigerado; para semen descongelado con Tris y Agua de coco hallaron 34.47% y 24.73% (Vargas, 2015) es superior a nuestro trabajo de investigación, debido a la diferencia fisiológica del eyaculado de especies, también podría ser consecuencia de que el Tris estaría brindando una mejor protección a la membrana celular, gracias a su acción tampón, que actúa proporcionando estabilidad a la membrana espermática en el proceso de enfriamiento (Watson, 1995).

Existe trabajos con Tinción fluorescente HOECHST 33342/PI utilizado en alpacas, tal caso es reportado con 61.73%, 51.60%, 26.13% evaluadas en semen Fresco, Refrigerado, Congelado (Hurtado, 2018) correspondientemente utilizando las mismas metodologías del caso; pero demuestra ligera superioridad al presente estudio en la primera etapa y ligeramente inferior en las dos etapas restantes, esto llevaría a asumir al manejo de la muestra en el laboratorio. Factores como el cambio de temperatura, el estrés osmótico, la formación de hielo dentro de la célula y la toxicidad ocasionan la baja viabilidad, el descenso de la temperatura provoca un estrés a nivel de la membrana, el cual está correlacionada con el cambio de fase en los lípidos (Watson, 2000).

Con el colorante Hoechst 33258 en jabalí, los espermatozoides congelados a -20°C, almacenados en medio de BTS durante 72 horas resultó ser $60.1 \pm 1.66\%$ de células viables; superior a nuestro trabajo; mientras de toro reportó $44.3 \pm 4.57\%$, es inferior al

presente estudio. La diferencia que existe es debida a la metodología utilizada y a las diferencias entre especies animales.

Mediante triple tinción fluorocrómica en semen de porcino, el semen diluido se incubó con Pisum Sativum-Isotiocianato de fluoresceína (0.01%), Ioduro de Propidio (0.05%) y Hoeschst (0.1%). Las células con membrana plasmática intacta fueron inferior en el semen refrigerado (Fresco: 59,6%; Refrigerado: 49,92%), estos resultados son similares a la presente investigación, no obstante los procedimientos experimentales ni el factor especie demostraron claramente un efecto en los resultados. (Suhevic y col., 2015).

CONCLUSIONES

1. La integridad de membrana plasmática fue $52.97\pm 14.34\%$, $45.09\pm 13.78\%$, $29.71\pm 11.61\%$ y $57.65\pm 16.79\%$, $53.26\pm 12.26\%$, $27.35\pm 10.83\%$ para HOST y HOESCHST 33342/PI en semen fresco, refrigerado y descongelado respectivamente. Encontrándose diferencias estadística significativa entre etapas de criopreservación ($P>0,05$).
2. El efecto de la refrigeración sobre la integridad de la membrana plasmática fue $45.09\pm 13.78\%$ y $53.26\pm 12.26\%$ para Host y Hoechst 33342/PI respectivamente, con una vitalidad de $68.36\pm 10.15\%$ y $54.83\pm 14.37\%$ de motilidad.
3. El efecto de la criopreservación post congelación sobre la integridad de la membrana plasmática fue 29.71% y 27.35% para Host y Hoechst 33342/PI correspondientemente, presentando una vitalidad de $48.30\pm 12.07\%$ y $23.80\pm 16\%$ de motilidad.

RECOMENDACIONES

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

1. Continuar con trabajos de investigación similares con el objetivo de estandarizar protocolos de criopreservación de semen en alpacas.
2. Realizar evaluaciones complementarias en el procesamiento y criopreservación de semen de alpaca y así poder determinar daños a nivel de la membrana plasmática.
3. Para el empleo de la inseminación artificial en alpacas, utilizar el semen fresco y refrigerado ya que el daño de la membrana plasmática es menor a diferencia que el semen congelado donde se ve afectado la funcionalidad del espermatozoide por daño a nivel de la membrana plasmática.
4. Realizar trabajos similares utilizando diferentes crioprotectores, ya que estos son los que protegen a los espermatozoides durante la criopreservación y así evitar daños y disminuir la funcionalidad espermática.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisen, E.G. 2004.** Recolección y evaluación de semen. En: Aisen EG, director. Reproducción Ovina y Caprina. Editorial Buenos Aires: Inter-Médica.
- Alarcón, V., García W. y Bravo P. W. 2012.** Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, Lima, 23(1).
- Ampudia, F.T. 2017.** Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco Tesis Doctorado. Universidad de León-León.
- Bamba, K. 1988.** Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. Theriogenology; 29:1245-1251.
- Banda, J., Evangelista S., Ruiz L., Sandoval R., Rodríguez C., Valdivia M. y Santiani A. 2010.** Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Rev. investig. vet. Perú v.21 n.2 Lima.
- Bobé, J., Labbé C. 2010.** Egg and sperm quality in fish. Gen. Comp. Endocrinology; 165(3): 535 548.
- Busch, W. y Waberski D. 2007.** Manual de inseminación artificial de los animales domésticos y de explotación zootécnica. Editorial: Acribia, S.A. Zagoza. España.
- Bustinza, V. 2001.** La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 343.
- Bravo, P.W., Flores D., Ordoñez C. 1997a.** Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. Biology of Reproduction, 520–524.
- Bravo, P.W, Flores U., Garnica J., Ordoñez C. 1997b.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas. Theriogenology 47 (3):619–626.
- Bravo, W., Skidmore A., Zhao X. 2000.** Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. Animal Reproduction Science 62: 173-193. doi : 10.1016/ S0378-4320(00)00158-5
- Bravo, P.W., Moscoso R., Alarcon V., Ordoñez C. 2002.** Ejaculatory process and related semen characteristics. Archives of Andrology 48 (1): 65–72.
- Bravo, P.W., Alarcon V., Baca L., Cuba Y., Ordoñez C., Salinas J., Tito F. 2012.** Semen presevation and artificial insemination in domesticatedSout American camelids. Anim. Reprod. Sci. 136: 157- 163.

- Bravo, P.W. 1995.** Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. Proceedings of Post Graduate Foundation in Veterinary Science of University of Sydney 257: 61-66.
- Bravo, W., Alarcón V. 2013.** Preservación de semen y avances recientes en la inseminación artificial de llamas y alpacas. *Spermova* 3: 158-160.
- Cavalcanti, G. 2013.** "Efecto de la administración de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en la calidad seminal de alpacas (*Vicugna pacos*), CJP -Quimsachata- Puno 2012" Tesis Med. Vet. UNSCH.
- Cabrita, E., Martínez-Páramo S., Gavaia P.J., Riesco M.F., Valcarce D.G., Sarasquete C., Herráez, M.P., Robles V. 2014.** Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture*; 389-401. DOI:10.1016/j.aquaculture.2014.04.034.
- Calamera, J.C. 2004.** El laboratorio de andrología como ayuda diagnóstica. En: Curso Teórico-Práctico: Entrenamiento en técnicas de análisis seminal. International Society of Andrology. Chile, 12-14.
- Calderón, D.W. 2015.** Efecto de la adición del plasma seminal de toro (*Bos taurus*) sobre la viabilidad de los espermatozoides criopreservados colectados de los conductos deferentes en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis Méd. Vet. y Zootec. Universidad Nacional del Altiplano-Puno.
- Canorio, N.M. 2008.** Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*) [Tesis para optar el grado académico de Mg. Biol. Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos-Lima.
- Cárdenas, H., Vivanco W. y Bravo F. 1987.** Comparativo de dos métodos de colección de semen en alpacas. Resúmenes X reunión científica anual Asoc. Peruana. Prod. Anim., 86, Puno, Peru.
- Carpio, M., Ordoñez C., Alarcón V., Bravo W. 1999.** Presencia de espermatozoides, niveles de testosterona y tamaño testicular en alpacas, II Congreso Mundial sobre Camélidos Sudamericanos, Cusco - Perú.
- Casaretto, C., Martínez M., Giuliano S., Rubin de Celis E., Gambarotta M., Carretero I., Miragaya M. 2012.** Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia* 44 Suppl 1: 335-341.
- Choez, K., Evangelista S., Santiani A. 2015b.** Comparación de las características seminales de las alpacas Huacaya y Suri. *Spermova* 5(1): 139-143.

- Correa, J. y Zavos P. 1994.** The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *En: Theriogenology*. Vol. 42; 361-370.
- Coulter, G. H. y Foote R. H. 1973.** cambios de los espermatozoides durante el procesamiento en pajillas. *J. Animal. Sci*, 37: 306 (abs).
- Dávalos, R. y Olazabal J. 2002.** Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Rev Inv Vet Peru*: 13 (2): 98-99.
- Davies, K.J. 1999.** The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*; 48(1):41-7.
- De Alba, J. 1985.** Reproducción Animal, Editorial La Prensa Médica Mexicana, México.
- Deen, A., Vyas S., Sahani M. 2003.** Semen collection, cryopreservation and artificial insemination in the dromedary camel. *Anim. Reprod. Sci.* 77: 223-233.
- Delgado, C. 2013.** Evaluación espermática de semen de ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad. 2013. Tesis licenciada en Biología. Universidad Ricardo Palma; Lima-Perú.
- De Lamo, D. 2011.** Camélidos sudamericanos. Historia, usos y sanidad animal. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Servicio Nacional de Sanidad y calidad agroalimentaria. SENASA.
- Didion, B. y Graves C. 1986.** In Vivo Capacitation and Acrosome Reaction of Bovine Sperm in Estrous and Diestrous Cows. *Journal of animal*
- Drokin, S., Stein H., Bartscherer H. 1998,** Effect of cryopreservation on the fine structure of spermatozoa of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown Trout (*Salmo trutta* F. Fario). *Cryobiology*; 37:263-270.
- Fabbrocini, A., Lubrano S., Rispoli S., Sansone G. 2000.** Criopreservation of seabream (*Spaurus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology*; 40(1):46-53.
- Fernández-Baca, S. y Calderón M. 1966.** Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM*. Vol. 18-20: 13-26.
- Galindo, W. 1995.** Efecto de eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno. Universidad Nacional del Altiplano.
- Garnica, J., Achata R., Bravo P.W. 1993.** Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science* 32: 85-90.

- Garner, D., Hafez E. 2002.** Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México:McGraw Hill Interamericana. p. 98–112.
- García, V., Alarcón B. y Bravo M. 2017.** Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo. Rev. investig. vet. Perú vol.28 no.2 Lima.
- García-Artiga, C., Fontanillas J .C., Pérez J., García-Cuenca I., Martín-Rillo S., Pérez-García T. 1994.** Técnicas de Tinción Espermática. Porci; 21: 11-18.
- Garnica, J., Achata R., Bravo P. W. 1993.** Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. Anim. Reprod. Sci. 32: 85-90.
- Gauly, M., Leindinger H. 1996.** Semen quality characteristics, volume distribution and hypo-osmoitic sensitivity of spermatozoa of *Lama glama* and *Lama guanicoe*. En: 2nd European symposium on southamerican camelids. Universita Di Camerino. p. 235-244.
- Giuliano, S., Ferrari M.R., Spirito S.E., et al. 2007.** Avances en la implementación del test hipoosmótico (Hos test) en espermatozoides de llama. Fac. Cs. Vet. UBA. Buenos Aires. Argentina.
- Giuliano, S., Director A., Gambarotta M., Trasorras V., Miragaya M. 2008.** Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). Animal Reproduction Science; 104(1): 359-69.
- Giuliano, S., Casaretto C., Morán M., Huanca W. 2010.** Electroeyaculación y Características Seminales de Alpaca. III Simposium Internacional de Investigaciones sobre Camélidos. Organizado por DESCO Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo septiembre 9 y 10. Arequipa, Perú.
- Giuliano, S. 2012.** Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericano. Spermova 2(1): 6–9.
- Gómez, W. R. 1984.** Inseminación artificial, Capitulo 10. Reproducción de los animales domésticos. España. Editorial Acribia S.A.
- Gonzales, G.W. 2016.** Evaluación de tres métodos para uso de albúmina sérica bovina en el sexado de espermatozoides de toros. Tesis Mg. producción animal. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima
- Glass, R. y Ericsson R. 1979.** Spontaneous cure of male infertility. *En Fertilite Sterilization*. Vol. 31 p. 305-308.

- Hafez, E.S.E. 2000.** Reproducción e Inseminación Artificial en Animales, Traducido por: Roberto Palacios Martínez, Sexta Edición, Editorial Interamericana - Mc Graw - Hill, México.
- Hafez, E.S.E., Hafez B. 2002.** Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: Mc Graw – Hill Interamericana S.A. 519 p.
- Harkema, W., Boyle M.S. 1992.** Use of fluorescent stain to assess membrane integrity of equine spermatozoa. Proc 12th Int Congr Anim. Reprod. AI, La Haya; Vol 2: 1424-1426.
- Huanca, T., Mamani R. H., Naveros M. L., Pacheco J. y Condori N. 2011.** Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos*) Spermova 1(1): pp 98-100.
- Hurtado, R. 2018.** Integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” recuperados de semen fresco, refrigerado y congelado. Ayacucho. Facultad de Ciencias Biológicas. 2018. Tesis. Biol. Esp. Biotec. UNSCH. Ayacucho- Perú.
- Jeyendran, R., Van Der Ven H., Perez-Pelaes M., Crabo B., Zaneveld L. 1984.** Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod. Fert. 70: 219-228.
- Juyena, N.S., Stelletta C. 2012.** Seminal plasma: an essential review attribute to spermatozoa. Journal of Andrology 33(4): 536–551.
- Juyena, N.S., Vencato J., Pasini G., Vazzana I. y Stelletta C. 2013.** Alpaca semen quality in relation to different diets. Reproduction Fertility and Development 25 (4): 683–690.
- Keeler, K.D., Mackenzie N.M., Dresser D.W. 1983.** Flow microfluorometric analysis of living spermatozoa stained with Hoechst 33342. J Reprod Fertil;68(1):205-12.
- Kershaw–Young, C.M., Maxwell W.M. 2012.** Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. Reprod Dom Anim 47 (Suppl. 4),369–375.
- Losno, W. y Coyotupa J., 1981.** Testosterona sérica en alpacas machos pre púberes, Resúmenes compendiados de los proyectos de investigación realizados por la UNMSM, Periodo 1975 - 1979, Tomo II, Lima, Perú, pp 116.

- Lubos, H. 1983.** Bases de la reproducción bovina, Primera Edición, Editorial Diana, México.
- Magistrini, M., Guitton E., Levern Y., Nicolle J Cl., Vidament M., Kerboeuf D., Palmer E. 1997.** New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology*; 48: 1229-1235.
- Manosalva, I., Cortés C., Leyva V., Valdivia M., De los Reyes M., Barros C. 2005.** Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Rev Inv Vet Perú.* 16(1):114-28.
- Maroto, M. 2012.** Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*). Relaciones con la fertilidad. Tesis Doctoral, Albacete: Universidad De Castilla – La Mancha.
- Medina, G. y Bautista J. L. 2012.** Calidad de semen por edad fisiológica de la alpaca resúmenes y trabajos VI congreso mundial de camélidos sudamericanos arica-chile.pg 60.
- Mendoza, E. 2015.** "Evaluación de dos protocolos para la congelación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*)". 2013. Tesis Med. Vet. UNSCH. Ayacucho-Perú.
- Meza, D. 2011.** Efecto de dos dilutores en la refrigeración de semen de alpaca (*Vicugna pacos*)" en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata – INJEA - distrito de Santa Lucia-Puno a 4,200 msnm.2008. Tesis Med. Vet. UNSCH.
- Mogrovejo, D. 1952.** Estudios del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. National Mayor de San Marcos. 21 p.
- Montalvo, C., Cevallos E. y Copaira N. 1977.** Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. In: proc V Cong Nac de Cienc Veterinarias, Arequipa, Peru.
- Morton, K.M., Thomson P.C., Bailey K., Evans G., Maxwell W.M.C. 2006.** Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure. *Reprod. Dom. Anim.* 45(4): 637-643.
- Morton, K.M., Vaughan J.L., Maxwell W.M. 2008.** Continued development of artificial insemination technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, ACT, Australia. 205p.
- Morton, K.M., Thomson P.C., Bailey K., Evans G., Maxwell W.M. 2010b.** Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure. *Reproduction in Domestic Animals* 45(4): 637–643.

- Moussa, M., Martinet V., Trimeche A., Tainturier D., Anton M. 2002.** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695- 1706.
- Muiño, O. R. 2007.** Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas [Tesis doctoral]. Coruña: Universidad de Santiago de Compostela.
- Nishimura, H., L'Hernault S.W. 2017.** Spermatogenesis. *Current Biology* Volume27, Issue 18, pR988–R994.
- Olaguivel, C. y Naveros M. 2014.** “Efecto de la enzima colagenasa en la congelación de semen en alpacas (*Vicugna pacos*)”. *Revista científica Spermova*. 4(1): 64p.
- Ortega, F. C. 2011.** Factores implicados en la variabilidad individual en la respuesta a la congelación del eyaculado equino: estructura y subpoblaciones, estrés oxidativo y cambios apoptóticos [Tesis Doctoral]. Extremadura: Universidad de Extremadura.
- Pacheco, J. 2008.** Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *REDVET IX* (4): 1-17.
- Pérez y Pérez F., 1990.** Reproducción Animal, Inseminación Artificial y transplante de embriones. 1ra edición, España.
- Perk, K. 1962.** Seasonal changes in the glandula bulbo–urethralis of the camel. *BullRes Counc Isr Sect E Exp Med* 10: 37–44.
- Petrunkina, A.M., Waberski D., Günzel-Apel A.R., Töpfer-Petersen E. 2007;** Determinantes de la calidad del esperma y la fertilidad en especies domésticas; *134* (1): 3-17
- Pintado, B., De la Fuente J., Roldan E. 2000.** Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: Accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility*. Madrid. 118, 145–152.
- Quispe, F. 1987.** Evaluación de las características físicas del semen de alpaca durante la época de empadre, Tesis de la FMVZ- UNA, Puno - Perú.
- Ramalho-Santos, J., Schatten G., Moreno R. 2002.** Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biology of reproduction*; 67(4):1043-51.

- Ramírez, A. 2017.** Evaluación de tres tratamientos de semen sobre la filancia, motilidad y vitalidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*) a 2736 msnm, tesis Med. Vet. UNSCH. Ayacucho-Perú.
- Raymundo, F., Huanca W., Huanca T., Huerta S. y Cordero A. 2000.** Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. *RevInvVetPerú*. 128-129p.
- Rivera, E. 1998.** Uso de la yema de huevo y la glicerina en la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca. Tesis FMVZ-UNA Puno. Perú.
- Rodríguez-Martínez, H., Larsson B., Pertoft H. 1997.** Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev*; 9: 297-308.
- Rodríguez-Martínez, H. 2000.** Evaluación de semen congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. Internacional Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New Cork, USA.
- Rodríguez, C. 2009.** Efecto del plasma seminal sobre la sobrevivencia de espermatozoides criopreservados de Alpaca "*Vicugna pacos*". Tesis de Maestría. Unidad de Post Grado. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú.
- Rota, A., Linde-Forsberg C., Vannozzi J., Romagnoli S., Rodriguez-Martines H. 1998.** Cryosurvival of Dog Spermatozoa at Different Glycerol Concentrations and Freezing/Thawing Rates. *Reproduction in Domestic Animals*.
- Rubio, J.L., Quintero A.A., González D.M. 2009.** Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica Scielo.*; 19(4): 382-389.
- Salisbury, G.L., Van Dermack Y., Lodge J. 1982.** Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los Bóvidos, traducido por José María Torzona Vilas, Segunda Edición, Editorial Acribia, Zaragoza – España.
- San Martin, F. 1961.** Fisiología de la reproducción de la alpaca. *An. Symp. Sobre problemas ganaderos*. Lima Perú.
- SENAMHI, 2013:** <http://www.senamhi.gob.pe>
- Solís, R. 1997.** Producción de camélidos sudamericanos: Estudio zootécnico de la alpaca. Imprenta Ríos. Huancayo. p. 253-255.
- Suhevic, J., Malcervelli D., Torres P., Fratto C., Miguel J., Fischman M.L., et al. 2015.** Determinación de la calidad de las membranas espermáticas porcinas mediante triple tinción fluorocrómica en semen fresco y refrigerado; *5(1).p.134-8.*

- Sumar, J. y Leyva C. 1981.** Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). Memorias del IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Punta Arenas. Chile.
- Sumar, J. 1983.** Studies on reproductive pathology in alpacas. MSc. thesis.Fac. Med. Vet. Swedish University of Agric.Sci.Uppsala.
- Sumar, J. 1997.** Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. En: Avances en reproducción de rumiantes. I Symposium Internacional-Lima: APPA-Perú;p. 45-56.
- Smith, J.F., Murray G.R. 1997.** Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production; 57:246-50.
- Tibary, A., Memon M.A. 1999.** Reproduction in the male South American camelidae. J Camel Pract Res 6: 235–248.
- Tibary, A., Vaughan J. 2006.** Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: a review and clinical observations. Small Ruminant Research 61: 283–298.
- Urquieta, B., Flores P., Muñoz C., Bustos–Obregón E., García–Huidobro J. 2005.** Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a matingperiod. Animal Reproduction Science 90: 329–339.
- Vargas, C. P. 2015.** Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros [Tesis para optar el título profesional de médico veterinario y zootecnista]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano.
- Villanueva, J.C., Huanca W.F., Hilari F., Uchuari M., Rodríguez F., Huanca W. 2018.** “Efecto de la estación sobre las características seminales de alpacas (*Vicugna pacos*) criadas a nivel del mar” Rev Inv Vet Perú. 29(2): 559-564
- Von Baer, L. y Hellemann C. 1998.** Semen characteristics in the llama (*Lama glama*). [Spanish] Variables seminales en llama (*Lama glama*)', Arch. Med. Vet. vol. 30, pp. 171-176.
- Von Kubineck, J. 1974.** Samenentnahme bien AlpakadurcheineHarnohrenfistel. Z. Tierzucht 90: 335.
- Watson, P. 2000.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science.: 60(61); 481-92.

- 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.
- Wheeler, J., Kadwell M., Fernandez 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.
- Zirena, N. 2014.** Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación. Facultad de Medicina Veterinaria. 2013. Tesis Med. Vet. UNMSM. Lima-Perú.

ANEXOS

Anexo 1.
Resultados del trabajo de investigación

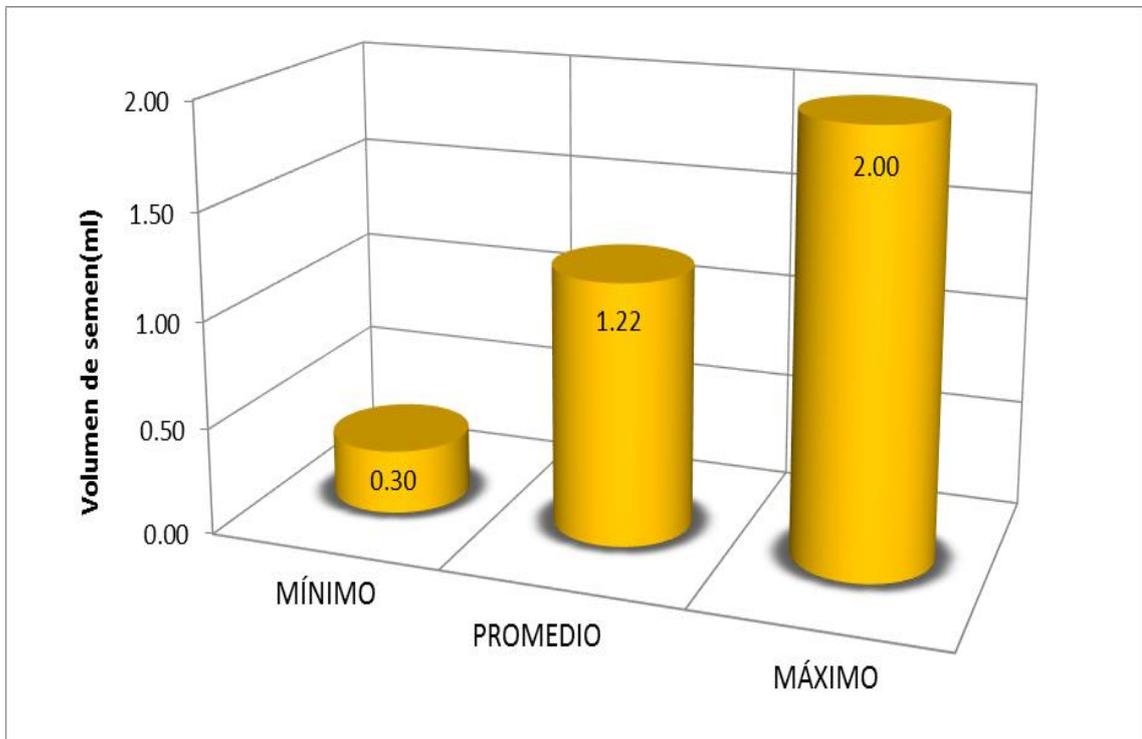


Figura 1. Volumen en semen fresco

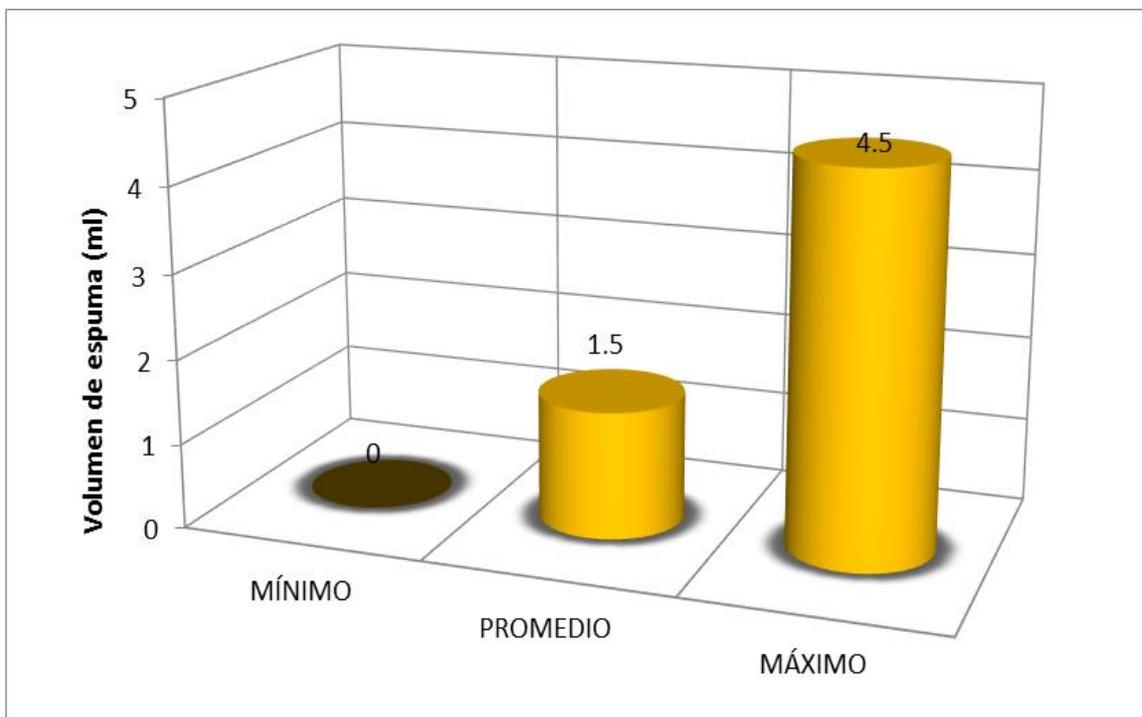


Figura 2. Volumen de espuma en semen fresco

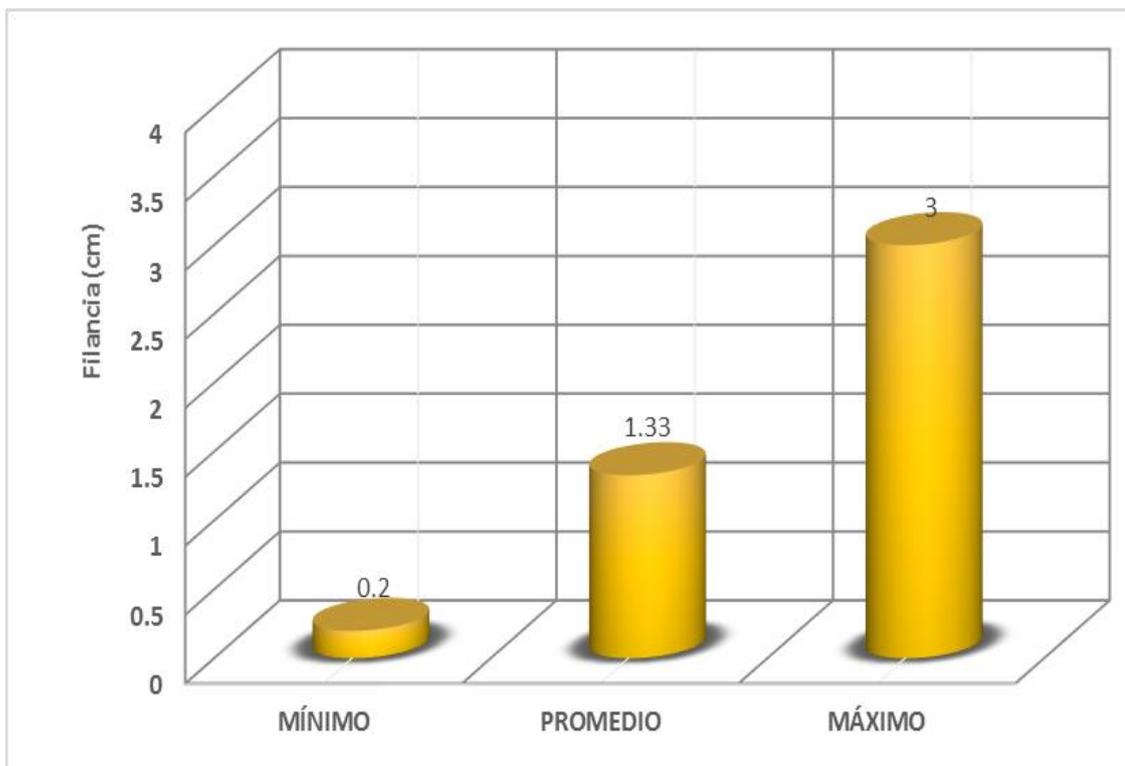


Figura 3. Filancia en semen fresco

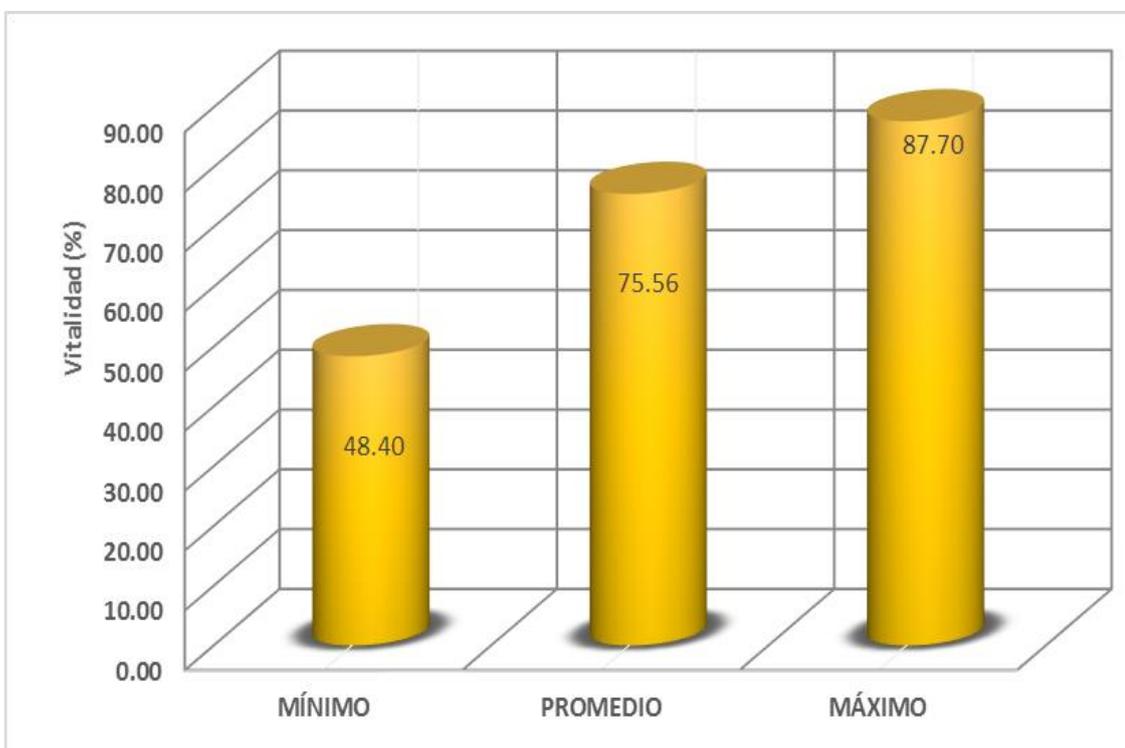


Figura 4. Vitalidad espermática en semen fresco

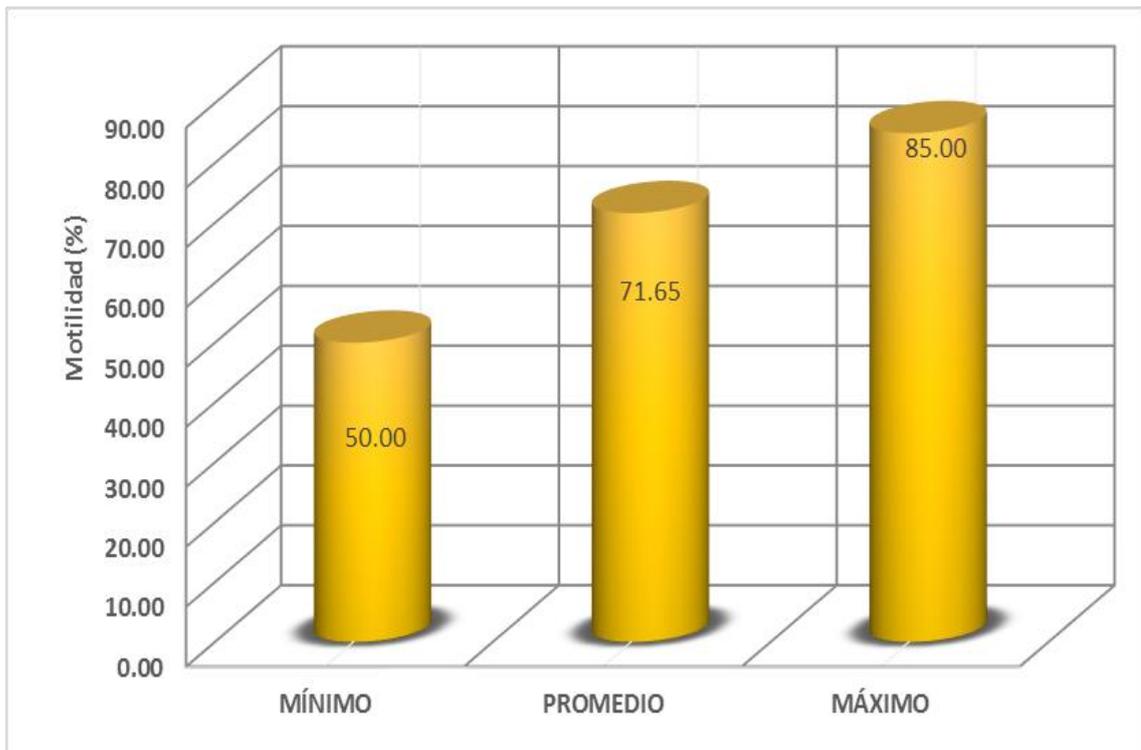


Figura 5. Motilidad espermática en semen fresco

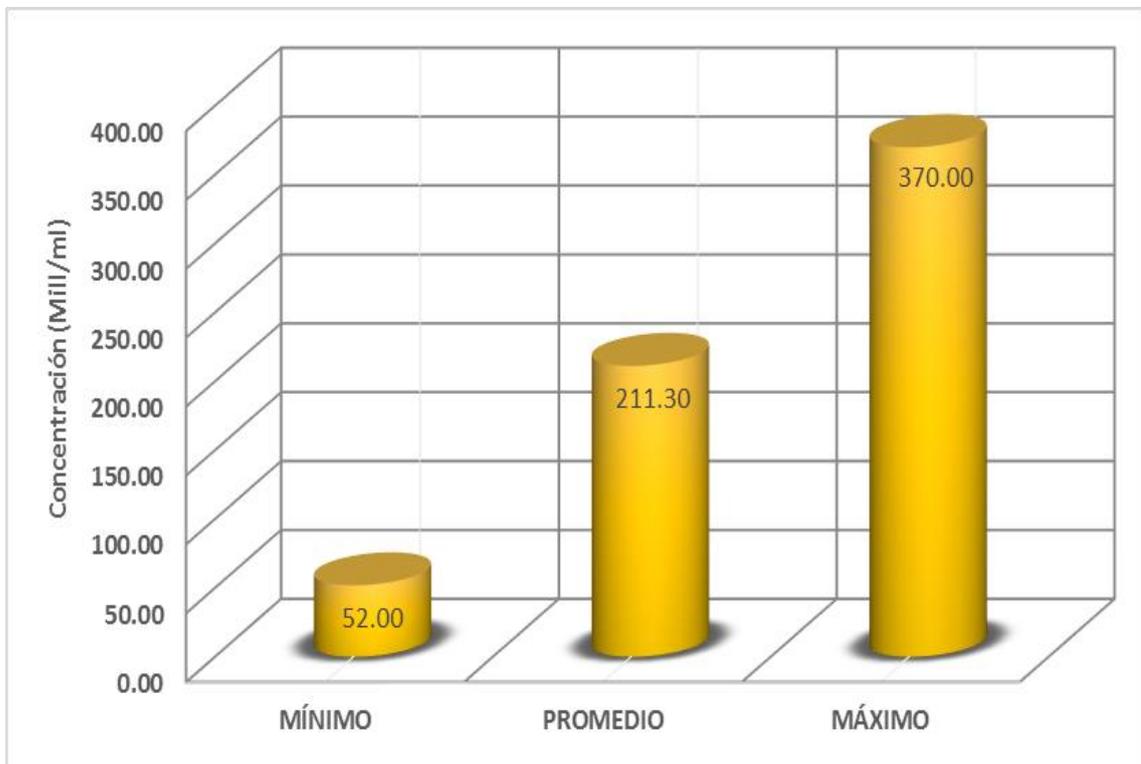


Figura 6. Concentración espermática en semen fresco

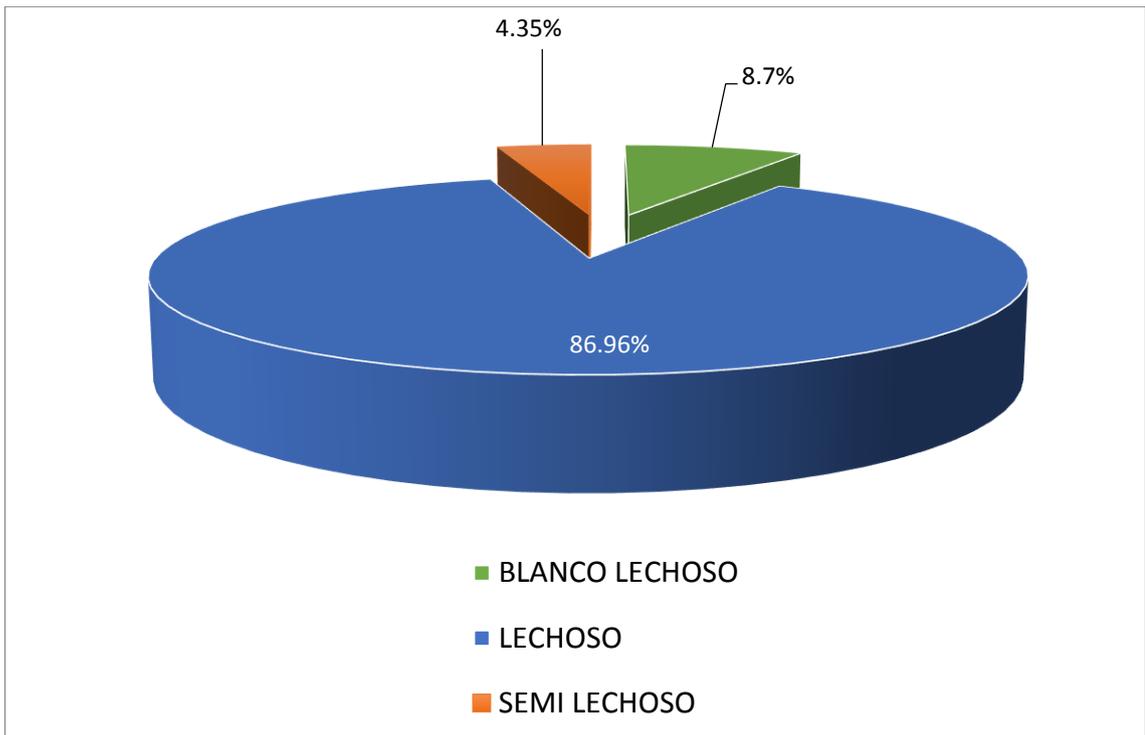


Figura 7. Porcentaje de color del eyaculado en semen fresco

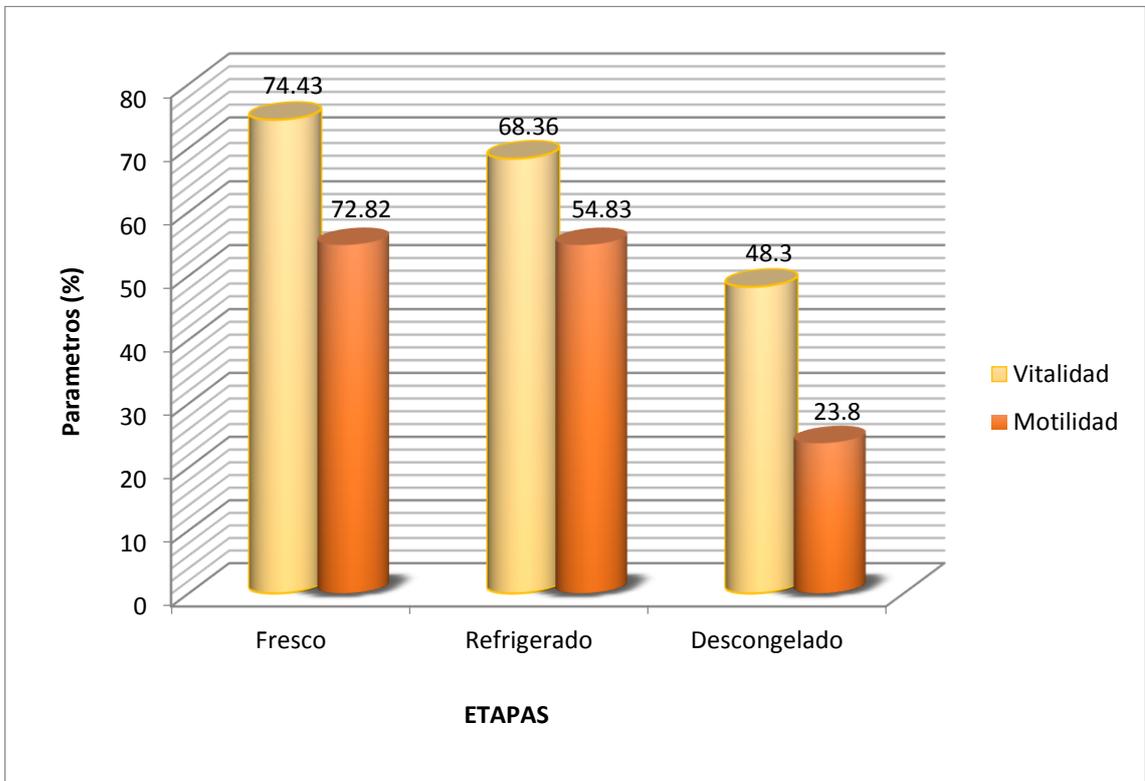


Figura 8. Parámetros espermáticos en distintas etapas de criopreservación

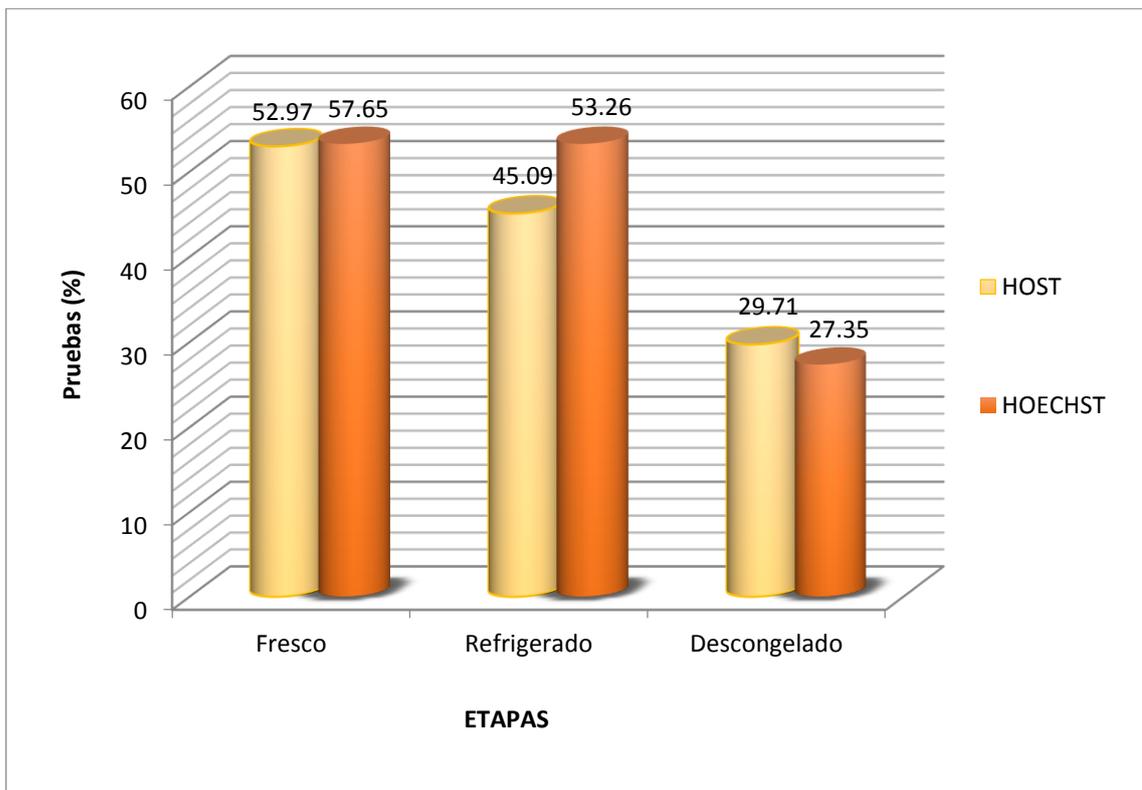


Figura 9. Porcentaje de espermatozoides con membrana intacta en distintas etapas de criopreservación y pruebas

Tabla 10. ANVA para prueba de host en la integridad de membrana espermática en las tres etapas de evaluación

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	8673.25	4336.63	24.53	<.0001
Error	90	15908.78	176.76		
Total corregido	92	24582.04			
Coeficiente de variación		31.22%			

Tabla 11. ANVA para prueba de Hoechst en la integridad de membrana espermática en las tres etapas de evaluación

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	16613.18	8306.59	45.35	<.0001
Error	90	16486.13	183.18		
Total Corregido	92	33099.31			
Coeficiente de variación		29.37%			

Anexo 2.

Evaluación de la motilidad y vitalidad en las distintas etapas de la criopreservación de semen de alpaca

N°	FRESCO		REFRIGERADO		DESCONGELADO	
	VITALIDAD	MOTILIDAD	VITALIDAD	MOTILIDAD	VITALIDAD	MOTILIDAD
1	68	80	76.99	50	48	20
2	86.67	80	74	75	70	50
3	74	70	82	75	62	30
4	98	60	57	80	33	30
5	83	80	81	55	54	56
6	72	75	71	75	57	20
7	53	70	67	30	47	5
8	60	80	45	40	36	3
9	75	80	76	40	30	3
10	68.75	60	73	60	54	20
11	70	85	73	60	49	50
12	80	75	71	60	61.9	30
13	83	68	69	60	51	35
14	73	65	69	55	37	5
15	78	85	66.1	41	43.6	15
16	62	60	68	23	38	5
17	84.3	55	65.7	35	49	5
18	86	80	66.9	35	38	10
19	80.7	60	75	55	68	32
20	82	65	73.5	55	45	15
21	85	85	78	65	61	40
22	83.5	50	76.3	45	62	25
23	70	85	70.8	60	45.4	50
24	80.3	80	71.6	65	57	35
25	61.3	60	58	30	40	13
26	48.4	70	42	40	23.5	3
27	58.1	80	55.1	70	38.4	30
28	76.2	65	70	60	32.8	15
29	82.2	75	73.3	60	65.7	13
30	87.9	80	85	70	61.5	45
31	79	70	70.5	60	56	50

Anexo 3.

Evaluación de la integridad de membrana en las distintas etapas de la criopreservación de semen de alpaca

N°	HOST						HOECHST					
	FRESCO		REFRIGERADO		DESCONGELADO		FRESCO		REFRIGERADO		DESCONGELADO	
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	VIABLE	N VIABLE	VIABLE	N VIABLE	VIABLE	N VIABLE
1	70.19	29.81	54.63	43.9	24.68	75.32	72	28	67	33	41	59
2	50	50	47.67	52.33	30.95	69.05	59	41	61	31	30	70
3	51.02	48.98	43.04	56.96	33.47	66.53	64	36	44	54	32	68
4	59.36	40.64	52.21	47.79	16.19	83.81	75	25	58	42	7	93
5	69.67	30.33	60.82	39.18	25.74	74.26	60	40	52	48	26	74
6	33.49	66.51	34.78	65.22	23.65	76.35	32	68	34	66	22	78
7	28.24	71.76	14.88	85.12	15.76	84.24	20	80	35	65	17	83
8	74.02	25.98	78.57	21.43	18.66	81.34	82	18	69	31	21	79
9	25.12	74.88	25.59	74.41	23.7	76.3	33	67	42	58	22	78
10	57.6	42.4	53.8	46.2	39.7	60.3	61	39	54	46	22	78
11	59.1	40.9	39.81	60.19	28.3	71.7	58	42	73	27	35	65
12	65.8	34.2	58.8	41.2	27.4	72.6	75	25	67	33	31	69
13	62.26	37.74	58.46	41.54	38.16	61.84	82	18	55	45	36	64
14	70.22	29.78	32.26	67.74	22.97	77.03	60	40	45	55	14	86
15	59.9	48.1	47.25	52.75	22.12	77.88	69	31	64	36	18	82
16	33.96	66.04	23.77	76.23	9.05	90.95	40	60	34	66	15	85
17	53.21	46.79	47.51	52.49	26.7	73.3	58	42	49	51	25	75
18	51.15	48.85	38.39	61.61	10.33	89.67	66	34	44	56	14	86
19	56.02	43.98	46.47	53.53	44.88	55.12	53	47	44	56	45	55
20	51.72	48.28	37.44	62.56	26.89	73.11	59	41	42	58	19	81
21	53.35	46.65	42.72	57.28	35.29	64.71	64	36	60	40	42	58
22	68.29	31.71	55.4	44.6	43.91	56.09	68	32	54	46	24	76
23	59.1	40.9	39.8	60.2	28.3	71.7	58	42	73	27	35	65
24	51.5	48.5	59.7	40.3	64.8	35.2	74	26	71	29	56	44
25	34.8	65.2	31.7	68.3	29.1	70.9	44	56	39	61	21	79
26	28.4	71.6	25	75	23	77	20	80	38	62	22	78
27	47.6	52.4	45.4	54.6	40.3	59.7	43	57	46	54	26	74
28	76.3	23.7	62.7	37.3	42	58	83	17	68	32	45	55
29	62.4	37.6	60.9	39.1	24.1	75.9	63	37	62	38	25	75
30	34.12	65.88	38.05	61.95	45.05	54.95	44	56	60	40	27	73
31	44.17	55.83	40.29	59.71	36	64	48	52	47	53	33	67

Anexo 4.
Panel fotográfico



Foto 1. Armado de la vagina artificial



Foto 2. Acoplado de la vagina artificial en el maniquí



Foto 3. Colecta de muestras de semen de machos entrenados

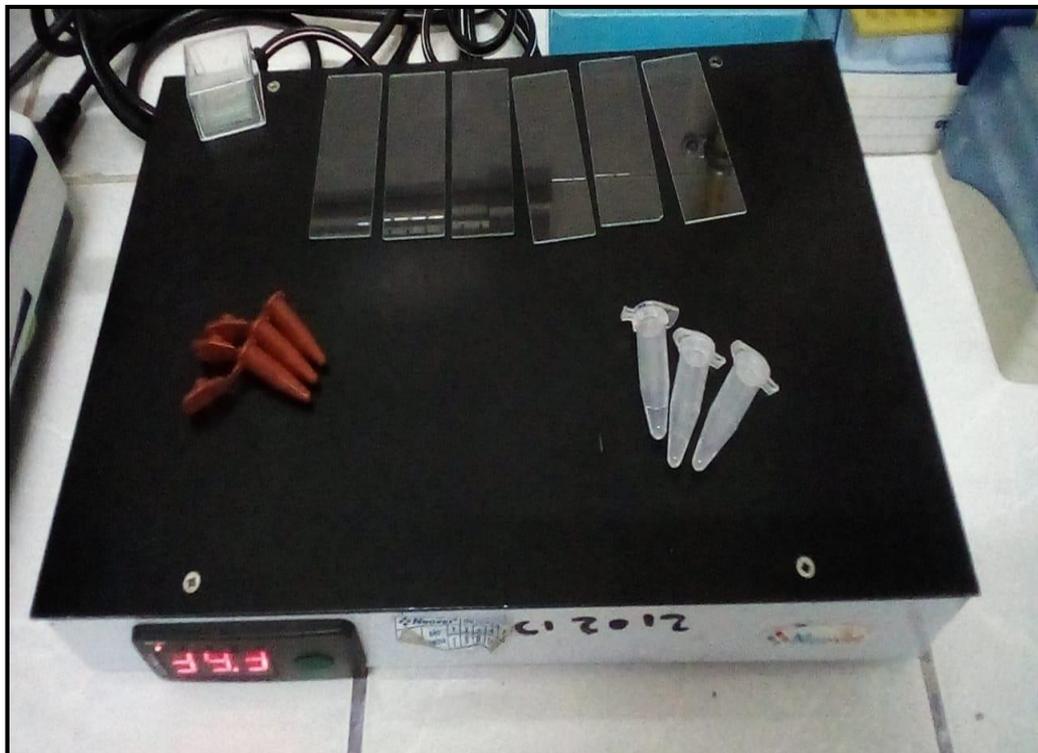


Foto 4. Materiales para la evaluación de la integridad de membrana plasmática

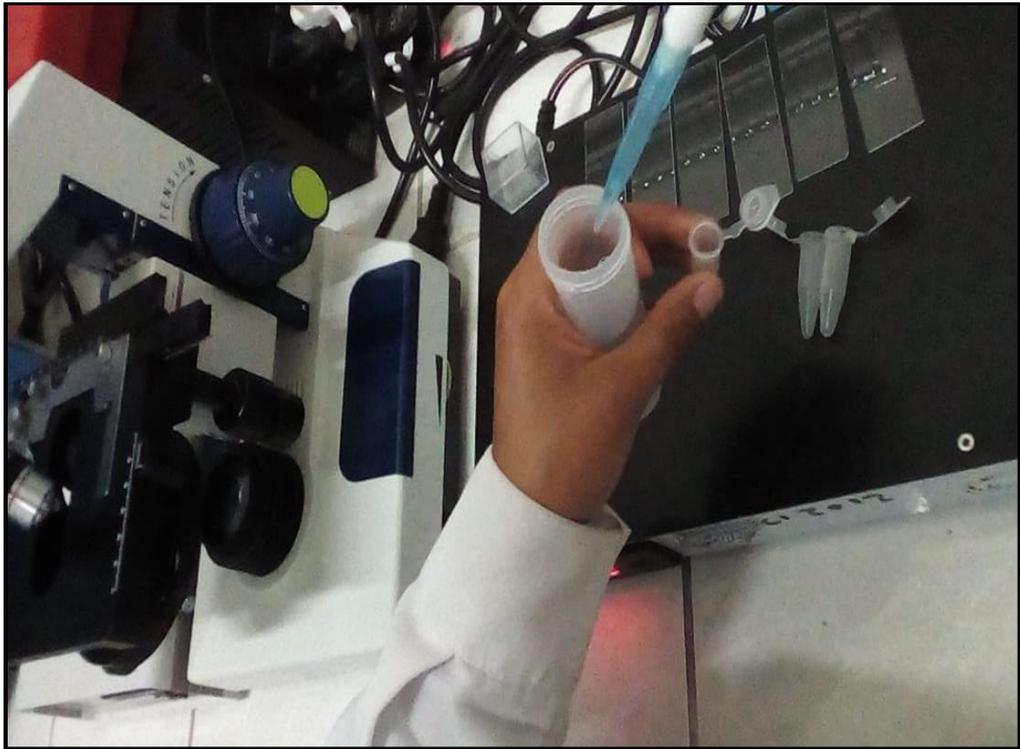


Foto 5. Semen para la evaluación de la integridad de membrana plasmática del espermatozoide



Foto 6. Criopreservación de semen en tanque criogénico



Foto 7. Evaluación de la integridad de membrana con la técnica del test de Host

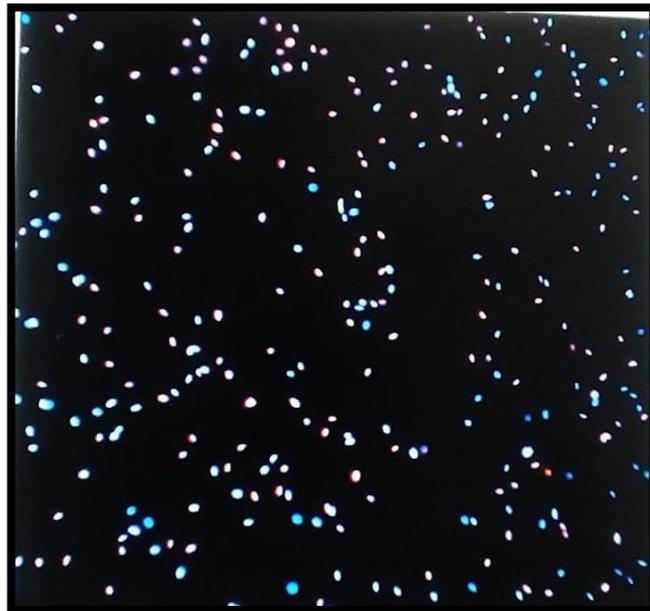


Foto 8. Evaluación de la integridad de membrana con la técnica de tinción Hoechst 33342/PI