



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



EFFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS DE CONGELACIÓN
SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA PROCEDENTE DEL
CONDUCTO DEFERENTE DE LLAMA (*Lama glama*)

TESIS

PRESENTADA POR:

Br. BRANDON ITALO CORONEL HUMASI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2022



DEDICATORIA

A mis padres quienes me apoyaron en poder llegar a culminar mis estudios.

A la Universidad Nacional del Altiplano Puno, que durante el tiempo y desarrollo de mis estudios fue mi segundo hogar.

A los animales que formaron parte en la formación ética y científica durante toda la carrera.

Italo Coronel



AGRADECIMIENTOS

A la educación pública y a todos aquellos que perseveran por brindarnos una educación de calidad en tiempos difíciles.

A mi alma máter Universidad Nacional del Altiplano, por permitirme a pesar de todo, formarme en sus aulas, compartiendo objetivos y anhelos, con constancia dedicación y esfuerzo llevaremos nuestro país hacia adelante.

A mi director de tesis el Dr. Uri Harold Pérez Guerra y a mi asesor Dr. Guido Manuel Pérez Durand, por la orientación y asistencia que me brindaron para la realización de esta tesis, su apoyo me permitió profundizar en el campo de la investigación.

A mis compañeros de laboratorio Dr. Eloy Condori, Carlos Bustamante y Fidel Yana, por su importantísima participación y acompañamiento durante la realización del trabajo.

A las llamas que formaron parte de esta investigación, y a todos los animales que participaron en mi formación profesional.

Italo Coronel



INDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

INDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

RESUMEN 11

ABSTRACT..... 12

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. OBJETIVO GENERAL 14

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS 15

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES DEL DESARROLLO DE

BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN LLAMAS..... 16

2.2. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN EN CSA 16

2.2.1. Aspiración vaginal post cópula 17

2.2.2. Electroeyaculación 17

2.2.3. Vagina artificial 18

2.3. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS 18

2.3.1. Recuperación de espermatozoides epididimarios 18

2.3.2. Desviación de conductos deferentes 19



2.4. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE LLAMA.....	19
2.4.1. Características de espermatozoides obtenidos del conducto deferente	20
2.5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.....	21
2.5.1. Motilidad	22
2.5.2. Viabilidad	22
2.5.3. Funcionalidad de membrana	22
2.6. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN CSA.....	23
2.6.1. Proceso de congelamiento del semen.....	24
2.6.2. Crioinjurias y agentes crioprotectores.....	25

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO	28
3.2. TIPO DE ESTUDIO	28
3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	28
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL	29
3.5. ANIMALES.....	30
3.6. MATERIAL BIOLÓGICO.....	31
3.7. METODOLOGÍA.....	31
3.7.1. Cirugía de desviación del conducto deferente.....	31
3.7.2. Preparación del dilutor	31
3.7.3. Colección de esperma.....	32
3.7.4. Enfriamiento del esperma colectado	33
3.7.5. Preparación del crioprotector (ACP).....	33
3.7.6. Proceso de congelación	33
3.7.7. Proceso de descongelamiento.....	34



3.7.8. Evaluación de la calidad espermática microscópica	35
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. EVALUACIÓN A LA COLECCIÓN.....	38
4.2. EVALUACIÓN AL ENFRIAMIENTO	39
4.3. EVALUACIÓN AL DESCONGELAMIENTO.....	41
V. CONCLUSIONES.....	49
VI. RECOMENDACIONES	50
VII. REFERENCIAS BILIOGRÁFICAS	51
ANEXOS.....	59

Área : Reproducción animal.

Tema : Crioconservación espermática en llamas.

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 13 de mayo del 2022



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1.	Curva térmica dentro de una pajilla al momento de la congelación...	25
Figura N° 2.	Diseño de investigación	30
Figura N° 3.	Comparación gráfica porcentual de la motilidad total, HOST y vitalidad de espermatozoides crioconservados (Fuente propia).....	47
Figura N° B.4.	Retracción del conducto deferente durante la cirugía de desviación del conducto deferente.....	70
Figura N° B.5.	Preparación de dilutor.....	70
Figura N° B.6.	Baño maría (37 °C), acondicionado en un termo sobre el cual están dos tubos de ensayo con dilutor y jeringas de colección	70
Figura N° B.7.	Colección de las microgotas de esperma con un tip adosado en la jeringa	71
Figura N° B.8.	Proceso de enfriamiento a -5 °C.....	71
Figura N° B.9.	Reconstitución con la fracción B (TRIS – YH – Glicerol)	72
Figura N° B.10.	Empajillado de semen.....	72
Figura N° B.11.	Obtención de pajillas para su descongelado.....	72
Figura N° B.12.	Preparación de la muestra para la evaluación post descongelado	72
Figura N° B.13.	Evaluación de motilidad post descongelado.....	73
Figura N° B.14.	Evaluación de vitalidad post descongelado	73
Figura N° B.15	Prueba HOS post descongelado.....	73



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Viabilidad espermática al momento de la colección (37 °C)	38
Tabla 2.	Viabilidad espermática de espermatozoides al enfriamiento (5 °C)	39
Tabla 3.	Prueba t de student pareada entre evaluación a la colección y equilibrio .	40
Tabla 4.	Motilidad espermática de espermatozoides crioconservados a tres diferentes temperaturas de congelación	41
Tabla 5.	Viabilidad espermática de espermatozoides crioconservados a tres diferentes temperaturas de congelación.....	42
Tabla A.6.	Parámetros espermáticos a la colección (37 °C) y al enfriamiento (5 °C)	60
Tabla A.7.	Patrones de motilidad a la colección (37 °C) y al enfriamiento (5 °C)	60
Tabla A.8.	Parámetros espermáticos al post descongelamiento	61
Tabla A.9.	Patrones de motilidad al descongelamiento.....	62
Tabla A.10.	Valores transformados a Arcoseno de raíz de parámetros espermáticos al post descongelamiento.....	63
Tabla A.11.	Valores transformados a Arcoseno de raíz de los patrones de motilidad al descongelamiento	64
Tabla A.12.	Prueba T de student pareado para variables relacionadas a la colección y equilibrio (Jamovi)	65
Tabla A.13.	Matriz de correlación de Pearson entre variables a la colección (Jamovi)	65
Tabla A.14.	Matriz de correlación de Pearson entre variables al equilibrio (Jamovi) ..	65
Tabla A.15.	ANOVAs de un factor para TRATAMIENTOS (-80 °C; -100 °C y -120 °C) (Jamovi).....	65
Tabla A.16.	Test de normalidad (Shapiro-Wilk) de variables dependientes al descongelado (Jamovi)	66



Tabla A.17. Test de homocedasticidad para variables dependientes al descongelado (Jamovi).....	66
Tabla A.18. Prueba de comparación de medias de Tukey para MOTILIDAD (Jamovi)	66
Tabla A.19. Prueba de comparación de medias de Tukey para VITALIDAD (Jamovi)	66
Tabla A.20. Prueba de comparación de medias de Tukey para HOST (Jamovi)	67
Tabla A.21. MANOVA de un factor para patrones de motilidad (Jamovi)	67
Tabla A.22. Pruebas univariadas del MANOVA entre tratamientos y patrones de motilidad (Jamovi).....	67
Tabla A.23. Prueba de matrices de Box para el MANOVA para patrones de motilidad (Jamovi).....	68
Tabla A.24. Prueba de normalidad multivariado para patrones de motilidad (Jamovi)	68
Tabla A.25. Preparación de FRACCIÓN A del dilutor Tris-citrato-yema de huevo. ...	68
Tabla A.26. Preparación de FRACCIÓN B del dilutor TRIS-citrato-yema de huevo + Glicerol	68
Tabla A.27. Preparación de Eosina-Nigrosina	69
Tabla A.28. Preparación de Solución hiposmotica	69



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

°C:	grados Celsius
μL:	microlitro
ACP:	Agentes crioprotectores
BSP:	bull seminal plasma
CSA:	Camélidos sudamericanos
CFDA/PI:	Yoduro de propidio
DCD:	Desviación del conducto deferente
g:	gramo
HOST:	Hypo Osmotic Swelling Test
IA:	Inseminación artificial
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
mg:	miligramo
ml:	mililitro
mOsm:	miliosmoles
MC:	Motilidad circular
MO:	Motilidad oscilatoria
MP:	Motilidad progresiva
MT:	Motilidad total
N _{2(l)} :	Nitrógeno líquido
PVOH:	Alcohol polivinílico
ROS:	Especies reactivas de oxígeno
TRIS:	Tris(hidroximetil)aminometano
v/v:	Porcentaje volumen a volumen
YH:	Yema de huevo



RESUMEN

El estudio se desarrolló en el laboratorio de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA durante los meses enero – marzo 2021. El objetivo fue evaluar el efecto de tres temperaturas de congelación sobre la calidad de esperma proveniente del conducto deferente en llamas. Se obtuvieron muestras de 6 llamas sometidas a la desviación del conducto deferente, las cuales fueron combinadas y prediluidas en TRIS–YH, posteriormente fueron enfriadas a 5 °C, y se adicionó glicerol para la fase de equilibrio, éstas se procesaron en pajillas de 0.25 mL con una concentración espermática de 45×10^6 y se congelaron con una tasa de 20 °C/min desde el equilibrio hasta -80 (TI); -100 (TII) y -120 °C (TIII) (Tratamientos); y se almacenaron en nitrógeno líquido. La calidad espermática se evaluó al momento de la colecta, fase de equilibrio y al descongelado, estimándose y comparando: motilidad, vitalidad y funcionalidad de membrana, entre 37° y 5°C mediante prueba t Student pareado; y los tratamientos al descongelamiento mediante un análisis de varianza y prueba de Tukey. Los resultados muestran que la temperatura de congelación de -120 °C presentó efecto significativo en cuanto a motilidad total: TI (20.16%), TII (25.49%) y TIII (26.47%) ($p=0.025$) y vitalidad espermática TI (31.2%), TII (36.39%) y TIII (38.93%) ($p=0.003$) respecto a -80 °C. En conclusión, la congelación inicial a -120 °C preserva significativamente la motilidad total y la vitalidad en espermatozoides obtenidos del conducto deferente de llama.

Palabras clave: conducto deferente, criopreservación, llama, temperaturas de congelación.



ABSTRACT

The study was carried out at the reproduction laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the UNA during the months of January - March 2021. The aim was to evaluate the effect of three freezing temperatures on the quality of sperm from the vas deferens in llamas. Samples were obtained from 6 llamas underwent to the deviation of the vas deferens, which were combined and prediluted in TRIS-EY, subsequently they were cooled to 5 °C, and glycerol was added for the equilibrium phase, these were processed in straws of 0.25 mL with a sperm concentration of 45×10^6 and frozen with a rate of 20 °C/min from equilibrium to -80 (TI); -100 (TII) and -120°C (TIII) (Treatments); and were stored in liquid nitrogen. Sperm quality was evaluated at the time of collection, equilibrium phase and thawing, estimating and comparing: motility, vitality and membrane functionality, between 37° and 5°C by a paired t-Student test; and the treatments after thawing through an analysis of variance and Tukey's test. The results show that the freezing temperature of -120 °C had a significant effect on total motility: TI (20.16%), TII (25.49%) and TIII (26.47%) ($p=0.025$) and sperm vitality TI (31.2 %), TII (36.39%) and TIII (38.93%) ($p=0.003$) compared to -80 °C. In conclusion, initial freezing at -120 °C significantly preserves total motility and vitality in sperm obtained from the llama's vas deferens.

Keywords: vas deferens, cryopreservation, llama, freezing temperatures.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La población mundial de llamas estimada llega a los 3.321 millones de unidades en el año 1996, siendo Bolivia el principal productor con el 60.88%, seguido del Perú con 32.52%, Argentina con 4.05% y en menores cantidades Chile y Ecuador. Actualmente, Perú cuenta con 1,09 millones de unidades, de las cuales el 33.92% se encuentra en el departamento de Puno (MINAGRI, n.d., INEI, 2019; DRA-Puno, 2019). La llama, constituye un medio de subsistencia de un vasto sector de la población de las zonas altoandinas del Perú, a través del aporte de carne, energía de trabajo y otros subproductos. Los atributos morfológicos y productivos de esta especie fueron dejados de lado en nuestro país, sin embargo en poblaciones de otras latitudes se ha estimado que presentan potencial de producción de fibra (Hick et al., 2009) y carne (Cristofanelli et al., 2004). La totalidad de las llamas se encuentra en manos de pequeños productores de muy escasos recursos (FAO, 2005), que no poseen las condiciones adecuadas para el desarrollo tecnológico en alimentación, manejo, producción y reproducción de esta especie por lo cual se avizoran elevadas oportunidades de mejoramiento genético.

La inseminación artificial (IA) y la criopreservación de semen son biotecnologías reproductivas ampliamente usadas en la mejora de la calidad genética y productiva de un rebaño y, también en la conservación de germoplasma de individuos de alto valor genético (Barbas & Mascarenhas, 2009). Es bien sabido que el proceso de criopreservación repercute sobre la calidad espermática y sobre su estructura, por lo cual el éxito de la criopreservación depende de la resistencia de los espermatozoides frente a los cambios biofísicos y fisicoquímicos que ocurren durante este proceso, tal resistencia a la congelación denominada congelabilidad determina la susceptibilidad y las tasas de



éxito en la reproducción de camélidos sudamericanos (CSA) (B. Hafez & Hafez, 2000; Thomas et al., 1998; Varisli et al., 2013; Zampini et al., 2020). Sin embargo, pocos son los estudios que se hicieron sobre criopreservación de espermatozoides e IA en CSA, con relación a otras especies de producción; tales estudios revelan bajos resultados en relación tasas de preñez con semen descongelado y semen refrigerado (García V. et al., 2017; S. M. Giuliano et al., 2012; Rebuffi et al., 2003; Stuart et al., 2019), lo cual refleja la necesidad de mayor investigación en el ámbito de biotecnologías que permitan lograr protocolos reproductivos fiables tanto en el manejo y la criopreservación del semen de esta especie.

Por otro lado diversos estudios se desarrollaron sobre curvas de las temperaturas de congelación en espermatozoides de otras especies, cuyos resultados demuestran que esta variable comprende un factor importante en el proceso de criopreservación y consecutivamente en la viabilidad espermática luego de la descongelación (Kumar et al., 2003; Shah et al., 2016), puesto que este parámetro aún no ha sido estudiado en la llama (*Lama glama*), en el presente estudio se evaluó el efecto que tiene el uso de tres diferentes temperaturas de congelación, en la fase inicial de la congelación (-80 °C, -100 °C y -120 °C) sobre la calidad espermática de espermatozoides obtenidos del conducto deferente de esta especie, con el fin de determinar una temperatura apropiada para obtener una mejor calidad espermática.

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de tres diferentes temperaturas de congelación sobre la calidad espermática de semen procedente del conducto deferente de llama.



1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la calidad espermática de semen procedente del conducto deferente de llama al momento de la colección y fase de equilibrio.
- Determinar la calidad espermática procedente del conducto deferente de llama, a la descongelación tras ser sometido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$; $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura de congelación.



CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES DEL DESARROLLO DE BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS EN LLAMAS

La inseminación artificial (IA) como herramienta reproductiva, permitió un importante progreso en la producción de animales domésticos, facilitando la difusión de reproductores genéticamente superiores, donde la criopreservación de semen es una técnica clave para la conservación del material genético y que para cada especie se han desarrollado protocolos de criopreservación que se ajustan a las propiedades específicas del semen empleado (Demyda-Peyrás et al., 2018; Osuagwuh, 2017).

La IA aplicada en camélidos sudamericanos (CSA) actualmente se caracteriza por su lento desarrollo y aplicación, esto se debe, en parte, a las características del eyaculado (elevada viscosidad, de volumen y concentración espermática bajos), a su posición de cópula, tiempo de eyaculación (10 – 20 min) la cual dificulta la colección (Cebra et al., 2014; Skidmore et al., 2020). Sin embargo, sobre la dificultad de obtención de semen de CSA, se han desarrollado diversos métodos de colección (Choez A. et al., 2017), entre ellos se encuentra la desviación de conductos deferentes (M. Guido Pérez et al., 2014), con la finalidad de reducir la viscosidad y facilitar el manejo de los espermatozoides.

2.2. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN EN CSA

El comportamiento sexual y el mecanismo de eyaculación particular de la llama macho representa una elevada dificultad para la obtención de semen; el tiempo de cópula tiene una duración en promedio de 25 minutos, a diferencia de otras especies, la cópula se da en una posición característica que hace difícil la manipulación del pene y la



eyaculación se da a nivel intracornual (Bravo et al., 1997). Por otro lado, es necesario considerar la distancia al lugar de evaluación, el manejo del semen luego de su colección, el entrenamiento del macho, la manifestación del libido idóneo al momento de la colección (Giuliano S., 2012). Actualmente, se tiene cuenta de diversos estudios llevados a cabo, en los cuales se evaluaron distintos métodos de colección que presentan ventajas y desventajas.

2.2.1. Aspiración vaginal post cópula

Virgilio et al., (2012) reproduce la técnica de aspiración vaginal post cópula, la cual consiste en la inserción de un especulo vaginal luego de la cópula, el semen se extrae de la os externa del cérvix, este es depositado en un tubo de vidrio y trasladado a baño maría para su evaluación, procesamiento e inseminación, frente a la vagina artificial este método presenta mayores ventajas con relación a la adecuación del macho. Una de las desventajas de este método es que el semen puede ser diluido con secreciones del tracto genital de la hembra y contaminado con sangre (Abraham et al., 2017).

2.2.2. Electroeyaculación

Este método tiene la desventaja de que requiere personal técnico para la anestesia de los machos a colectar, es necesario un equipo electro-eyaculador, donde es importante tener en cuenta que los estímulos eléctricos serán distintos entre machos (Abraham, 2016). Se puede utilizar una sonda de electroeyaculación para ovinos para el uso en llamas; este método es considerado seguro con un protocolo anestésico adecuado, se espera también posible contaminación por la orina, para lo cual es necesario estimular la micción antes del procedimiento (Abraham et al., 2017).



2.2.3. Vagina artificial

Sumar & Leyva (1981, citado por Huanca et al., 2007) demostró la posibilidad del uso de vagina artificial, mediante el uso de un maniquí o una hembra, para tal caso es necesaria la vagina artificial y sus accesorios; en este caso es importante el entrenamiento del macho sobre el maniquí, pues su instinto nervioso dificulta la introducción normal del pene; este método se ha ido modificando en el tiempo, adecuándose a las particularidades de esta especie (Bravo et al., 1997).

2.3. OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS

En el epidídimo se da la maduración fisiológica y funcional de los espermatozoides, especialmente en aquellos que se encuentran en la cola del epidídimo, los cuales son en mayor medida más motiles y maduros; también cumple con el transporte, mantenimiento, almacenamiento y protección de los espermatozoides (B. Hafez & Hafez, 2000).

Los espermatozoides epididimarios tienen por definición a aquellos de origen más próximo al epidídimo que mantienen capacidad fertilizante sin aun tener contacto con las secreciones de las glándulas sexuales anexas. Diversos estudios demuestran la posibilidad de criopreservación y la capacidad fertilizante de este tipo de espermatozoides, logrando incluso descendencia en varias especies (Barker & Gandier, 1957; Cunha et al., 2016; Cunha et al., 2019; Suzuki et al., 1993)

2.3.1. Recuperación de espermatozoides epididimarios

El término “Recuperación” implica la colecta de espermatozoides directamente del epidídimo, el cual es escindido en sentido longitudinal en la porción de la cola, o que también puede ser mediante la aplicación de una solución tampón para arrastrar los



espermatozoides desde el conducto deferente hacia los cortes sobre el cuerpo/cabeza del epidídimo; estos procedimientos permiten el rescate del germoplasma valioso en casos como la muerte de un animal de alto valor genético, pérdida de libido, daños a nivel del tracto reproductivo, posibilitando de esta manera propagar la elevada genética y su extensión en el tiempo (Guerrero, 2006; Santiani, 2012).

2.3.2. Desviación de conductos deferentes

Pérez-Durand et al., (2016) demuestra la factibilidad de congelación, descongelación y capacidad de producir gestaciones utilizando el esperma obtenido por la desviación de conductos deferentes. Esta técnica se realiza en reproductores de CSA y en los cuales se pueden colectar varias veces durante un tiempo considerable, en el cual se obtienen muestras de esperma directamente desde la cola del epidídimo, con lo que ello implica, es decir sin la presencia de las secreciones seminales que representa dificultades importantes en el manejo posterior del semen, donde no es necesaria la presencia de una hembra en celo, y se puede obtener muestras puras de esperma (M. Guido Pérez et al., 2014).

2.4. CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE LLAMA

Como características generales del semen de CSA se conoce que presenta una alta viscosidad y filancia, bajas tasas de motilidad progresiva, menores concentraciones y volumen escaso (Juárez, 2018). Las variables seminales en la llama varían de acuerdo al método de colección, temporada reproductiva y edad (Giuliano et al., 2008). Como características generales propias de una eyaculación natural en vagina artificial se mencionan promedios para: volumen eyaculado, 3.5 mL; pH, 8.6; concentración espermática, 84.7 millones por microlitro; número de espermatozoides normales, 32.5 %;



piezas medias anormales, 39.9 %; otras anomalías 27.6 %; motilidad total en semen fresco 25 % y motilidad en semen diluido 32.6 % (Von Baer & Hellemann, 1998).

En la llama, con relación al color, el semen es blanco lechoso en muestras obtenidas por electroeyaculación, donde también se tienen promedios menores a los obtenidos por vagina artificial entre ellos: el volumen, 2.91 mL; motilidad total, 28.1 % concentración espermática, 39.43 millones por mililitro; y vivos 59.7 % (Director et al., 2007; Laruta-Limachi et al., 2016b).

2.4.1. Características de espermatozoides obtenidos del conducto deferente

Como características macroscópicas, se tiene entre 80 a 100 μ L el volumen de semen obtenido de cada macho por desviación de conductos deferentes (Aisen et al., 2021) o también expresadas en número de gotas varía desde 8 a 11,5 gotas cuyo color característico de estas gotas de esperma obtenidas son de color blanco lechoso (Pérez, M.; Zevallos, J.; Pérez U., 2014).

Las características microscópicas varían de acuerdo al método de obtención, los trabajos realizados en relación a espermatozoides epididimarios únicamente en alpacas reportan motilidades totales al momento de la recuperación que fluctúan entre 42.2 % (Vásquez et al., 2012); 46.9 % (Morton et al., 2007a); 69% (Terreros, 2011); 30% (Juárez, 2018), estos últimos obtenidos directamente de colas de epidídimos de testículos extraídos de los animales evaluados; para espermatozoides obtenidos de la desviación del conducto deferente, en estudios realizados en alpacas se tienen motilidades totales 54% (Bertuzzi et al., 2020); 53.6% (Torres, 2018), 43.98% (Calderón, 2015). Respecto a la vitalidad y funcionalidad de membrana, en muestras obtenidas por recuperación de espermatozoides los resultados oscilan entre 48.97% (Juárez, 2018); 79.3% (Gómez-Quispe et al., 2016) y 51.8% (Choez A. et al., 2017) respectivamente; y para obtenidos



por desviación de conductos deferentes están 34.73 % (Calderón, 2015); 65.8% (Arizabal, 2018) y 75.69% (Gómez-Quispe et al., 2016) respectivamente.

2.5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA

Existen distintos criterios al momento de definir la calidad espermática de una muestra, sobre todo cuando se trata de muestras de semen descongeladas, las cuales serán utilizadas con el fin de fertilizar ovocitos, se ha propuesto considerar la concentración espermática, motilidad, y tasa de células normales y anormales; también se han tomado en cuenta la funcionalidad de membrana e integridad de cromatina (Colenbrander et al., 2003; Rodríguez-Martínez, 2007).

Sin embargo, para una correcta fertilización *in vivo* se tiene en preferencia una elevada motilidad, bajo número de anomalías, membranas y cromatina conservadas, con el fin de garantizar la resistencia de los espermatozoides, frente a las difíciles condiciones luego de la deposición en el tracto genital en el caso de la fertilización *in vivo* y frente a la simulación de estas condiciones desafiantes con el fin de la capacitación espermática en la fertilización *in vitro* (Salman A., 2021).

En relación a la motilidad, aptitud de membrana, integridad acrosomal, y la vitalidad en conjunto de los gametos se ven reducidos luego de la descongelación, se reportó una alta correlación entre el congelamiento espermático y el número de células inmóviles y defectos mitocondriales; también se ve comprometida la morfología espermática luego del descongelado observándose un incremento de deformidades secundarias en la estructura de membrana (Hezavehei et al., 2018).



2.5.1. Motilidad

En llamas particularmente, tras la evaluación de semen descongelado a través del sistema ISAS CASA, se obtuvo reducción de la motilidad desde 22.8 % hasta un 8.52 % (Laruta-Limachi et al., 2016a). Por otro lado, es posible la evaluación de las motilidades por observación subjetiva de campos mediante un microscopio óptico, mediante esta técnica (Arizabal, 2018) reporta que tras el descongelado de semen de alpaca, la motilidad total disminuye desde 63.8 % hasta un 27.1 % respecto a espermatozoides frescos.

2.5.2. Viabilidad

La viabilidad espermática, evaluada mediante la tinción de YODURO DE PROPIDIO (CFDA/PI), luego del descongelado también disminuye hasta en un 40.6 % en llamas (Fumuso et al., 2019). Otras técnicas más rudimentarias para evaluar la integridad de membrana en llamas, es decir la viabilidad espermática es el uso de tinciones vitales como Eosina-Nigrosina, en la que se utiliza la evaluación subjetiva en un microscopio óptico de contraste de fase (Ccoiso, 2019).

2.5.3. Funcionalidad de membrana

Para la evaluación de la funcionalidad de membrana, se utiliza generalmente el test hiposmótico (HOST), en donde se han reportado caídas a valores menores al 20% luego del descongelado en semen de llamas (Fumuso et al., 2019). Vázquez et al. (2012) estableció el protocolo de la evaluación HOST en espermatozoides epididimarios de alpaca, mediante el empleo de solución hiposmótica con un valor de 150 mOsm/Kg y una exposición de 15 minutos se obtienen resultados acertados para esta evaluación.



2.6. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN EN CSA

Entendida como una tecnología eficaz en el manejo y preservación de la fertilidad masculina, y que en el caso de animales domésticos se desea conservar y diseminar su calidad genética, donde los gametos preservados pueden ser utilizados en la inseminación artificial, fertilización *in vitro* o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (Hezavehei et al., 2018).

Los objetivos de la criobiología en la preservación del semen están dirigidos a minimizar el daño celular producto de la congelación – descongelación, daños a nivel de membrana, proteínas celulares, organelas celulares, alteraciones de estructura y metabolismo celular, por lo tanto uno de los principales problemas en la obtención de protocolos adecuados de criopreservación que puedan amortiguar estos daños recae en el uso adecuado, concentración y perfusión intracelular del agente crioprotector (ACP), también influyen las velocidades de enfriamiento, velocidad de congelamiento, conductividad térmica, diversidad citológica, perfusión del ACP, y el proceso de descongelamiento (Herrán & Guevara, 2021).

Se han realizado diversos estudios sobre criopreservación de espermatozoides en CSA en los cuales se evaluó la viabilidad del congelamiento de espermatozoides de estas especies, con todo lo que implican sus particularidades, y se han reportado resultados variables (P. Delgado & Quispe, 2015; Pérez et al., 2016). Estos arrojaron resultados inconstantes con relación a la calidad espermática y a las tasas de fecundación, ensayándose métodos de colección, uso de diferentes dilutores y ACP, tiempos y velocidades de enfriamiento, de equilibrio y de congelación (Carretero et al., 2015a; Ccoiso, 2019; Choez A. et al., 2017; Delgado & Quispe, 1993; O. E. Gómez-Quispe et al., 2019; Pacheco Curie, 2008; Ugarelli et al., 2017). Los resultados de las



investigaciones realizadas hasta el momento apenas han posibilitado determinar claramente las dificultades de conservación de semen de CSA y brindaron alternativas que permitan optimizar un protocolo de criopreservación, a pesar de estas dificultades los estudios se siguen realizando con el fin de contribuir al perfeccionamiento de esta biotecnología en beneficio de la producción de la especie estudiada.

2.6.1. Proceso de congelamiento del semen

Los espermatozoides de CSA son muy sensibles al enfriamiento y congelación, esta sensibilidad se evidencia en la disminución de la motilidad tras la descongelación (Medeiros et al., 2002). Este proceso se lleva a cabo en una solución acuosa, cuya concentración de solutos desempeña un rol importante en el proceso de congelación; de este modo cuando una suspensión de espermatozoides alcanza temperaturas entre $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ se inicia la formación de núcleos de hielo en el medio extracelular, incrementando la concentración de solutos durante el cambio de fase, por lo que las células empiezan a deshidratarse; el estado de sobre-enfriamiento (Figura N° 1) inicia con la disminución de la temperatura debajo del punto de cristalización pero el agua intracelular se mantiene en estado líquido y fluye hacia el espacio extracelular, mientras la temperatura siga disminuyendo y llegue al estado de nucleación en el que el agua intracelular remanente se cristalice (Boiso, 2001). Llegado a este punto, el proceso genera dos efectos nocivos opuestos que dependen de la velocidad de enfriamiento, si ésta es lenta los espermatozoides experimentan una mayor contracción con la extracción de proteínas y lípidos y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo contrario si la velocidad de enfriamiento es mayor, se da una mayor formación de hielo intracelular letal para los espermatozoides, por lo tanto para alcanzar un mínimo de daño sobre los gametos

es necesaria una velocidad de enfriamiento óptima que equilibre los efectos de este proceso (Holt & Penfold, 2014).

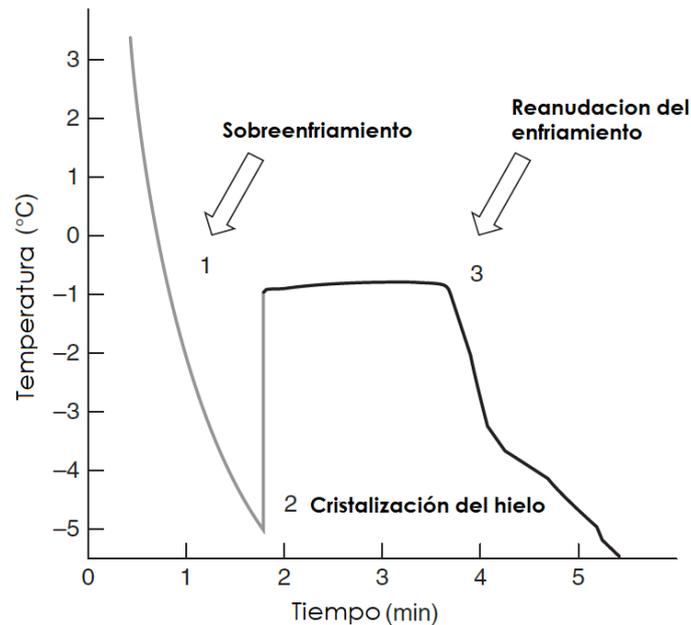


Figura N° 1. Curva térmica dentro de una pajilla al momento de la congelación

Fuente: (Holt & Penfold, 2014)

2.6.2. Crioinjurias y agentes crioprotectores

A pesar de que una adecuada velocidad de enfriamiento signifique mayor sobrevivencia de las células congeladas, ésta no está garantizada completamente, existen crioinjurias que serán letales para las células, como la formación de hielo intracelular, estrés osmótico sobre las membranas, la presión ocasionada por el frente de hielo que deforma las células a tan baja temperatura que se dan microfisuras de las membranas celulares, sobre todo a temperaturas menores a los 10 °C (Boiso, 2001). Sobre todo la mayor letalidad se da en una zona intermedia (-15 °C a -60 °C), temperatura en la cual el espermatozoide pasa dos veces (Gao & Critser, 2000). Este daño se extiende también al ordenamiento molecular de los lípidos de las membranas celulares de los



espermatozoides, los lípidos como la fosfatidiletanolamina, llamados no-bilaminares cambian de conformación al momento del enfriamiento y se mantienen en disposición de monolamina durante la congelación, es en el momento del descongelado en el que estos lípidos no vuelven al estado bilaminar, conformando un daño permanente (Erdem Öztürk et al., 2020).

A temperaturas más allá de -180°C durante el estado de criopreservación no existe energía térmica con la que no se puedan dar reacciones químicas en las células congeladas, las únicas reacciones que ocurren son eventos foto-físicos como la formación de radicales libres y la rotura de macromoléculas producto de radiación ionizante externa o rayos cósmicos (Mazur, 1984).

Frente a estos daños, existe la posibilidad de agregar aditivos al medio de congelamiento con el fin de proteger a los espermatozoides, están por ejemplo los ACP, antioxidantes, proteínas anticongelantes, ácidos grasos, suero animal, nanopartículas o aceites esenciales de origen vegetal (Hezavehei et al., 2018). En 1949, Polge, Smith y Parkes descubrieron por accidente la aplicación del glicerol como ACP, el cual usado a una concentración correcta y a una velocidad de congelación correcta incrementa la posibilidad de supervivencia de las células congeladas (Polge et al., 1949), disminuyendo el daño por shock frío, la formación de hielo intracelular durante la congelación, la recrystalización durante el descongelamiento y la desestabilización de membrana; los requisitos para un ACP son que este sea hidrosoluble y presente una toxicidad mínima (Öztürk et al., 2020).

Por otro lado, la yema de huevo (YH) actúa como agente protector de membrana de espermatozoides, gracias a un resto fosfolípido de la fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL), entre los mecanismos de protección se piensa que se unen a proteínas



BSP perjudiciales responsables de la pérdida de colesterol y fosfolípidos de membrana, del mismo modo un segundo mecanismo de protección consiste en la ganancia de lípidos de la membrana espermática disminuyendo el daño espermático reflejado en la conservación de la motilidad total (Bergeron et al., 2004), se ha establecido también que cualquier dilutor que contenga fosfatos de colina (presente en la yema de huevo) tiene capacidad de protección sobre la membrana espermática frente al enfriamiento y criopreservación (Bergeron & Manjunath, 2006).



CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE ESTUDIO

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, localizado en el distrito de Puno, provincia de Puno del departamento de Puno, a 3840 m.s.n.m., latitud sur 15° 49’ 20” y longitud 70° 01’ 07” (Google, 2021); durante los meses de enero a marzo del 2021. A temperatura promedio de 11.3 °C (SENAMHI, 2021).

3.2. TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo corresponde a un estudio experimental puesto que se empleó una variable independiente (Temperatura inicial de congelación) con el fin de establecer relación causa-efecto sobre la calidad espermática de llamas. Fue de carácter prospectivo, porque las unidades experimentales aun no sufrieron cambios al momento de su obtención y se llevó a cabo durante los meses de enero a marzo del 2021. Corresponde a un estudio analítico, pues pretende explicar el efecto de la temperatura de criopreservación sobre la viabilidad espermática (Hernández-Sampiere & Mendoza, 2018).

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

La muestra fue no probabilística por conveniencia, puesto que las colectas de esperma son de naturaleza infinita, no cuantificable y la naturaleza experimental del estudio permite muestras entre 1 a 50 repeticiones por lo cual se trabajó con un total de



37 pajillas (Casal & Mateu, 2003; Hernández-Sampiere & Mendoza, 2018). También se tomó en cuenta otros trabajos de características similares al presente (Fumuso, 2018; Pérez et al., 2014)

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio se desarrolló aplicando la estrategia en la figura N° 2, en la que se realizaron 200 observaciones para la evaluación de la calidad espermática al momento de la colección (37 °C), al enfriamiento (5 °C) y al congelamiento/descongelamiento con 9; 10 y 18 repeticiones (pajillas) para cada tratamiento (-80; -100 y -120 °C) respectivamente, evaluándose motilidad, vitalidad y funcionalidad de membrana (HOST),

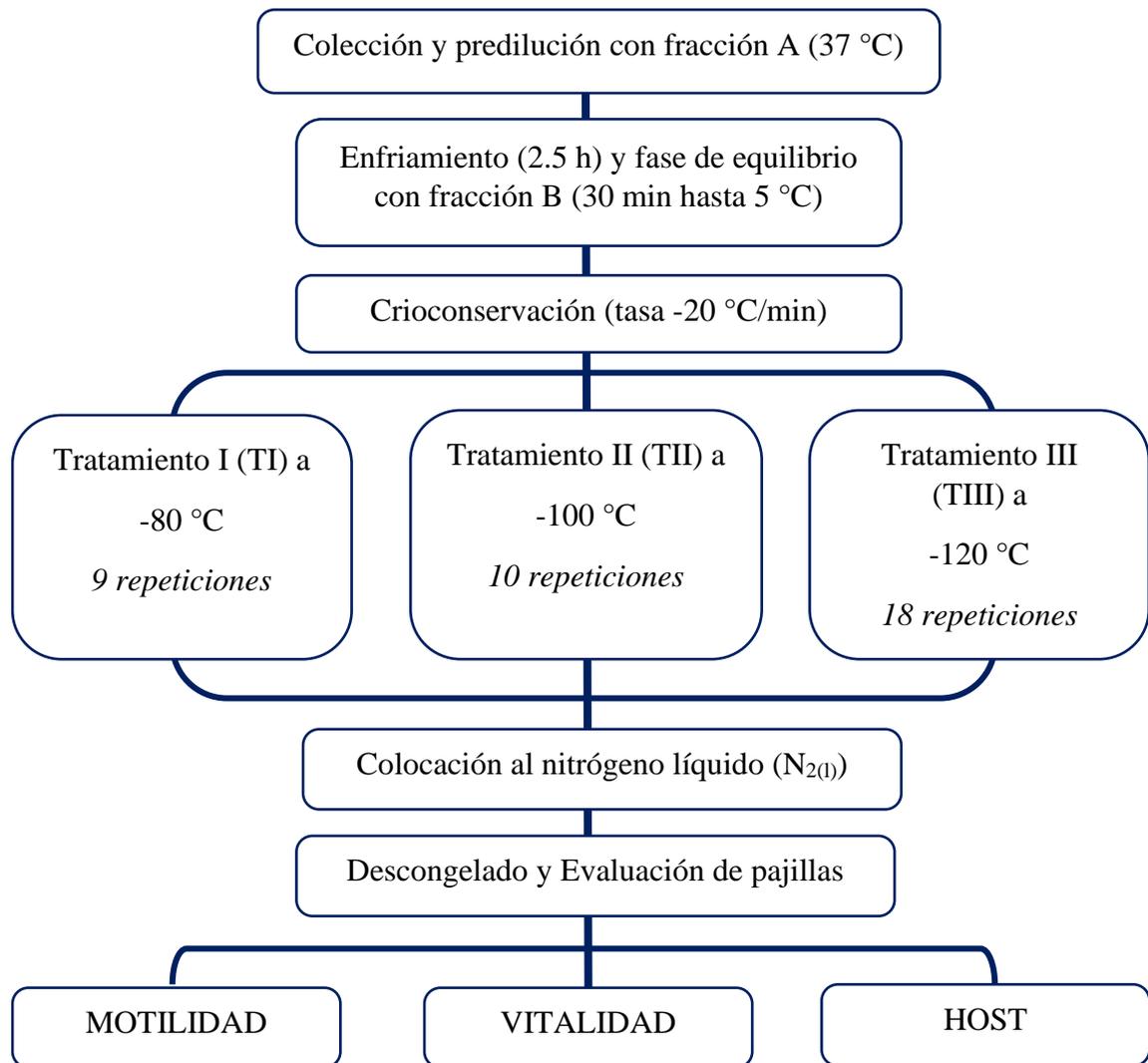


Figura N° 2. Diseño de investigación (Fuente: propia)

3.5. ANIMALES

Con la finalidad de obtener las muestras espermáticas se trabajó con seis llamas machos donadores de espermatozoides, de edades entre 2 a 3 años, estos fueron criados bajo igualdad de condiciones, con relación al manejo alimenticio (asociaciones de gramíneas y leguminosas) suplementado con heno de avena y agua *ad libitum*, albergadas en las instalaciones de animales mayores del Hospital Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; las cuales fueron sometidas a la desviación de conductos deferentes, técnica descrita por Pérez y Pérez (2014).



3.6. MATERIAL BIOLÓGICO

Esperma colectado a partir de conductos deferentes desviados de llamas macho, pre-diluido en TRIS-YH los cuales fueron combinados en “pools” con la finalidad de descartar el efecto macho sobre el estudio, obteniéndose en total 19 pools.

3.7. METODOLOGÍA

3.7.1. Cirugía de desviación del conducto deferente

Cada llama bajo anestesia fue posicionada en decúbito dorsal, sobre el área quirúrgica preparada se realizaron dos incisiones craneocaudales paramediales (4 cm) sobre la región donde están ubicados ambos cordones espermáticos. Luego de aislar el conducto deferente, este se seccionó en su porción más distal al epidídimo (7 cm). En lo posterior, por divulsión de tejido subcutáneo se redireccionó y se fijó el conducto deferente hacia y en la piel de la cara interna del muslo. Para el postoperatorio, se realizó la limpieza con suero fisiológico y curación con vaselina + penicilina sobre cada fistula, durante siete días con el fin de favorecer la cicatrización y formación adecuada de la fistula espermática (Pérez et al., 2014).

3.7.2. Preparación del dilutor

Para los efectos del estudio, se empleó el dilutor en base a TRIS [Tris(hidroximetil)aminometano] (Tabla N° 23, Anexos). Se preparó con materiales limpios y estériles, en una probeta graduada se colocó agua bidestilada 50 ml y se adicionaron el ácido cítrico, fructuosa, y Tris, cada componente fue colocado en el solvente y se aumentó agua bidestilada c.s.p. 100 mL. El dilutor fue colocado en baño maría a 80 °C (ebullición) durante 8 minutos para su tratamiento térmico, posteriormente



se envaso para su utilización dentro de máximo una semana, conservado en refrigeración (Hafez, 2002).

Antes de cada colección de la fistula, para la pre-dilución del esperma, a la solución en base a TRIS se le adicionó y homogenizó con YH fresco en proporción 4:1 (4 partes TRIS, 1 parte YH) obteniendo 5 mL, seguidamente se centrifugó para eliminar las gotas granulares de grasa, luego se recolecto 1 ml del sobrenadante del dilutor TRIS-YH en un tubo de ensayo (6 ml de capacidad) donde se le adicionó 4.8 mg de Gentamicina como antibiótico conservante, modificación del protocolo de Torres (2018) en la preparación de dilutor. Finalmente, el tubo se colocó en baño maría a 37 °C en un termo para su movilidad al lugar de colección.

3.7.3. Colección de esperma

Para la colección, se inició con la sujeción de la llama a colectar con ayuda de sogas, colocándola en posición de decúbito lateral derecho o izquierdo de acuerdo al lugar de la fistula a colectar, luego de higienizar el área de la fistula con suero fisiológico, mediante la fricción lineal del conducto deferente con la yema de los dedos se desplazó el esperma hacia la salida de la fistula, el cual fue aspirado dentro de un tip unido a una jeringa de tuberculina empapados internamente con el dilutor TRIS-YH. Las muestras de las 6 llamas fueron combinadas en un pool por día de colección y fueron pre-diluidas en 1 ml de dilutor, y trasladadas en el termo a 37 °C hacia el laboratorio para la evaluación (Pérez et al., 2014). Las colectas se realizaron con una frecuencia de 2 veces por semana durante 3 meses, obteniéndose en total 19 pools. Cada pool prediluido fue evaluado para obtener su concentración mediante una cámara de Neubauer y con ayuda de una pipeta de toma se procedió a diluir la muestra con agua bidestilada, homogenizándose con movimientos de muñeca, colocando posteriormente una pequeña gota entre la cámara y



una lámina cubreobjetos contabilizándose de acuerdo con lo descrito por Srivastava & Pande (2017).

3.7.4. Enfriamiento del esperma colectado

Luego de realizada la evaluación de la calidad espermática al momento de colección, el tubo de ensayo que contiene la muestra pre-diluida se colocó en un vaso de precipitados de 500 mL que sirve de baño maría, el cual es enfriado lentamente desde los 37 °C hasta los 5 °C durante un lapso de 2.5 horas, llegado a este punto es donde se adicionó la fracción B para el inicio de la fase de equilibrio de los espermatozoides durante 30 minutos (Torres, 2018).

3.7.5. Preparación del crioprotector (ACP)

Se preparó una fracción B, diluyente más glicerol 10 % (Tabla N° 24, Anexos) con el fin de obtener una concentración final de 5 % recomendada por Carretero et al., (2015b), para lo cual se prepararon 2 ml de fracción B de dilutor con TRIS-YH, el cual contuvo 0.2 ml de glicerol, el cual fue enfriado a 5 °C, de este se obtuvo una porción de 1 ml que en seguida se mezcló con la fracción A (1 mL), obteniendo una solución de dilutor + glicerol 5 % que contiene los espermatozoides, ajustándose a una concentración promedio de espermatozoides de 45 millones/pajilla, los cuales posteriormente fueron envasados en pajillas de 0.25 mL.

3.7.6. Proceso de congelación

Las pajillas fueron rotuladas con la fecha y el grupo de tratamiento (temperatura de congelamiento), éstas también fueron atemperadas a 5 °C. Posteriormente se realizó el empajillado con ayuda de una jeringa (1 mL) y una manguerilla de látex, de tal manera que un extremo de la manguerilla este acoplado al pivote de la jeringa, y el otro extremo



a la embocadura superior. Se introdujo cuidadosamente la pajilla en el tubo de ensayo que contenía la muestra diluida, procediéndose a aspirar con la jeringa una cantidad de 0.25 mL habiendo dejado una pequeña burbuja de aire obteniendo de esta manera una concentración de espermatozoides promedio de 45 millones/pajilla, seguidamente se realizó el sellado con alcohol polivinílico (PVOH) permitiendo un espacio entre el tope de la jeringa y la muestra (Torres, 2018). La pajilla, luego se colocó dentro de un beaker con agua a 5 °C.

El congelamiento se realizó en un biocongelador de semen utilizando una tasa de descenso de la temperatura de 20 °C/minuto y llegando a tres temperaturas diferentes antes de ser introducidas al nitrógeno líquido (-196°C): -80°C (TI), -100°C (TII) y -120°C (TIII) en 4, 5 y 6 minutos, respectivamente, finalmente las pajillas se colocaron dentro de las canastillas del tanque criogénico, para su conservación (Vita, 2008). En cada colección, predilución y preparación de los pools se realizó la congelación de las pajillas distribuidas para cada uno de los tres tratamientos.

3.7.7. Proceso de descongelamiento

Se extrajo cada pajilla con una pinza, luego se la sumergió dentro de un termo con agua atemperada a 37 °C durante 45 segundos, seguidamente se secó la pajilla y se procedió al corte de un extremo para su extracción (Pérez et al., 2014).

Previamente se tuvo preparadas laminas porta y cubre objeto atemperadas sobre platinas térmicas, entre las cuales se colocó la muestra para la evaluación de motilidad.

3.7.8. Evaluación de la calidad espermática microscópica

3.7.8.1. Motilidad total

En una lámina temperada a 37 °C, se colocó ~10 uL de la muestra diluida de esperma descongelada, la cual fue cubierta con una lámina cubreobjetos igualmente temperada de acuerdo a lo descrito por Srivastava & Pande (2017). Se realizó la lectura en un microscopio Leica provisto de una platina térmica (37 °C), para tal efecto se empleó el sistema de captura de imagen a computadora del software LAZ Suite. El recuento fue de carácter subjetivo, y se consideró el movimiento de los espermatozoides (Figura N° 13). Este proceso se llevó a cabo tras la colecta, al enfriamiento a 5 °C y a la descongelación, contabilizándose 200 espermatozoides, y los resultados fueron expresados en porcentaje (Ecuación A.1.).

Ecuación A.1. Motilidad total

$$\%MT = \frac{\text{Número de espermatozoides motiles}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3.7.8.2. Vitalidad

Se preparo la tinción eosina-nigrosina según describen Campbell et al., (1956), (Tabla N° 25, Anexos). De acuerdo a lo descrito por Srivastava & Pande (2017), se realizaron las tinciones en cada fase: colección, al equilibrio a 5 °C, y a la descongelación. Se evaluaron las láminas a magnificación de 100X con aceite de inmersión, contabilizándose 200 espermatozoides, los espermatozoides vivos fueron aquellos que no se lograron teñir, y muertos aquellos que se tiñeron de color rosado. La vitalidad fue representada como porcentajes (Ec. A2).



Ec. A.2. Determinación del porcentaje de vitalidad.

$$\%Vitalidad = \frac{\text{Número de espermatozoides no teñidos}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3.7.8.3. Evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide (HOST)

Se utilizó una solución hipo osmótica (Tabla N° 26, Anexos). La evaluación se llevó a cabo de acuerdo a lo descrito por Srivastava & Pande (2017). Se incubaron 50 uL de la muestra de esperma en 0.5 mL de la solución HOST contenida en un tubo de ensayo a 37 °C durante 45 minutos. Posteriormente se realizó un frotis de la muestra incubada en una lámina portaobjetos para ser contabilizados 200 espermatozoides, de los cuales los vivos con cola enrollada fueron los que respondieron positivamente a la prueba HOS. Estos resultados fueron expresados en porcentaje de acuerdo con la siguiente fórmula (Ec. A.4).

Ec. A.3. Espermatozoides positivos a la prueba HOS

$$\%Positivos a HOST = \frac{\text{Número de espermatozoides con cola enrollada}}{\text{Número total de espermatozoides observados}} \times 100$$

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó mediante el software estadístico Jamovi 1.6.23.0 (R Core Team, 2021). Los parámetros espermáticos obtenidos como proporción fueron transformados a valores angulares (Arcoseno de la raíz de p) (MS Excel v.2201, 2021). Se evaluaron las muestras espermáticas en pools combinado de los machos al momento de la colecta (37 °C) y a la fase de equilibrio (5 °C) y ambos se sometieron a una prueba



T de Student pareada, evaluándose además mediante correlación de Pearson con el fin de determinar el grado de asociación de los parámetros. Para los datos de evaluación espermática post descongelación se realizó un ANOVA one way entre la variable independiente, temperatura de congelación, con tres niveles de tratamiento (T1= -80 °C; T2= -100 °C y T3= -120 °C) y las variables dependientes fueron calidad espermática (motilidad total, vitalidad y HOST). Para la evaluación de patrones de motilidad se utilizó un MANOVA one way entre la variable independiente, temperaturas de congelación (tratamientos) y la variable dependiente, patrones de motilidad (progresiva, oscilatoria y circular). Para la comparación de medias se utilizó la Prueba múltiple de significación de Tukey. Todos los análisis se llevaron con un nivel de significancia de 0.05.

El modelo aditivo lineal del ANOVA de un factor:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

Donde

i = niveles de tratamiento: I (-80 °C), II (-100 °C) y III (-120 °C)

y_{ij} = variable respuesta

μ = media general

τ_i = efecto del i -ésimo tratamiento

e_{ij} = error experimental



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EVALUACIÓN A LA COLECCIÓN

Tabla 1. Viabilidad espermática al momento de la colección (37 °C)

	n	Viabilidad espermática; Media \pm DS
Motilidad total (%)	6	63.72 \pm 5.58
Test hiposmótico (%)	6	42.95 \pm 8.48
Vitalidad (%)	6	69.7 \pm 5.66

Fuente: Propia

Al examen macroscópico del esperma obtenido del conducto deferente, se obtuvieron 6 a 8 gotas por macho, color blanco lechoso. En la tabla 1. se aprecian los parámetros de calidad espermática obtenidos y prediluidos al momento de la colección, de los cuales se desprende un grado de asociación media entre la prueba HOST y la motilidad total, alta entre vitalidad y motilidad total, y una correlación baja entre HOST y vitalidad.

Los resultados de motilidad total a la colección son superiores a lo reportado con otra técnica de colección como electroeyaculación 29.5 \pm 5.7, 30.8 \pm 18.8 (Fumuso et al., 2020; Santa Cruz et al., 2016) o mediante vagina artificial en la que se reportan motilidades totales de 41.58; 11 \pm 1.8 (Ccoiso, 2019; Godoy Maldonado, 2014); no obstante, los resultados obtenidos son similares a lo reportado en diversos estudios donde los espermatozoides fueron obtenidos mediante la desviación del conducto deferente (Aisen et al., 2021; Bertuzzi et al., 2020; Meza et al., 2018). Los valores bajos obtenidos

tanto en la electroeyaculación como en vagina artificial se deben probablemente a la presencia del plasma seminal cuya viscosidad dificulta la movilidad espermática, mientras que la desviación del conducto deferente permite obtener muestras espermáticas concentradas suspendidas en plasma epididimario, el cual al ser resuspendido en solución TRIS YH, continúa manteniendo su motilidad y poder fertilizante.

4.2. EVALUACIÓN AL ENFRIAMIENTO

Tabla 2. Viabilidad espermática de espermatozoides al enfriamiento (5 °C)

	n	Viabilidad espermática; Media \pm DS
Motilidad total (%)	6	56.8 \pm 7.07
Test hiposmótico (%)	6	35.27 \pm 3.88
Vitalidad (%)	6	57.62 \pm 3.32

Fuente: Propia

De igual manera, en la tabla 2 se observan las variables de calidad espermática afectados por la primera fase de criopreservación, al comparar los grados de asociación entre los parámetros espermáticos se obtuvo asociación alta entre host y motilidad total, vitalidad y motilidad total, host y vitalidad con valores $r = 0.881$; 0.813 y 0.708 respectivamente.

En relación a la motilidad, estos valores son similares a los reportados mediante la misma técnica de obtención y en fase de equilibrio (5 °C), tales como 52.63 ± 7.62 y 48.31 ± 3.18 (Pérez et al., 2016), sin embargo, Morton et al., (2007b), mediante la recuperación de espermatozoides epididimarios en alpacas, obtiene como mucho 18.8 ± 4.1 de motilidad (%) utilizando TRIS, los valores mayores obtenidos a este último reporte

podría deberse a la adición de YH en el dilutor utilizado, cuyos fosfolípidos permiten la conservación de la membrana plasmática de los espermatozoides.

Tabla 3. Prueba t de student pareada entre evaluación a la colección y equilibrio

37 °C > 5 °C		statistic	df	p
HOST	Student's t	2.79	5	0.019
MOTILIDAD	Student's t	6.44	5	<0.001
VITALIDAD	Student's t	5.14	5	0.002

$H_a: u_{37^\circ} > u_{5^\circ}$

En la tabla 3. se muestra la evaluación de muestras pareadas, calidad espermática entre la colección y fase de equilibrio, la cual muestra la caída significativa de la calidad espermática desde los 37 °C hasta después de haber sucedido el equilibrio con el crioprotector a los 5 °C. La disminución de calidad espermática es similar a otros estudios en los cuales se trabajó con la desviación de conductos deferentes en alpacas (Calderón, 2015). En el estudio de Bertuzzi et al., (2020) se evaluó la calidad espermática al enfriamiento, presentando una caída en la motilidad desde 53.3 hasta 44.7 % a las 24 horas, cabe destacar que no se utilizó crioprotector alguno en comparación al presente estudio, en relación a la vitalidad y funcionalidad de membrana, esta no se vio disminuida significativamente a las 24 horas de mantenerlo en refrigeración, debido probablemente a que la velocidad de enfriamiento fue de 4.57 °C/hora (7horas) comparado a las 2.5 horas del presente trabajo.

4.3. EVALUACIÓN AL DESCONGELAMIENTO

4.3.1. Patrones de motilidad

Tabla 4. Motilidad espermática de espermatozoides crioconservados a tres diferentes temperaturas de congelación

	n	TI (-80 °C)	TII (-100 °C)	TIII (-120 °C)
Motilidad progresiva (%)	34	7.84 ± 1.25 a	9.59 ± 1.28 a	11.39 ± 1.18 a
Motilidad oscilatoria (%)	34	11.24 ± 1.05 a	14.35 ± 1.74 a	13.73 ± 0.91 a
Motilidad circular (%)	34	1.08 ± 0.57 a	1.55 ± 0.49 a	1.35 ± 0.64 a

Nota, a: el uso de la misma letra en cada fila indica valores similares ($p=0.331$) Pillai's Trace

Fuente propia.

En la Tabla 4 se aprecian los datos evaluados mediante un multi-análisis de varianza con tres tratamientos y tres variables dependientes (patrones de motilidad) los cuales fueron no significativos en tal sentido determinamos que los porcentajes de grados de motilidad son similares ($p > 0.05$) al ser sometidas a tres temperaturas de congelación. Estos valores son similares al trabajo de Zampini et al. (2020) en el cual se obtienen valores post descongelamiento en llamas de motilidad oscilatoria (%): 7.0 ± 3.7 y motilidad progresiva (%): 9.3 ± 3.6 ; cabe mencionar que el estudio citado se obtiene la muestra por electroeyaculación y se congela a 5 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido utilizando el mismo dilutor TRIS citrato YH + Glicerol.

En la tabla 4 también se observa que tras el descongelamiento, el patrón de motilidad progresiva es similar a la motilidad oscilatoria, lo cual permite atribuir el considerable porcentaje de motilidad progresiva al uso de la YH como aditivo al dilutor

TRIS como lo figura Fumuso et al. (2019) en cuyo estudio se valora el uso de plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides de llama.

4.3.2. Motilidad total, HOST y vitalidad

Tabla 5. Viabilidad espermática de espermatozoides crioconservados a tres diferentes temperaturas de congelación

	TRATAMIENTOS				P Value
	n	TI (-80 °C)	TII (-100 °C)	TIII (-120 °C)	
Motilidad total (%)	34	20.16 ± 1.65 a	25.49 ± 2.02 ab	26.47 ± 1.51 b	0.025
Test hiposmótico (%)	37	18.68 ± 2.15 a	24.03 ± 2.63 a	20.16 ± 1.65 a	0.307
Vitalidad (%)	34	31.2 ± 1.26 a	36.39 ± 1.69 ab	38.93 ± 1.34 b	0.003

Nota: **a, b**: letras diferentes en cada fila indica diferencia significativa.

Fuente propia.

Con relación a la motilidad total, de acuerdo con la tabla 5, se aprecia que los porcentajes de motilidad total muestran diferencias estadísticas observada principalmente al comparar la temperatura de -80 °C con la de -120 °C ($p=0.025$), notándose un mayor porcentaje de motilidad con esta última temperatura. Como es evidente en la figura N° 3 se muestra diferencia al comparar las temperaturas de congelación de -80 °C y -120 °C (en motilidad total), generando una respuesta favorable con esta última temperatura; mientras que la respuesta cuando fueron sometidos a -100 °C es similar comparado con los otros dos tratamientos.

La motilidad total obtenida en este estudio se asemeja a estudios recientes en los que se evalúan muestras espermáticas obtenidas de conducto deferente de camélidos sudamericanos, en el caso de Aisen et al. (2021) el cual reporta la motilidad total de



espermatozoides descongelados diluidos en plasma seminal dando 25.8 ± 2.42 , con la temperatura de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ lo cual indica también que temperaturas entre $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ expresan mayor recuperación de espermatozoides viables en relación a la motilidad total. Del mismo modo, Terreros (2011), reporta una motilidad total post descongelamiento de 24 % para espermatozoides epididimarios de alpaca obtenidos de testículos post mortem, utilizando como dilutor leche descremada, YH, fructuosa y glicerol.

De igual modo, Fumuso (2019) reporta motilidad total de $29,5\% \pm 5,7$ en espermatozoides obtenidos por electroeyaculación, los cuales son criopreservados a una temperatura inicial de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, haciéndose evidente una vez mas de que las temperaturas iniciales de criopreservación alrededor de los $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ permiten obtener una mejor motilidad espermática. Arizábal (2018), en su estudio al comparar niveles de congelamiento de espermatozoides obtenidos por la desviación del conducto deferente en alpacas, obtiene valores de motilidad total post descongelamiento de 18.2 %; 34.2 % y 29.0 % a niveles de congelamiento sobre la superficie de nitrógeno líquido de 3 cm; 5 cm y 7 cm respectivamente. Un estudio realizado en ratas, en el que uno de sus planteamientos fue evaluar distintas velocidades de congelación de espermatozoides epididimarios (Varisli et al., 2013), informa de motilidades totales post descongelamiento de 9.2 ± 0.8 ; 15.8 ± 4.9 ; 19.2 ± 3.3 y 22.5 ± 5.3 utilizando velocidades de congelamiento de 10; 40; 70 y $100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ respectivamente, con el objetivo de lograr la primera fase de criopreservación desde los $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el cual se infiere que una mayor velocidad de congelamiento y mayor temperatura inicial de congelación permite mantener, numéricamente, una mayor motilidad total.

Respecto a la prueba HOS, la evaluación muestra similitud sobre los espermatozoides crioconservados con tres temperaturas de congelación ($p=0.307$); por tal



motivo, estas temperaturas generan una recuperación similar tras la evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática. Los valores obtenidos en el presente estudio son similares a los reportados por Pérez-Durand et al. (2016) en un estudio sobre espermatozoides colectados del conducto deferente de alpacas sometidos a criopreservación, el cual presenta porcentajes de espermatozoides reactivos a la prueba entre 20.06 ± 4.56 y 32.18 ± 5.95 , en cuyo estudio también se puede denotar la relación entre motilidad total y test HOS, la cual es similar al presente estudio.

Del mismo modo, se presentan valores similares en trabajos realizados en llamas mediante la colección de semen por electroeyaculación (Fumuso et al., 2020); 21.54 (Calderón, 2015); 27.67 (Torres, 2018), sin embargo en este último trabajo, la autora estima valores superiores de enrollamiento (43.74 %) mediante el uso de plasma seminal (50 %) de cuyo estudio se desprende que el plasma seminal conserva de mejor manera la funcionalidad de membrana frente a las crioinjurias en comparación con el uso único de YH.

Mientras que en otros estudios de similar metodología al presente, se informa de valores superiores en la prueba HOS tales como $41.5 \% \pm 1.3$ con dilutor TRIS y temperatura inicial de criopreservación de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Aisen et al., 2021); $45.00 \% \pm 7.36$ con dilutor Leche descremada-YH-TRIS y dos niveles de criopreservación 8 cm y 4 cm por 10 minutos cada uno (Choez A. et al., 2017), estas diferencias podría explicarse por la mayor edad de los machos utilizados, y en la variación del dilutor y protocolo de criopreservación utilizado respectivamente.

Finalmente, en cuanto a la vitalidad espermática se observa diferencia estadística ($p=0.003$) sustancialmente entre las temperaturas iniciales de criopreservación de -80 y $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (figura N° 3), del cual se desprende que el uso de una mayor temperatura inicial



de congelamiento favorecería a una mayor tasa recuperación de espermatozoides vivos. Los valores de vitalidad espermática obtenidos en este estudio están comprendidos entre las estimaciones realizadas por trabajos similares, entre ellos a Fumuso et al. (2019) quien reporta $20.3 \pm 12,8\%$ de vitalidad espermática al descongelamiento de espermatozoides de llama obtenidos por electroeyaculación + tratamiento enzimático, congelados en varias fases hasta obtener una temperatura inicial de criopreservación de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin embargo los valores inferiores que reporta pudieran estar explicados por el distinto origen de los espermatozoides (electroeyaculación e incubación en colagenasa), dilutor, ACP y sobre todo el método de evaluación (Tinción Inmunofluorescencia PI) la cual sería más exacta al discriminar vivos de muertos. Aller et al. (2003) reporta vitalidad espermática de $32.4\% \pm 10.5$ en espermatozoides obtenidos por vagina artificial congelados a una temperatura inicial de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, teniendo en cuenta que el tipo de ACP utilizado incluía glicerol 6% y DMSO 8% el cual habría permitido una mejor supervivencia espermática al descongelamiento. Del mismo modo, Garcia et al. (2021) reporta una vitalidad espermática de $43.47\% \pm 16.67$ utilizando semen de alpaca obtenido post cópula, con temperatura inicial de congelación de $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$, presentando mayor variabilidad en sus resultados a pesar de las dificultades que conlleva el semen filante y contaminado con sangre. Similarmente, Carretero et al. (2015) informa una vitalidad espermática de $26.5\% \pm 12.7$ al trabajar con espermatozoides de llama obtenidos por electroeyaculación, incubados en colagenasa 0.1% , diluidos en lactosa-EDTA-YH, con una temperatura inicial de criopreservación de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$, en tal caso la colagenasa habría permitido acercar las condiciones necesarias para la capacitación y sobrevivencia de los espermatozoides. Sin embargo se han reportado valores inferiores de vitalidad, entre ellos 12.67% (Calderón, 2015) y 25.38% (Torres, 2018) de vitalidad espermática en muestras obtenidas por desviación del conducto deferente en alpacas, congeladas a un nivel de congelación de 4



cm y 5 cm respectivamente, un trabajo similar reporta vitalidades post descongelado de 22.4 %; 36.2 % y 32.4 % en muestras obtenidas por desviación de conducto deferentes, congelados a 3; 5 y 7 cm por encima de la superficie de nitrógeno líquido (Arizabal, 2018), dando a entender que una temperatura inicial adecuada en la criopreservación permite una mayor recuperación de espermatozoides viables en camélidos sudamericanos.

Valores elevados de vitalidad respecto al presente estudio también son reportados por Aisen et al. (2021) quien reporta un $61.4 \% \pm 2.5$ en muestras espermáticas obtenidas del conducto deferente, esta mayor recuperación de viabilidad espermática posiblemente está relacionada al protocolo de congelación empleado el cual fue a varios niveles y tiempos sobre vapores de nitrógeno líquido, es decir a una tasa de congelación más lenta, hasta lograr una temperatura inicial de criopreservación de $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$, sin embargo, este estudio logro mayores valores en todos los parámetros evaluados, debiéndose a las edades mayores de las alpacas machos, dicho de otro modo, se debería a una mayor calidad espermática inicial.

Si bien es cierto que la velocidad de congelamiento en cualquier protocolo de criopreservación es un factor clave durante el rango crítico de temperatura, también es cierto que cada especie posee composición estructural distinta, lo cual implica que su velocidad óptima de congelación sea distinta. En espermatozoides de toro se ha demostrado que una velocidad de congelación de $100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, hasta obtener una temperatura inicial de congelación de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de sumergir las pajillas en nitrógeno líquido proporcionan una mayor supervivencia espermática (Woelders & Malva, 1998); este estudio también demuestra la importancia de la velocidad de descongelamiento, la cual a $2400\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ permiten minimizar en lo más mínimo las crioinjurias sobre los

espermatozoides. Sin embargo, Senger et al. (1983) al realizar un estudio similar al presente concluye que las temperaturas iniciales de congelamiento (-80; -110 y -140 °C) no alteran la viabilidad espermática en toros, más bien si se observan diferencias favorables con una mayor temperatura inicial de congelación, específicamente con -140 °C, asociado al volumen de pajilla (mayor en pajilla de 0.5 mL frente a 0.25 mL).

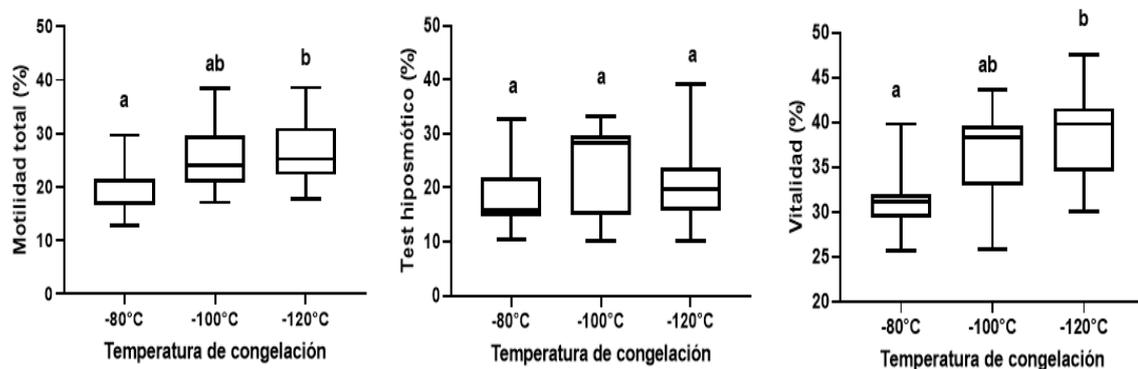


Figura N° 3. Comparación gráfica porcentual de la motilidad total, HOST y vitalidad de espermatozoides crioconservados (Fuente propia)

En líneas generales, el presente estudio y la mayoría de estudios previos en camélidos sudamericanos relacionados o no a la temperatura inicial de congelación, evidencian que una mayor velocidad de congelamiento o dicho de otro modo, una temperatura inicial de criopreservación alta (-120 °C) permite obtener valores significativamente superiores en relación a la vitalidad espermática, y sobre todo a la motilidad total de espermatozoides, muy a pesar de las diferencias en la manera de colección de espermatozoides o dilutor empleados (Stuart et al., 2019).

Sin embargo, un enfriamiento y congelación rápidos provocan “shock frío” y cristalización intracelular del agua libre respectivamente, provocando daño espermático irreversible y por lo tanto la muerte de una fracción de la población celular (Peter Mazur, 1996). Por lo tanto, en camélidos sudamericanos, una temperatura inicial de



criopreservación alta que reduce la tasa de daño celular al momento del descongelamiento permitirá aproximarnos a un protocolo de criopreservación eficaz; además de no omitir otros factores clave tales como el método de colección de espermatozoides, dilutor, ACP, velocidades de enfriamiento y tiempo de equilibrio utilizados (Shah et al., 2016), haciendo viable de esta manera su uso para posteriores aplicaciones en la inseminación artificial *in vivo* e *in vitro* en llamas, en vista de que en trabajos con metodología similar al presente, con relación a la obtención de muestras espermáticas y procesamiento de pajillas, alcanzaron resultados factibles en la fertilización de óvulos (Aller et al., 2003b; Pérez-Durand et al., 2016). Si bien los resultados del presente estudio están distantes de ser aplicables a gran escala, se procuró contribuir al conocimiento en la reproducción asistida de llamas, sobre todo por ser una especie de interés creciente en la actualidad.



V. CONCLUSIONES

- a. La calidad espermática comprendida por motilidad total, vitalidad y funcionalidad de membrana al momento de colección y al enfriamiento presentó calidad espermática apta teniendo en cuenta estudios de similar naturaleza.

- b. La temperatura de $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ al momento inicial de congelación entregó resultados superiores frente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con relación a motilidad y vitalidad espermática.



VI. RECOMENDACIONES

- a. Aunque los resultados del presente estudio están lejos de ser aprovechables en gran escala, éste permite aproximarse a desarrollar un manejo y protocolo adecuado en la criopreservación de espermatozoides en llamas.
- b. El utilizar $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ como temperatura inicial de congelación en el protocolo de criopreservación de semen de llama podría ser considerada en futuras investigaciones relacionadas a la fertilización *in vivo* e *in vitro*, pues otorga mayor supervivencia espermática a la descongelación.
- c. De cara a futuros estudios, sería conveniente la evaluación de otros aspectos como la velocidad de descongelación, distintos dilutores, velocidad de enfriamiento y tiempo de equilibrio.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, M. C. (2016). *Reproductive Biotechnologies in Swedish Male Alpacas*. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Abraham, M. C., De Verdier, K., Båge, R., & Morrell, J. M. (2017). Semen collection methods in alpacas. *Veterinary Record*, 180(25), 613. <https://doi.org/10.1136/vr.104074>
- Aisen, E. G., Huanca López, W., Pérez Durand, M. G., Torres Mamani, E., Villanueva Mori, J. C., Ousset, M. J., Medina, V. H., Pérez Guerra, U. H., & Huanca Mamani, T. (2021). Spermatozoa Obtained From Alpaca vas deferens. Effects of Seminal Plasma Added at Post-thawing. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(February), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.611301>
- Aller, J. F., Rebuffi, G. E., Cancino, A. K., & Alberio, R. H. (2003). Influence of Cryopreservation on the Motility, Viability and Fertility of Llama (Lama Glama) Spermatozoa. *Theriogenology*, 52, 15–23. http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/30_10_28_02aller.pdf <http://www.redalyc.org/pdf/495/49519702.pdf>
- Arizabal, J. (2018). EFECTO DE TRES NIVELES DE CONGELAMIENTO DE ESPERMATOZOIDES DEL CONDUCTO DEFERENTE EN ALPACAS (Vicugna pacos) [UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO]. In *SEGUNDA ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL*. http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/12303/Yana_Aydee_Quispe_Patricia.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10(1), 49–62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- Barker, C. A., & Gandier, J. C. (1957). Pregnancy In A Mare Resulting From Frozen Epididymal Spermatozoa. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 21(2), 47–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17648942> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1614368>
- Bergeron, A., Crête, M. H., Brindle, Y., & Manjunath, P. (2004). Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane. *Biology of Reproduction*, 70(3), 708–717. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022996>
- Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, 73(10), 1338–1344. <https://doi.org/10.1002/mrd.20565>
- Bertuzzi, M. L., Torres, E. Y., Huanca, T., Neild, D., & Carretero, M. I. (2020). Comparison of Extenders With the Addition of Egg Yolk for Cooling Alpaca



- Sperm Obtained From Deferent Ducts. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(November), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.597954>
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de Criobiología. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 18(4), 4–6.
- Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J., & Ordoñez, C. (1997). COLLECTION OF SEMEN AND ARTIFICIAL INSEMINATION OF ALPACAS. *Theriogenology*, 48(97), 361–367.
- Calderón, D. (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*)” [UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO]. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/1854>
- Campbell, R. C., Dott, H. M., & Glover, T. D. (1956). Nigrosin eosin as a stain for differentiating live and dead spermatozoa. *The Journal of Agricultural Science*, 48(1), 1–8. <https://doi.org/10.1017/S002185960003029X>
- Carretero, M. I., Neild, D. M., Ferrante, A., Caldevilla, M., Arraztoa, C. C., Fumuso, F. G., & Giuliano, S. M. (2015a). Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of Lama glama spermatozoa. *Andrologia*, 47(6), 685–693. <https://doi.org/10.1111/and.12319>
- Carretero, M. I., Neild, D. M., Ferrante, A., Caldevilla, M., Arraztoa, C. C., Fumuso, F. G., & Giuliano, S. M. (2015b). Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of Lama glama spermatozoa. *Andrologia*, 47(6), 685–693. <https://doi.org/10.1111/and.12319>
- Casal, J., & Mateu, E. (2003). TIPOS DE MUESTREO. *Rev. Epidem. Med. Prev.*, 1.
- Ccoiso, R. (2019). *Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de llama (Lama glama), por dos métodos de colección*. <http://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/UNSAAC/1808>
- Cebra, C., Anderson, D. E., Tibary, A., Van Saun, R. J., & Johnson, L. W. (Eds.). (2014). *Llama and Alpaca Care* (1st ed.). ELSEVIER.
- Choez A., K., Ruiz G., L., Sandoval M., R., Evangelista V., S., & Santiani A., A. (2017). Determinación de la Concentración Óptima de Tres Crioprotectores para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(3), 619. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13367>
- Colenbrander, B., Gadella, B. M., & Stout, T. A. E. (2003). The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reprod Domest Anim*, 38(4), 305–311.
- Cristofanelli, S., Antonini, M., Torres, D., Polidori, P., & Renieri, C. (2004). Meat and carcass quality from Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*). *Meat Science*, 66(3), 589–593. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00174-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00174-8)



- Cunha, A. T.M., Carvalho, J. O., Kussano, N. R., Martins, C. F., Mourão, G. B., & Dode, M. A. N. (2016). Bovine epididymal spermatozoa: Resistance to cryopreservation and binding ability to oviductal cells. *Cryobiology*, 73(3), 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.09.170>
- Cunha, Andrielle T.M., Carvalho, J. O., Guimarães, A. L. S., Leme, L. O., Caixeta, F. M., Viana, J. H. M., & Dode, M. A. N. (2019). Bovine epididymal spermatozoa treatment for in vitro fertilization: Heparin accelerates fertilization and enables a reduction in coincubation time. *PLoS ONE*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209692>
- Delgado, P. A., & Quispe, Y. (1993). EFECTO DE TRES NIVELES DE GLICEROL Y TIEMPOS DE EQUILIBRAMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE ESPERMÁTÓZOIDES DE LLAMA (*Lama glama*) POST-DESCONGELADO. *Japanese Journal of Radiological Technology*, 49(5), 785. <https://doi.org/10.6009/jjrt.KJ00003534360>
- Demyda-Peyrás, S., Bottrel, M., Acha, D., Ortiz, I., Hidalgo, M., Carrasco, J. J., Gómez-Arrones, V., Gósalvez, J., & Dorado, J. (2018). Effect of cooling rate on sperm quality of cryopreserved Andalusian donkey spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 193(2010), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.069>
- Director, A., Giuliano, S., Trasorras, V., Carretero, I., Pinto, M., & Miragaya, M. (2007). ELECTROEJACULATION IN LLAMA (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research*, 14(2), 203–206.
- DRA-Puno. (2019). POBLACIÓN PECUARIA 2019 – Departamento Puno, Consultado el 05/04/2021 en: <https://www.agropuno.gob.pe/informacion-estadistica/pecuario/>
- Erdem Öztürk, A., Numan Bucak, M., Bodu, M., Başpınar, N., Çelik, İ., Shu, Z., Keskin, N., & Gao, D. (2020). Cryobiology and Cryopreservation of Sperm. *Cryopreservation - Current Advances and Evaluations*, November 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89789>
- FAO. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Fao, 1–429. Consultado el 05/04/2021 en: https://tarwi.lamolina.edu.pe/~emellisho/zootecnia_archivos/situacion%20alpcas%20peru.pdf
- Fumuso, F. (2018). *Efecto del plasma seminal sobre los espermatozoides criopreservados de llama (Lama glama)*.
- Fumuso, Fernanda G., Giuliano, S. M., Chaves, M. G., Neild, D. M., Miragaya, M. H., & Carretero, M. I. (2019). Evaluation of the cryoprotective effect of seminal plasma on llama (*Lama glama*) spermatozoa. *Andrologia*, 51(6), 1–7. <https://doi.org/10.1111/and.13270>
- Fumuso, Fernanda Gabriela. (2019). *Efecto del plasma seminal sobre los espermatozoides criopreservados de llama (Lama glama)* [Universidad de Buenos Aires]. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/83356>



- Fumuso, Fernanda Gabriela, Giuliano, S. M., Chaves, G., Neild, D. M., Miragaya, M. H., Bertuzzi, M. L., & Carretero, M. I. (2020). Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. *Andrologia*, 52(6), 1–9. <https://doi.org/10.1111/and.13597>
- Gao, D., & Critser, J. K. (2000). Mechanisms of cryoinjury in living. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 41(4), 187–196.
- García V., W., Alarcón B., V., & Bravo M., W. (2017). Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(2), 337. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13080>
- Garcia, W., Maxi, E., Macedo, V., Mendoza, E., Cardenas, N., & Malaga, J. (2021). Effect of two cryopreservation methods on seminal quality and pregnancy rate in alpacas induced to ovulation with seminal plasma. *Spermova*, 10(2), 74–80. <https://doi.org/10.18548/ASPE/0008.11>
- 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(2–4), 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.016>
- Giuliano, S. M., Chaves, M. G., Trasorras, V. L., Gambarotta, M., Neild, D., Director, A., Pinto, M., & Miragaya, M. H. (2012). Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Animal Reproduction Science*, 131(3–4), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.010>
- Giuliano, Susana. (2012). Extracción y Evaluación de Semen de Camelidos Sudamericanos. *SPERMOVA*, 2, 6–9.
- Godoy Maldonado, D. I. (2014). *CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL DEL SEMEN DE LLAMA COLECTADO MEDIANTE VAGINA ARTIFICIAL* (Issue Reproduction). UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE FACULTAD.
- Gómez-Quispe, O. E., Gutiérrez-Reynoso, G. A., Gallegos-Cardenas, A., Fumuso, F. G., Asparrin, M., Asparrin-Del Carpio, M., Jara, C. W., Ponce, D., Miguel, M., Youngs, C. R., & Vivanco, H. W. (2019). Motility and recovery of alpaca (*Vicugna pacos*) spermatozoa after centrifugation in a density gradient solution. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(2), 96–104.
- Gómez-Quispe, Oscar E., Pérez, M. G., & Ojeda-Gutierrez, Y. G. (2016). Survival to freezing of sperm collected by vas deferens from *Vicugna pacos* with tempol antioxidant addition. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(6), 377–382. <https://doi.org/10.3923/ajava.2016.377.382>
- Google earth, (2021). Ciudad universitaria. Consultado el 05/04/2021 en: <https://earth.google.com/web/@-15.82238093,-70.01864993,3842.7092204a,25.22876475d,35y,0h,0t,0r>
- Guerrero, C. A. (2006). *Cryopreservation and Intracytoplasmic Sperm Injection With*



Bovine Epididymal Spermatozoa. August, 215.

- Hafez, B., & Hafez, E. S. E. (2000). *Reproduction in Farm Animals* (7th Ed.). Lippincott Williams & Wilkins.
- Hafez, E. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales* (6ta Ed.). Editorial Interamericana - Mc Graw – Hi.
- Hernández-Sampiere, R., & Mendoza, C. (2018). Metodología de la investigación: Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. In *Mc Graw Hill* (1ra ed., Vol. 1, Issue Mexico). McGrawHil Education.
- Herrán, G., & Guevara, P. (2021). CRIOPRESERVACIÓN DE GAMETOS Y EMBRIONES EN ANIMALES DOMÈSTICOS. *SEMINARIO DE PROFUNDIZACIÓN EN GENETICA Y REPRODUCCIÓN ANIMAL*, 1–22.
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H. M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., & Shahverdi, A. (2018). Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive BioMedicine Online*, 37(3), 327–339. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.05.012>
- Hick, M. V. H., Lamas, H. E., Echenique, J., Prieto, A., Castillo, M. F., & Frank, E. N. (2009). Estudio demográfico de los atributos morfológicos y productivos en poblaciones de llamas (*Lama glama*) de la provincia de Jujuy, Argentina. *Animal Genetic Resources Information*, 45(September), 71–78. <https://doi.org/10.1017/S1014233909990368>
- Holt, W. V., & Penfold, L. M. (2014). Fundamental and Practical Aspects of Semen Cryopreservation. In P. J. Chenoweth & S. P. Lorton (Eds.), *Animal Andrology Theories and Applications* (1st ed.). CAB International.
- Huanca, W., Cordero, A., & Adams, G. P. (2007). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos: avances y perspectivas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 15(1), 195–201. <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/53086>
- INEI. (2019). Población pecuaria, Consultado el 05/04/2021 en: <http://m.inei.gob.pe/estadisticas/indice-tematico/agricultural/>
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 219–228. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700219>
- Juárez, J. (2018). *Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Kumar, S., Millar, J. D., & Watson, P. F. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: A comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 46(3), 246–253. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00040-3)



- Laruta-Limachi, F., Loza-Murguía, M. G., & Delgado-Callisaya, P. Á. (2016b). Evaluación de características microscópicas de semen de llama (*Lama glama*) crioconservados en dos dilutores. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 3(1), 8–21.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*, 247(3), 0–4. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1984.247.3.C125>
- Mazur, Peter. (1996). Chapter 10 Principles of medical cryobiology: The freezing of living cells, tissues, and organs. *Principles of Medical Biology*, 4(PART D), 355–384. [https://doi.org/10.1016/S1569-2582\(96\)80135-8](https://doi.org/10.1016/S1569-2582(96)80135-8)
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). CURRENT STATUS OF SPERM CRYOPRESERVATION: WHY ISN'T IT BETTER? *Theriogenology*, February 1921, 1–4.
- MINAGRI. (n.d.). Camélidos Sudamericanos, Consultado el 05/04/2021 en: <https://www.midagri.gob.pe/portal/objetivos/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/298-camelidos-sudamericanos?start=4>
- Morton, K. M., Bathgate, R., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2007). Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: A comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(7), 792–796. <https://doi.org/10.1071/RD07049>
- Osuagwuh, U. I. (2017). *Further approaches on sperm cryopreservation protocol towards the establishment of the sperm bank from endangered native Catalan ram breeds (Xisqueta and Aranesa)*.
- Pacheco Curie, J. I. (2008). Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos - Methods of semen collection in south american camelids. *REDVET*, 9(4).
- Pérez-Durand, M. G., Zevallos-Aragón, J. P., & Pérez-Guerra, U. H. (2016). Viabilidad in vitro e in vivo de los espermatozoides congelados/descongelados del conducto deferente de Alpacas (*vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 18(2). <https://doi.org/10.18271/ria.2016.203>
- Pérez, M.; Zevallos, J; Pérez, U. (2014). Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. *Spermova*, 4(2), 139–144.
- Pérez, M. Guido, Quintano, J., & Pérez, U. H. (2014). SOBREVIVENCIA ESPERMÁTICA EN REFRIGERACIÓN A 5 °C RECUPERADOS DEL CONDUCTO DEFERENTE DE ALPACA EN TRES DILUTORES CON DOS PROTECTORES DE MEMBRANA. *Spermova*, 4(2), 153–158.
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature (London)*, 164, 666.
- Rebuffi, G., Cancino, A., Alberio, R., Pampa, A. C., & Argentina, J. (2003). *Influencia De La Criopreservación Sobre La Motilidad, Viabilidad Y Fertilidad De Espermatozoides De Llama (Lama Glama) Spermatozoa*. 52, 15–23.



- Rodríguez-Martínez, H. (2007). State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1), 91–101. <https://doi.org/10.1071/RD06104>
- Salman Abu-Mohammed, A. (2021). *Cellular Basis and Optimization of Cryopreservation Survival of Bull Sperm = Base celular y optimización de la supervivencia de la criopreservación de espermatozoos de toro*. <http://hdl.handle.net/10612/12796>
- Santiani, A. (2012). Uso de dos Análogos de Superóxido Dismutasa para prevenir la Desestabilización Espermática Prematura durante la Criopreservación y Vitrificación en espermatozoides. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/279>
- SENAMHI. (2021). Datos Hidrometeorológicos en Puno. Consultado el 05/04/2021 en: <https://www.senamhi.gob.pe/main.php?dp=puno&p=estaciones>
- Senger, P. L., Mitchell, J. R., & Almquist, J. O. (1983). Influence of cooling rates and extenders upon post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .25- and .5-ml French straws. *Journal of Animal Science*, 56(6), 1261–1268. <https://doi.org/10.2527/jas1983.5661261x>
- Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H., & Qureshi, I. Z. (2016). Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrology*, 4(5), 972–976. <https://doi.org/10.1111/andr.12214>
- Skidmore, J. A., Crichton, E. G., Malo, C. M., Vaughan, J. L., Wani, N. A., & Herrid, M. (2020). Reproductive technologies in camelids. In *Reproductive Technologies in Animals*. INC. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817107-3.00008-4>
- Srivastava, N., & Pande, M. (Eds.). (2017). *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)* (1°). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5200-2_18
- Stuart, C. C., Vaughan, J. L., Kershaw, C. M., de Graaf, S. P., & Bathgate, R. (2019). Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific Reports*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49203-z>
- Suzuki, A., Kigure, T., Harada, T., Teramura, T., Shimoda, N., & Nishizawa, O. (1993). PREGNANCY OBTAINED BY IN VITRO WITH EPIDIDYMAL SPERMATOZOEA FERTILIZATION (IVF) IN OBSTRUCTIVE : REPORT OF TWO CASES. *Acta Urologica Japonica, Kyoto University Research Information Repository*, 39(7), 669–671.
- Terreros, M. (2011). *Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca* [Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11182>
- Thomas, C. A., Garner, D. L., Dejarnette, J. M., & Marshall, C. E. (1998). Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined



- by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, 58(3), 786–793.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod58.3.786>
- Torres, E. (2018). EFECTO DE LA ADICIÓN DE PLASMA SEMINAL ANTES Y DESPUÉS DE LA CONGELACIÓN DE ESPERMATOZOIDES COLECTADOS DEL CONDUCTO DEFERENTE DE ALPACA SOBRE ALGUNAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS [UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO]. In *Tesis*.
<http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/10420>
- Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S., & Santiani, A. (2017). Evaluación de la Integridad Acrosomal en Espermatozoides Epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 28(1), 130–140.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12947>
- Varisli, O., Scott, H., Agca, C., & Agca, Y. (2013). The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm. *Cryobiology*, 67(2), 109–116.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.05.009>
- Vásquez, J., Florentini, E. A., & Valdivia, M. (2012). Hypoosmotic Swelling Test in Alpaca (*Vicugna pacos*) Epididymal Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(6), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.01988.x>
- Virgilio, A. B., Wilber, G. V., & Bravo, P. W. (2012). Artificial insemination of alpacas with semen collected by vaginal aspiration and by artificial vagina. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 23(1), 58–64.
<https://doi.org/10.15381/rivep.v23i1.882>
- Vita, B. D. E. (2008). *ESTUDO DE DIFERENTES SISTEMAS E CURVAS DE CONGELAÇÃO NA EFICIÊNCIA DA CONGELABILIDADE E FERTILIDADE DE SÊMEN EQÜINO*. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE.
- Von Baer, L., & Hellemann, C. (1998). Variables seminales en llama (*Lama glama*). In *Archivos de Medicina Veterinaria* (Vol. 30, Issue 2, pp. 171–176).
- Woelders, H., & Malva, A. P. (1998). How Important is the Cooling Rate in Cryopreservation of (Bull) Semen, and what is its Relation to Thawing Rate and Glycerol Concentration. *Reproduction in Domestic Animals*, 33(3–4), 299–305.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1998.tb01361.x>
- Zampini, R., Castro-González, X. A., Sari, L. M., Martin, A., Diaz, A. V., Argañaraz, M. E., & Apichela, S. A. (2020). Effect of Cooling and Freezing on Llama (*Lama glama*) Sperm Ultrastructure. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(October), 1–14.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.587596>



ANEXOS

MATERIALES

3.3.1. SUSTANCIAS Y REACTIVOS

- Nitrógeno líquido
- Gentamicina 160 mg/2 ml
- Yema de huevo fresco de gallina
- Dilutor TRIS-citrato
- Agua bidestilada
- Glicerol
- Alcohol 70°
- Alcohol polivinílico
- Vaselina sólida, Portugal®
- Solución hipoosmótica
- Colorante eosina nigrosina

3.3.2. EQUIPOS Y MATERIALES DE LABORATORIO

- Microscopio óptico Leica DM750
- Centrifugadora
- Termómetro digital
- Termocupla
- Probeta graduada, 100 ml
- Tubos de ensayo, 4 ml
- Vaso de precipitados, 100 ml
- Cámara de flujo laminar
- Tanque criogénico
- Balanza digital
- Refrigeradora
- Termo de colección
- Gradillas
- Equipo congelador de semen (TK 3000 COMPACTA CSE, TK Technologies®, Brasil)

3.3.3. MATERIALES

- Pajillas de semen, 0.25 ml (IMV technologies®, Francia)
- Jeringas, 10 mL; 5 mL; 3 mL y 1 mL
- Torundas de algodón
- Papel toalla
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos
- Papel platino

ANEXO A: TABLAS

Tabla A.6. Parámetros espermáticos a la colección (37 °C) y al enfriamiento (5 °C)

	37 °C			5 °C		
	MT	V	H	MT	V	H
	60.99	62.96	44.93	55.42	57.43	38.10
	67.92	69.23	57.31	61.24	62.80	36.59
	63.85	69.31	42.33	58.71	56.34	35.80
	72.36	80.20	43.27	66.99	60.12	39.91
	60.00	68.75	31.75	47.57	53.69	30.69
	57.23	67.71	38.10	50.85	55.43	30.49
Promedio	63.73	69.69	42.95	56.80	57.63	35.26

MT: Motilidad Total; V: Vitalidad; H: HOST

Fuente propia.

Tabla A.7. Patrones de motilidad a la colección (37 °C) y al enfriamiento (5 °C)

TEMPERATURA	37 °C				5 °C			
	MP	MO	MC	MT	MP	MO	MC	MT
	38.5	17.6	4.9	60.99	12.0	37.8	5.6	55.42
	34.2	30.5	3.2	67.92	18.7	38.8	3.8	61.24
	24.9	33.3	5.6	63.85	26.4	28.4	4.0	58.71
	28.5	31.3	12.6	72.36	21.8	30.1	15.0	66.99
	15.5	36.1	8.5	60.00	13.1	30.6	3.9	47.57
	14.1	36.3	6.8	57.23	15.8	31.6	3.4	50.85
Promedio	25.9	30.8	6.9	63.7	18.0	32.9	6.0	56.8

MP: motilidad progresiva, MO: motilidad oscilatoria, MC: motilidad circular, MT: motilidad total.

Fuente propia.

Tabla A.8. Parámetros espermáticos al post descongelamiento

TRATAMIENTO	Repetición	MOTILIDAD	VITALIDAD	HOST
-80 °C	1	13.44	25.73	32.72
	2	22.02	31.86	19.82
	3	19.90	29.35	21.94
	4	29.70	29.56	15.93
	5	12.79	29.47	14.62
	6	20.36	32.04	21.94
	7	21.08	31.10	15.95
	8	21.08	31.86	10.53
	9	21.07	39.80	14.64
Promedio		20.16	31.20	18.68
-100 °C	1	17.11	35.84	33.18
	2	21.78	39.64	29.58
	3	17.97	38.70	27.80
	4	23.47	43.69	23.53
	5	31.19	39.71	29.78
	6	38.50	39.30	28.67
	7	24.40	37.86	29.78
	8	29.06	34.13	16.26
	9	17.82	25.81	10.20
	10	27.50	29.27	11.56
Promedio		24.88	36.39	24.03
-120 °C	1	22.22	30.10	20.72
	2	38.57	41.58	27.05
	3	27.43	39.80	32.56
	4	31.11	41.00	39.05
	5	36.59	39.50	15.53
	6	32.26	46.53	23.71
	7	23.90	42.65	16.67
	8	23.89	38.50	15.81
	9	20.43	40.89	13.64
	10	21.51	47.55	12.50
	11	24.76	41.18	10.26
	12	26.11	34.48	23.71
	13	23.21	30.73	19.12
	14	25.21	36.71	22.33
	15	26.00	32.80	21.59
	16			19.72
	17			19.71
	18			18.35
Promedio		26.88	38.93	20.67

Fuente propia.

Tabla A.9. Patrones de motilidad al descongelamiento

TRATAMIENTO	Repetición	MP	MO	MC	MT
- 80 °C	1	1.98	10.28	1.19	13.44
	2	9.63	7.34	5.05	22.02
	3	10.99	8.38	0.52	19.90
	4	10.40	16.83	2.48	29.70
	5	2.28	10.50	0.00	12.79
	6	4.98	15.38	0.00	20.36
	7	11.76	8.82	0.49	21.08
	8	8.97	12.11	0.00	21.08
	9	9.55	11.52	0.00	21.07
Promedio		7.84	11.24	1.08	20.16
-100 °C	1	6.14	7.02	3.95	17.11
	2	8.91	8.91	3.96	21.78
	3	8.76	6.91	2.30	17.97
	4	7.98	13.62	1.88	23.47
	5	8.72	20.64	1.83	31.19
	6	19.00	19.50	0.00	38.50
	7	10.05	14.35	0.00	24.40
	8	13.79	15.27	0.00	29.06
	9	9.90	7.92	0.00	17.82
	10	5.00	22.50	0.00	27.50
Promedio		9.82	13.66	1.39	24.88
-120 °C	1	8.21	9.66	4.35	22.22
	2	23.33	14.76	0.48	38.57
	3	6.75	17.72	2.95	27.43
	4	8.89	13.33	8.89	31.11
	5	17.56	18.54	0.49	36.59
	6	12.90	19.35	0.00	32.26
	7	7.57	14.74	1.59	23.90
	8	12.55	11.34	0.00	23.89
	9	5.38	12.90	2.15	20.43
	10	12.90	8.06	0.54	21.51
	11	10.95	13.81	0.00	24.76
	12	13.27	12.83	0.00	26.11
	13	6.55	16.67	0.00	23.21
	14	11.34	13.87	0.00	25.21
	15	10.40	15.20	0.40	26.00
Promedio		11.24	14.19	1.46	26.88

MP: motilidad progresiva, MO: motilidad oscilatoria, MC: motilidad circular, MT: motilidad total.

Fuente propia.



Tabla A.10. Valores transformados a Arcoseno de raíz de parámetros espermáticos al post descongelamiento

TRATAMIENTO	Repetición	MOTILIDAD	VITALIDAD	HOST
-80 °C	1	0.37534	0.53197	0.60895
	2	0.48843	0.59979	0.46134
	3	0.46234	0.57256	0.48743
	4	0.57639	0.57479	0.41055
	5	0.36566	0.57383	0.39239
	6	0.46816	0.60168	0.48743
	7	0.477	0.59159	0.41081
	8	0.47697	0.59979	0.33042
	9	0.47686	0.68269	0.39269
-100 °C	1	0.64184	0.42639	0.6138
	2	0.68104	0.48557	0.57502
	3	0.67137	0.43779	0.55542
	4	0.72212	0.50579	0.50644
	5	0.68172	0.59258	0.57721
	6	0.6776	0.66936	0.56505
	7	0.66281	0.51666	0.57721
	8	0.62395	0.56938	0.415
	9	0.53286	0.43583	0.32514
	10	0.57163	0.55202	0.34685
-120 °C	1	0.5807	0.49088	0.4726
	2	0.70084	0.67009	0.547
	3	0.68269	0.55119	0.60723
	4	0.6949	0.5917	0.67498
	5	0.67961	0.64959	0.40512
	6	0.75072	0.60403	0.50853
	7	0.7116	0.51085	0.42053
	8	0.66934	0.51064	0.40892
	9	0.69375	0.469	0.37823
	10	0.76088	0.48221	0.36137
	11	0.6967	0.52085	0.326
	12	0.62762	0.53628	0.50853
	13	0.5876	0.50272	0.45252
	14	0.65093	0.52602	0.49218
	15	0.60986	0.53507	0.48319
	16	na	na	0.46012
	17	na	na	0.46003
	18	na	na	0.44267

Fuente propia.

Tabla A.11. Valores transformados a Arcoseno de raíz de los patrones de motilidad al descongelamiento

TRATAMIENTO	Repetición	MP	MO	MC
- 80 °C	1	0.14104	0.32634	0.10912
	2	0.31558	0.27433	0.22657
	3	0.33799	0.29363	0.07245
	4	0.32829	0.42275	0.15798
	5	0.15168	0.33003	0
	6	0.22499	0.40306	0
	7	0.35011	0.3016	0.07006
	8	0.30415	0.3554	0
	9	0.31419	0.34624	0
-100 °C	1	0.2504	0.26812	0.2
	2	0.30313	0.30313	0.20033
	3	0.3004	0.26603	0.15238
	4	0.28641	0.37792	0.13747
	5	0.29969	0.47163	0.13588
	6	0.45103	0.45737	0
	7	0.32255	0.38857	0
	8	0.3805	0.40148	0
	9	0.3201	0.2853	0
	10	0.22551	0.49422	0
-120 °C	1	0.29066	0.31607	0.21006
	2	0.50413	0.39436	0.06905
	3	0.26284	0.43452	0.17273
	4	0.30275	0.37379	0.30275
	5	0.43241	0.4451	0.06991
	6	0.36742	0.45554	0
	7	0.27873	0.39406	0.12659
	8	0.36214	0.3434	0
	9	0.23399	0.36742	0.14719
	10	0.36742	0.28795	0.07341
	11	0.3373	0.38075	0
	12	0.37292	0.36636	0
	13	0.25877	0.42054	0
	14	0.34354	0.38156	0
	15	0.32836	0.40049	0.06329

MP: motilidad progresiva, MO: motilidad oscilatoria, MC: motilidad circular,
Fuente propia.



Tabla A.12. Prueba T de student pareado para variables relacionadas a la colección y equilibrio (Jamovi)

37 °C > 5 °C		statistic	df	p
HOST	Student's t	2.79	5	0.019
MOTILIDAD	Student's t	6.44	5	<0.001
VITALIDAD	Student's t	5.14	5	0.002

$H_a: u_{37^\circ} > u_{5^\circ}$

Tabla A.13. Matriz de correlación de Pearson entre variables a la colección (Jamovi)

37 °C		MOTILIDAD	VITALIDAD	HOST
MOTILIDAD	Pearson's r	—		
	p-value	—		
VITALIDAD	Pearson's r	0.792	—	
	p-value	0.061	—	
HOST	Pearson's r	0.547	0.019	—
	p-value	0.261	0.971	—

Tabla A.14. Matriz de correlación de Pearson entre variables al equilibrio (Jamovi)

5 °C		MOTILIDAD	VITALIDAD	HOST
MOTILIDAD	Pearson's r	—		
	p-value	—		
VITALIDAD	Pearson's r	0.812	—	
	p-value	0.050	—	
HOST	Pearson's r	0.880	0.707	—
	p-value	0.021	0.116	—

Tabla A.15. ANOVAs de un factor para TRATAMIENTOS (-80 °C; -100 °C y -120 °C) (Jamovi)

One-Way ANOVA (Fisher's)

	F	df1	df2	p
MOTILIDAD	4.16	2	31	0.025
VITALIDAD	7.01	2	31	0.003
HOST	1.22	2	34	0.307

Tabla A.16. Test de normalidad (Shapiro-Wilk) de variables dependientes al descongelado (Jamovi)

	W	p
MOTILIDAD	0.960	0.246
VITALIDAD	0.962	0.285
HOST	0.991	0.987

Note. A low p-value suggests a violation of the assumption of normality

Tabla A.17. Test de homocedasticidad para variables dependientes al descongelado (Jamovi)

Homogeneity of Variances Test (Levene's)

	F	df1	df2	p
MOTILIDAD	0.652	2	31	0.528
VITALIDAD	0.918	2	31	0.410
HOST	0.764	2	34	0.474

Tabla A.18. Prueba de comparación de medias de Tukey para MOTILIDAD (Jamovi)

Tukey Post-Hoc Test – MOTILIDAD

		-80 °C	-100 °C	-120 °C
-80 °C	Mean difference	—	-0.0561	-0.0804 *
	p-value	—	0.173	0.019
-100 °C	Mean difference		—	-0.0243
	p-value		—	0.647
-120 °C	Mean difference			—
	p-value			—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Tabla A.19. Prueba de comparación de medias de Tukey para VITALIDAD (Jamovi)

Tukey Post-Hoc Test – VITALIDAD

		-80 °C	-100 °C	-120 °C
-80 °C	Mean difference	—	-0.0546	-0.0811 **
	p-value	—	0.069	0.002
-100 °C	Mean difference		—	-0.0265
	p-value		—	0.428
-120 °C	Mean difference			—
	p-value			—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Tabla A.20. Prueba de comparación de medias de Tukey para HOST (Jamovi)

Tukey Post-Hoc Test – HOST

		-80 °C	-100 °C	-120 °C
-80 °C	Mean difference	—	-0.0633	-0.0248
	p-value	—	0.287	0.779
-100 °C	Mean difference		—	0.0385
	p-value		—	0.527
-120 °C	Mean difference			—
	p-value			—

Note. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$

Tabla A.21. MANOVA de un factor para patrones de motilidad (Jamovi)

Multivariate Tests

		value	F	df1	df2	p
TRATAMIENTO	Pillai's Trace	0.221	1.24	6	60	0.298
	Wilks' Lambda	0.779	1.28	6	58	0.279
	Hotelling's Trace	0.283	1.32	6	56	0.264
	Roy's Largest Root	0.282	2.82	3	30	0.056

Tabla A.22. Pruebas univariadas del MANOVA entre tratamientos y patrones de motilidad (Jamovi)

Univariate Tests

	Variable dependiente (Motilidad)	Suma de cuadrados	df	Mean Square	F	p
TRATAMIENTO	Progresiva	0.0216	2	0.01082	2.1159	0.138
	Oscilatoria	0.0114	2	0.00572	1.5239	0.234
	Circular	9.15e-4	2	4.57e-4	0.0575	0.944
Residuals	Progresiva	0.1584	31	0.00511		
	Oscilatoria	0.1163	31	0.00375		
	Circular	0.2465	31	0.00795		

Tabla A.23. Prueba de matrices de Box para el MANOVA para patrones de motilidad (Jamovi)

Box's Homogeneity of Covariance Matrices Test

χ^2	df	p
8.03	12	0.783

Tabla A.24. Prueba de normalidad multivariado para patrones de motilidad (Jamovi)

Shapiro-Wilk Multivariate Normality Test

W	p
0.929	0.029

Tabla A.25. Preparación de FRACCIÓN A del dilutor Tris-citrato-yema de huevo.

Producto	Cantidad
TRIS	2.42 g
Ácido cítrico monohidratado	1.4 g
Fructuosa	1 g
Gentamicina, 160 mg/ml	5 uL
Yema de huevo (v/v)	20%
Enrazar con agua bidestilada c.s.p.	100 ml

Fuente: Modificación del protocolo planteado por Hafez, (2002)

Tabla A.26. Preparación de FRACCIÓN B del dilutor TRIS-citrato-yema de huevo + Glicerol

Producto	Cantidad
TRIS	2.42 g
Ácido cítrico monohidratado	1.4 g
Fructuosa	1 g
Glicerol (v/v)	10 %
Gentamicina, 160 mg/ml	5 uL
Yema de huevo (v/v)	20%
Enrazar con agua bidestilada c.s.p.	100 ml

Fuente: Modificación del protocolo planteado por Hafez, (2002)



Tabla A.27. Preparación de Eosina-Nigrosina

Producto	Cantidad
Eosina	10 g
Nigrosina	1.67 g

Enrazar con agua destilada c.s.p. 100 ml
Fuente: Campbell et al., (1956)

Tabla A.28. Preparación de Solución hiposmotica

Producto	Cantidad
Citrato de sodio	0.734 g
Fructuosa	1.351 g

Enrazar con agua destilada c.s.p. 100 ml
Fuente: Jeyendran et al., (1984)

ANEXO B: FIGURAS



Figura N° B.4. Retracción del conducto deferente durante la cirugía de desviación del conducto deferente

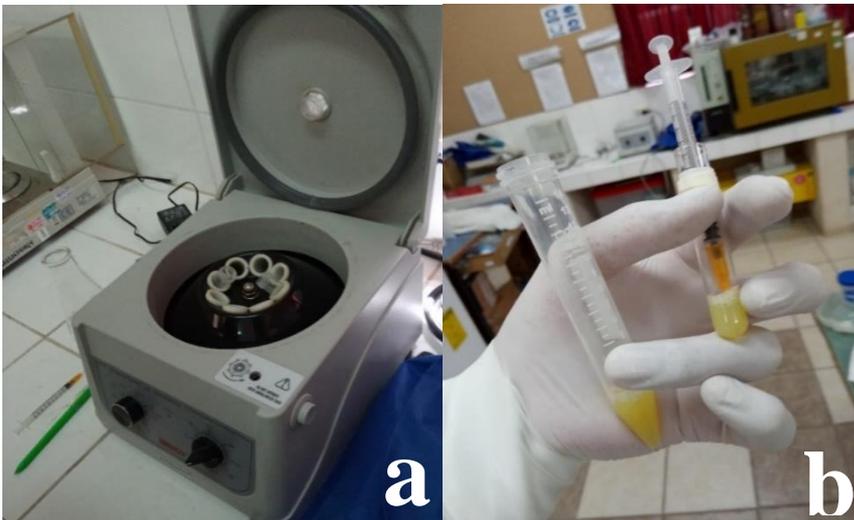


Figura N° B.5. Preparación de dilutor

(a. Centrifugado, b. Distribución en tubo de ensayo)



Figura N° B.6. Baño maría (37 °C), acondicionado en un termo sobre el cual están dos tubos de ensayo con dilutor y jeringas de colección



Figura N° B.7. Colección de las microgotas de espermia con un tip adosado en la jeringa

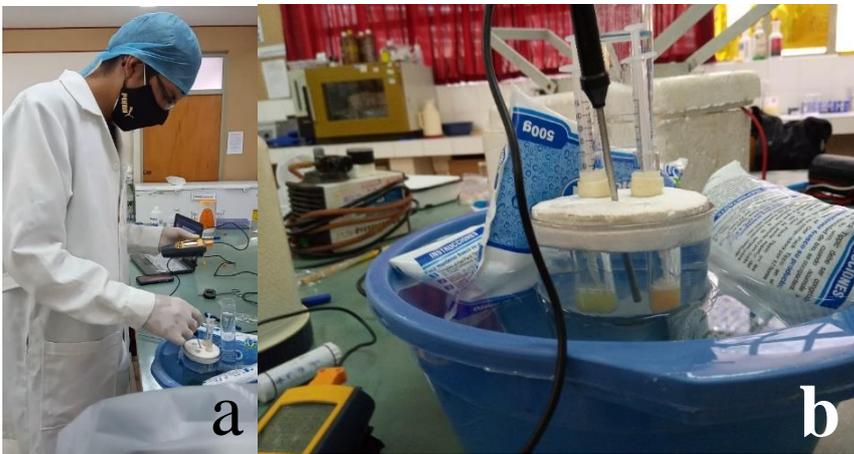


Figura N° B.8. Proceso de enfriamiento a -5°C

(a. registro de temperatura, b. termocupla ubicada al nivel de la muestra)

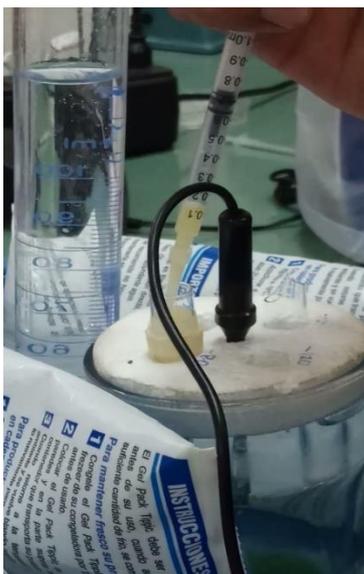


Figura N° B.9. Reconstitución con la fracción B (TRIS – YH – Glicerol)



Figura N° B.10. Empajillado de semen



Figura N° B.11. Obtención de pajillas para su descongelado



Figura N° B.12. Preparación de la muestra para la evaluación post descongelado

(a. laminas atemperadas a 37.8 °C; b. colocación de la muestra descongelada)

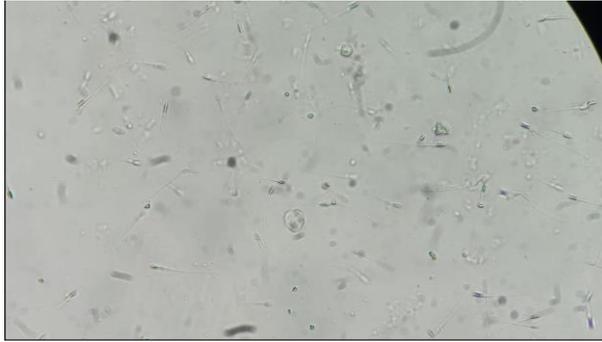


Figura N° B.13. Evaluación de motilidad post descongelado



Figura N° B.14. Evaluación de vitalidad post descongelado

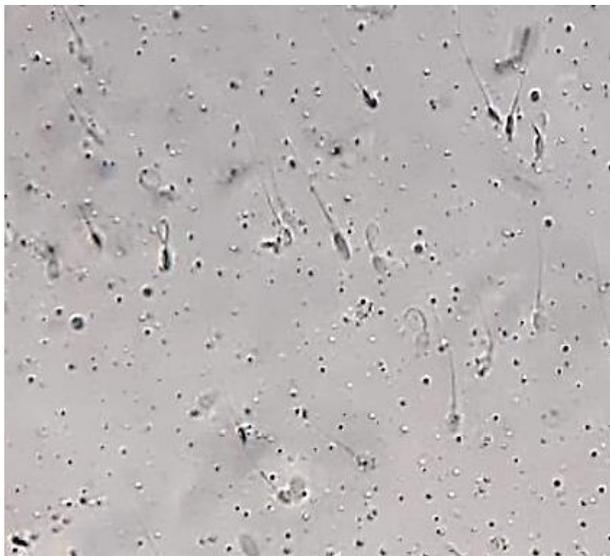


Figura N° B.15 Prueba HOS post descongelado