



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

## ESCUELA DE POSGRADO

### MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL



#### TESIS

**PRODUCCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PROCEDENTE DEL CONDUCTO  
DEFERENTE: COLECCIÓN, CONSERVACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA  
CALIDAD ESPERMÁTICA EN LLAMAS (*Lama glama*)**

**PRESENTADA POR:**

**PEDRO PERCY MACHACA TICONA**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**

**CON MENCIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

**PUNO, PERÚ**

**2022**

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

PRODUCCIÓN DE ESPERMATOZOIDES P  
ROCEDENTE DEL CONDUCTO DEFEREN  
TE: COLECCIÓN, CONSERVACIÓN Y EVA  
LUACI

AUTOR

PEDRO PERCY MACHACA TICONA

RECuento DE PALABRAS

22200 Words

RECuento DE CARACTERES

114249 Characters

RECuento DE PÁGINAS

91 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

1.8MB

FECHA DE ENTREGA

May 16, 2024 4:14 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

May 16, 2024 4:16 PM GMT-5

● 11% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 11% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 3% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 12 palabras)

  
Mg. Sc. Dr. Harold Pérez Guerra  
DOCENTE ASOCIADO - UNAP  
CMVP: 6815



Resumen



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

## ESCUELA DE POSGRADO

### MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL

#### TESIS

**PRODUCCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PROCEDENTE DEL CONDUCTO**

**DEFERENTE: COLECCIÓN, CONSERVACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA**

**CALIDAD ESPERMÁTICA EN LLAMAS (*Lama glama*)**



**PRESENTADA POR:**

**PEDRO PERCY MACHACA TICONA**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**

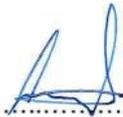
**CON MENCIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**

APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

PRESIDENTE

  
.....  
Dr. MANUEL GUIDO PÉREZ DURAND

PRIMER MIEMBRO

  
.....  
Dra. NUBIA LILIA CATACORA FLORES

SEGUNDO MIEMBRO

  
.....  
M.Sc. JOSÉ IVÁN QUIÑONES GARCÍA

ASESOR DE TESIS

  
.....  
M.Sc. URI HAROLD PÉREZ GUERRA

Puno, 28 de diciembre de 2022.

**ÁREA:** Reproducción animal.

**TEMA:** Evaluación de espermatozoides del conducto deferente.

**LÍNEA:** Reproducción de camélidos sudamericanos.



## DEDICATORIA

A Dios, porque siempre fue mi refugio en momentos difíciles, además de darme salud para escalar cada peldaño en la vida. A mi esposa, Elizabeth mi compañera, que a pesar de las adversidades seguimos luchando con esmero para ser una pareja sólida, gracias por todo te quiero mucho. A mis dos pedacitos de universo mis hijas, Katherine Luciana y Rocio Pierina mis más grandes tesoros, que siendo tan niñas me enseñaron muchas cosas y por supuesto a mirar la vida desde otra perspectiva. A mis padres, Sr. Esteban y Sra. Tomasa, ellos siempre están en los momentos más difíciles apoyándome en todo sentido sin condiciones, gracias por los consejos mi gratitud infinita hacia ellos. A mi hermano, José Antonio mi amigo y compañero tenemos mucho por recorrer gracias por tu apoyo moral.

*Pedro Percy Machuca Ticona*



## AGRADECIMIENTOS

La vida está llena de sorpresas, desafíos y bendiciones, con este trabajo sumo un importante paso más en la vida, después de muchos sacrificios, tristezas y alegrías solo queda agradecer infinitamente a todas las personas que fueron una fuente de apoyo moral e impulso para ser cada día mejor.

A medida que pasa el tiempo uno va adquiriendo más experiencia profesionalmente, pero aún hay mucho por aprender, por ello quiero agradecer a mi asesor de tesis M.Sc. Uri Harold Pérez Guerra por el apoyo brindado y haberme guiado en la culminación de este proyecto, además de ser mi colega y amigo, es un gran docente, gracias por tus enseñanzas.

La sinceridad, la pulcritud, la sencillez, pero sobre todo las cosas como son y hay veces que se debe nadar contra la corriente, los aprendí de una gran amigo y colega M.Sc. Cesario Sebastian Cruz Anchapuri, gracias por apoyarme siempre.

Debo declárame muy afortunado porque durante estos años se sigue cultivando amistades maravillosas como la del M.Sc. Duany Condemayta Cutipa, colega y gran amigo, recuerda que sin izquierda no hay derecha, gracias por tu apoyo.

En los momentos difíciles siempre esta una mano del amigo de muchos años y aún seguimos cultivando esa hermandad MVZ. Heinz Howard Larico Medina, agradezco tu confianza y tus palabras de aliento.

*Pedro Percy Machaca Ticona.*



## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
ACRÓNIMOS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3

### CAPÍTULO I

#### 1 REVISIÓN DE LITERATURA

1.1	Marco teórico	5
1.1.1	La llama y sus generalidades	5
1.1.2	Anatomía reproductiva del macho	5
1.1.3	Comportamiento sexual y fisiología reproductiva en camélidos sudamericanos	8
1.1.4	Biotecnologías en camélidos sudamericanos	11
1.1.5	Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos	12
1.1.6	Características macroscópicas del semen en los camélidos	16
1.1.7	Características microscópicas del semen en los camélidos	20
1.1.8	Criopreservación de semen	24
1.2	Antecedentes	26
1.2.1	Internacionales	26
1.2.2	Nacionales	29
1.2.3	Locales	30

### CAPÍTULO II

#### 2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1	Identificación del problema	31
2.2	Enunciados del problema	32
2.2.1	Problema general	32
		iii



2.2.2	Problemas específicos	32
2.3	Justificación	32
2.4	Objetivos	33
2.4.1	Objetivo general	33
2.4.2	Objetivos específicos	33
2.5	Hipótesis	34
2.5.1	Hipótesis general	34
2.5.2	Hipótesis específicas	34

### **CAPÍTULO III**

#### **3 MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1	Lugar de estudio	35
3.2	Población	35
3.3	Muestra	35
3.4	Método de investigación	35
3.5	Descripción detallada de métodos por objetivos específicos	36
3.5.1	Metodología	36
3.5.2	Análisis estadístico	41

### **CAPÍTULO IV**

#### **4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1	Resultados	42
4.1.1	Evaluación de espermatozoides a la colección (37°C)	42
4.1.2	Evaluación de espermatozoides al enfriamiento (5°C)	42
4.1.3	Evaluación de espermatozoides post crioconservación	42
4.1.4	Evaluación de espermatozoides post crioconservación mediante equipo computarizado (casa)	43
4.2	Discusión	44
4.2.1	Evaluación de espermatozoides a la colección (37°C)	44
4.2.2	Evaluación de espermatozoides al enfriamiento (5°C)	46
4.2.3	Evaluación de espermatozoides post crioconservación	47
4.2.4	Evaluación de espermatozoides post crioconservación mediante equipo computarizado (casa)	49

CONCLUSIONES	51
--------------	----

RECOMENDACIONES	52
-----------------	----

BIBLIOGRAFÍA	53
--------------	----





## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
1. Métodos de colección y volumen de semen de llamas	17
2. Método de colección y color de semen en alpacas	18
3. Concentración de espermatozoides por método de colección	21
4. Morfología de espermatozoides en alpacas	22
5. Motilidad espermática en llamas	23
6. Características espermáticas a la colección (37°C)	42
7. Características espermáticas en fase de equilibrio (5°C)	42
8. Características espermáticas post crioconservación/descongelación	43
9. Características espermáticas post crioconservación/descongelaciones evaluadas mediante el sistema computarizado (CASA)	44



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
1. Características espermáticas a la colección (37°C)	44
2. Características espermáticas en fase de equilibrio (5°C)	46
3. Características espermáticas post crioconservación/descongelación	47
4. Características espermáticas post crioconservación/descongelaciones evaluadas mediante el sistema computarizado (CASA)	49



## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
1. Matriz de consistencia	65
2. Anexos estadísticos	66
3. Anexos Fotográficos	77

## ACRÓNIMOS

ALH.	Amplitude of Lateral Head; Amplitud Lateral de la Cabeza, Amplitude of Lateral Head; Amplitud Media del Desplazamiento Lateral de la Cabeza
ANOVA.	Análisis de Varianza
ATP.	Adenosine Triphosphate; Adenosín Trifosfato, Adenosine Triphosphate; Adenosín Trifosfato
BCF.	Beat Cross Frequency; Frecuencia de Cruce de Batido
CASA.	Computer Assisted Sperm Analysis; Sistema Computarizado de Analisis de Semen
CSA.	Camélidos Sudamericanos
DAP.	Average Path Distance; Distancia Promedio del Trayecto
DCA.	Diseño Completamente Aleatorio
DCL.	Distance in Curved Line; Distancia en Línea Curva
DMSO.	Dimethyl Sulfoxide; Dimetil Sulfóxido
DSL.	Distance in a Straight Line; Distancia en Línea Recta
EE.	Electroeyaculación
FAO.	Food and Agriculture Organization; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
HOST.	Hypoosmotic Swelling Test; Prueba de Inflamación Hipoosmótica
IA.	Inseminación Artificial
INEI.	Instituto Nacional de Estadística e Informática
LAZ EZ.	Leica Application Suite; Suite de Aplicaciones de Leica
LDL.	Low Density Lipoprotein; Lipoproteína de Baja Densidad
LIN.	Linearity; Índice de Linialidad
ME.	Motilidad Espermatica
MT.	Motilidad Total
PBS.	Phosphate Buffered Saline; Buffer Fosfato Salino o Tampón Fosfato Salino
pH.	Potencial de Hidrógeno
PVP.	Polivinil- Pirrolidona
ROS.	Reactive Oxygen Species; Especies Reactivas de Oxígeno
STR.	Straightness; Índice de Retitud
T+AC+F.	Tris, Acido Citrico y Fructosa
T1.	Tratamiento 1



T2.	Tratamiento 2
T3.	Tratamiento 3
USB.	Universal Serial Bus; Puerto de Seriado Universal
VA.	Vagina Artificial
VAP.	Average Path Velocity; Velocidad Promedio del Recorrido
VCL.	Curvilinear Velocity; Velocidad Curvilínea
VSL.	Straight Line Velocity; Velocidad en Línea Recta
WOB.	Wobble; Indice de Oscilación

## RESUMEN

Los camélidos sudamericanos son especies de vital importancia en la sierra peruana. Sin embargo, la investigación sobre su biología reproductiva, especialmente en machos, es limitada. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dilutores sobre la producción de espermatozoides procedentes del conducto deferente durante la colección, conservación y evaluación de la calidad espermática en llamas (*Lama glama*). Se utilizaron 6 llamas macho de 3-4 años de edad en iguales condiciones de alimentación, para el estudio se hizo una dilución en Andromed® (T1), Bioxcell® (T2) y Tris (T3) y evaluándose Motilidad Total, Vitalidad y Host durante la Colección, Fase de Equilibrio y Descongelación; además se evaluó pajillas descongeladas con el sistema CASA, sometidos a un DCA. Los resultados a la colección para Motilidad Total (MT) fueron, T1, T2, y T3 de 63.42%, 37.92% y 64.71% correspondientemente, Host T1, T2 y T3 de 61.9%, 58.8% y 46.9% respectivamente, Vitalidad T1, T2, y T3 de 67.94%, 55.48% y 59.85% equivalentemente; durante la fase de equilibrio los resultados disminuyeron entre 6 al 12% entre todos los parámetros espermáticos; los resultados a la descongelación fue de MT para T1 de 32.65%, T2 de 10.07% y T3 de 26.15%, Host T1, T2 y T3 de 31.91%, 17.46% y 23.2% respectivamente; para Vitalidad fue T1 29.25%, T2 10.8% y T3 38.73%; en el sistema CASA la mayoría de las variables son significativas excepto ALH, WOB y LIN. En conclusión, el dilutor Andromed® reveló mejores resultados a la colecta, fase de equilibrio y descongelamiento de semen

**Palabras clave:** Conducto deferente, criopreservación, espermatozoide, llama, reproducción.

## ABSTRACT

South American camelids are a species of vital importance in the Peruvian highlands. However, research on their reproductive biology, especially in males, is limited. The objective of the present study was to evaluate the effect of dilutors on the production of spermatozoa from the vas deferens during the collection, preservation and evaluation of sperm quality in llamas (*Lama glama*). Six male llamas of 3-4 years of age were used under the same feeding conditions, for the study a dilution was made in Andromed® (T1), Bioxcell® (T2) and Tris (T3) and Total Motility, Vitality and Host were evaluated during the Collection, Equilibrium Phase and Thawing; in addition, thawed straws were evaluated with the CASA system, subjected to a DCA. The results at collection for Total Motility (TM) were, T1, T2, and T3 of 63.42%, 37.92% and 64.71% correspondingly, Host T1, T2 and T3 of 61.9%, 58.8% and 46.9% respectively, Vitality T1, T2, and T3 of 67.94%, 55.48% and 59.85% equivalently; during the equilibrium phase the results decreased between 6 to 12% among all sperm parameters; the results at thawing was MT for T1 of 32.65%, T2 of 10.07% and T3 of 26.15%, Host T1, T2 and T3 of 31.91%, 17.46% and 23.2% respectively; for Vitality was T1 29.25%, T2 10.8% and T3 38.73%; in the CASA system most of the variables are significant except ALH, WOB and LIN. In conclusion, the Andromed® dilutor revealed better results in semen collection, equilibration phase and thawing.

**Keywords:** Cryopreservation, llama, reproduction, sperm, vas deferens.



Dr. Edmundo G. Moreno Terrazas  
PROFESOR PRINCIPAL  
UNA - PUNO

## INTRODUCCIÓN

La población mundial de llamas representa el 32.52% a nivel mundial en Perú y los departamentos con mayor cantidad de animales son Puno, Cusco, Huancavelica, Ayacucho y Arequipa; por otro lado, la llama constituye un medio de subsistencia de un vasto sector de la población siendo esta aproximadamente 82 000 pequeños y medianos productores de las zonas alto andinas del Perú, a través del aporte de carne, energía de trabajo y otros subproductos. La totalidad de las llamas se encuentra en manos de pequeños productores de muy escasos recursos y con limitado asesoramiento sobre procesos de mejoramiento genético y uso de las biotecnologías reproductivas en campo (FAO, 2005; INEI, 2012), que no poseen las condiciones adecuadas para el desarrollo tecnológico en alimentación, manejo, producción y reproducción de esta especie.

El conocimiento de la biología reproductiva de los camélidos sudamericanos es aún insuficiente, especialmente en lo referido a la fisiología reproductiva del macho, existe muy poca información sobre la colección, características, evaluación, conservación y aplicación del semen en camélidos sudamericanos, debido a la falta de una metodología confiable y reproducible para la colección de semen (Calderón et al., 2015); esta colecta depende del tipo de dilutor teniendo ventajas los comerciales a diferencia de los no comerciales, ya que se caracterizan por su facilidad a la preparación y menor variabilidad en su composición que hace más repetible los resultados (Bertuzzi et al., 2020). Sin embargo, estas revisiones son sobre espermatozoides refrigerados siendo necesario la evaluación de la calidad espermática tras la crioconservación. La evaluación seminal en la mayoría de las especies domésticas presenta variabilidad a nivel intra e inter individuo en los análisis utilizando las pruebas rutinarias de motilidad (determinar la movilidad de espermatozoides), vitalidad (determinar porcentaje de vivos y muertos) y HOST (determinar espermatozoides con integridad de membrana); sin embargo, actualmente es necesario realizar evaluaciones objetivas tales como con sistemas computarizados para un análisis más eficiente (Cucho, 2018). Existe otros factores importantes como son el protocolo de congelación sobre los espermatozoides y específicamente la tasa de congelación para evitar la formación de los cristales de hielo y consecuentemente la deshidratación de los espermatozoides, la sobrevivencia del espermatozoide (congelado – descongelado) también depende de la temperatura inicial de congelación (Kumar et al., 2003; Salamon, 1970). En tal razón en este trabajo se tuvo como objetivo la evaluación del efecto de dilutores sobre la producción de espermatozoides procedentes del conducto



deferente durante la colección, conservación y evaluación de la calidad espermática en llamas (*Lama glama*).

## CAPÍTULO I

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 1.1 Marco teórico

##### 1.1.1 La llama y sus generalidades

Este es el camélido doméstico más grande y comparte muchas características morfológicas y de comportamiento con su antecesor silvestre. Al igual que la especie salvaje, como el huanaco tiene un amplio rango de distribución geográfica, aunque actualmente es menor que antes de la colonización europea. Actualmente se encuentra desde Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina hasta el centro de Chile. (Wheeler, 1984). La llama (*Lama glama*) es un mamífero artiodáctilo doméstico de la familia Camelidae que se encuentra en gran cantidad en el Altiplano de los Andes, esta especie fue creada por las culturas indígenas andinas a través de la domesticación y selección artificial de guanacos salvajes, es un animal tímido, tranquilo y dócil, que reconoce a su dueño con facilidad. Sin embargo, si se siente estresado, acorralado y sometido, puede responder de forma caprichosa arrojando escupitajos o dando patadas. Se utiliza para obtener carne y lana, así como para transporte y carga, aunque actualmente su mayor potencial radica en la producción de carne, ya que las funciones de carga y transporte son asumidas por otros animales domésticos o vehículos motorizados. (Tapia, 2015)

##### 1.1.2 Anatomía reproductiva del macho

###### A. Pene y prepucio

El pene es fibroelástico y tiene una flexura sigmoidea, similar a una "S" con un largo de 35 a 45 cm, ubicada antes del escroto. En la punta del glande presenta una proyección cartilaginosa, y cuenta con un pequeño proceso uretral de aproximadamente 1 cm de longitud. (Sumar, 1985), Durante la erección, el pene se alarga entre 18 y 25 cm, extendiéndose más allá de la apertura de la cavidad prepucial, con un diámetro que oscila entre 0.8 y 2.0 cm. La punta del glande, que es una proyección cartilaginosa firme, tiene una forma de gancho ligeramente curvado hacia la derecha.

Esta punta sobresale de una proyección cónica rígida conocida como "proceso uretral", que mide aproximadamente 1 cm de largo. La forma del glande facilita la penetración del pene a través de los anillos del cérvix para la deposición profunda de semen dentro del útero. El revestimiento prepucial es triangular y cuelga como una tela grande con un orificio prepucial en el extremo del triángulo, orientado hacia la parte posterior.(Franco et al., 1981)

## **B. Testículo**

Los dos testículos están presentes desde el nacimiento y a los 6 meses, descienden a un escroto que no cuelga, ubicado debajo del ano (Fowler, 1999). Durante el proceso de desarrollo embrionario, los testículos se forman en el interior del abdomen, cerca del riñón. A medida que descienden, migran hacia abajo en el abdomen hasta alcanzar el anillo inguinal profundo. Luego, atraviesan la pared abdominal para finalmente emerger a través del anillo inguinal superficial, que es una abertura ampliada del nervio genitocrural, el testículo completa su trayecto al descender hasta el escroto (Hafez, 2002).

En la llama y la alpaca, los testículos se ubican en la región perineal, justo debajo del ano y a la altura del arco isquiático. Miden entre 5 y 7 cm de largo, 2.5 a 3.5 cm de ancho y 3 a 4 cm de profundidad (Fowler, 1999). En la alpaca, los testículos son pequeños y elípticos, con el diámetro principal orientado de forma oblicua hacia la parte dorsal y caudal. Normalmente, ambos testículos tienen el mismo tamaño, son firmes y se mueven libremente dentro del escroto y pesan aproximadamente 18, su orientación sigue un eje de dorso caudal a antero ventral, similar al cerdo (Hafez, 2002; Sumar, 1985)

El tamaño de los testículos varía según la raza y la estación del año (Fowler, 1999). En las llamas, el diámetro de los túbulos seminíferos es de  $223,07 \pm 19,8$  micras (Delhon y von Lawzewitsch, 1994).

### **C. Epidídimo**

El epidídimo es una estructura pequeña y alargada adherido al testículo (Smith, 1999); se divide en tres partes: la cola, el cuerpo y la cabeza. La cabeza del epidídimo está unida a su polo dorsal (Fowler, 1999). La estructura histológica del epidídimo es similar a la de otras especies (Delhon y von Lawzewitsch, 1994).

### **D. Conducto deferente**

Según Montalvo et al., (1979), el conducto tiene una longitud de 35 a 40 cm y un diámetro de 2 a 3 mm. Presenta un engrosamiento en la entrada de la cavidad abdominal. A diferencia de los camellos, los camélidos presentan una ampolla diferenciada de 4 mm de diámetro que se localiza en la superficie dorsal de la vejiga. La parte final queda encajada en una depresión profunda situada en la parte inferior del cuerpo de la próstata. (Mendoza et al., 2012; Osorio y San Martín, 1966); sin embargo, no es un lugar donde se almacenen los espermatozoides, a diferencia de los rumiantes.

### **E. Glándulas sexuales accesorias**

Las estructuras accesorias comprenden la próstata y un par igual de glándulas bulbouretrales, similares a las glándulas de Cowper, localizadas en la parte dorsal-lateral de la uretra. La próstata, con una forma de disco y dimensiones aproximadas de 3 x 3 x 2 centímetros, es detectable al tacto a través del recto. No se encuentran presentes glándulas vesiculares en esta especie (Delhon y von Lawzewitsch, 1994).

La próstata adopta una configuración similar a la letra "H", posicionada dorsal y lateralmente sobre la región del cuello de la vejiga a una distancia de aproximadamente  $10 \pm 2$  centímetros desde el ano. Se compone principalmente del cuello prostático, que consiste en dos lóbulos unidos y ubicados en la porción inicial de la uretra. Las dimensiones de la glándula prostática son aproximadamente de 4 centímetros de diámetro transversal y 1 centímetro de grosor (Ccoiso, 2019; Mendoza et al., 2012; Osorio y San Martín, 1966)

### 1.1.3 Comportamiento sexual y fisiología reproductiva en camélidos sudamericanos

#### A. Comportamiento sexual en camélidos sudamericanos machos

Los camélidos sudamericanos son comúnmente reproductores estacionales en su hábitat de los Andes. Su período habitual de apareamiento coincide con los meses más cálidos y húmedos, cuando hay abundante disponibilidad de forraje que a la vez condice con la época de lluvias. En el caso de la alpaca, la temporada de reproducción va desde finales de noviembre hasta principios de mayo (San-Martin et al., 1967), mientras que en la llama, el periodo de apareamiento se extiende a lo largo de todo el verano y el comienzo del otoño (Bravo y Johnson, 1994). Parece que su actividad sexual está influida por las condiciones de manejo; en la crianza extensiva, está relacionada con la disponibilidad de forraje hacia el final del período de gestación y los primeros meses de vida de las crías (Rodríguez, 1982). En los casos en que machos y hembras permanecen juntos todo el año, como ocurre en los rebaños de alpacas y llamas en el Altiplano, los nacimientos tienden a concentrarse entre diciembre y marzo. Por otro lado, si las hembras no preñadas se mantienen separadas de los machos y solo se permite el apareamiento una vez al mes, tanto machos como hembras pueden mostrar actividad sexual durante todo el año (Fernández-Baca et al., 1972).

El comportamiento sexual de los machos en camélidos varía según la edad, los machos jóvenes, incluso de un año o menos, pueden mostrar cierto interés por las hembras y pueden intentar la reproducción, pero a menudo sin éxito debido a la adherencia natural entre el pene y el prepucio (Bravo y Johnson, 1994). A los dos años, las llamas macho muestran un mayor interés por las hembras, y algunos pueden reproducirse con éxito porque el pene puede liberarse completamente del prepucio (Bravo y Johnson, 1994; Sumar, 1985). A partir de los tres años, los camélidos machos adultos deberían ser capaces de copular con éxito. Durante la cópula, emiten un sonido gutural característico, conocido como "orgling" en Estados Unidos, cuyo tono varía según el macho y el momento de la

cópula. A diferencia de lo que se creía anteriormente, el tono de este sonido gutural no está correlacionado con la fertilidad del macho (Bravo y Johnson, 1994; Novoa y Leyva, 1996; Sumar, 1985).

La cópula suele durar entre 5 y 55 minutos, con un promedio de 20 minutos para la alpaca y 18 para la llama. El semen se deposita dentro de los cuernos uterinos de forma intracornual. Durante la cópula, los machos realizan movimientos rítmicos acompañados de sonidos guturales, y se observa que el pene se desplaza entre los cuernos uterinos. En observaciones de campo en Perú, se ha notado que un macho puede copular hasta 18 veces al día, especialmente durante el primer día de la temporada reproductiva, y este número disminuye gradualmente con el número de hembras en celo (Bravo y Johnson, 1994)

## **B. Pubertad**

La pubertad en camélidos en la mayoría de los casos se manifiesta alrededor del primer año de vida del animal, señalado por (Novoa y Leyva, 1996). Durante esta etapa, los machos comienzan a producir espermatozoides, aunque no son capaces de realizar la cópula hasta alcanzar los 2 o 3 años de edad cuando alcanzan la madurez sexual.

## **C. Madurez sexual en camélidos**

La madures sexual etapa en la cual los camélidos sudamericanos alcanzan su potencial reproductivo y con ello la capacidad de realizar copula, esto se logra muy próximos a los 2 año de edad, así lo corrobora Sumar (1985) quien observa una mayor actividad de espermatogénesis, con un notable aumento en los diámetros de los túbulos seminíferos y una acumulación creciente de espermatozoides en la cabeza del epidídimo(Sumar, 1985).

El tamaño de los testículos aumenta con la edad en llamas y alpacas, acompañado de un incremento en los niveles de testosterona, según investigaciones de (Bravo et al., 2002).

#### **D. Deposición del semen**

Debido a la longitud del aparato reproductor que tiene los camélidos sudamericanos, a su naturaleza fibroelástica y a las formas características de sus glándes, las llamas tienen una introducción considerablemente fácil mediante movimientos semirotatorios y múltiples oscilaciones pélvicas; el pene se introduce alternativamente en ambos cuernos uterinos, lo que indica una eyaculación intracorneal (Franco et al., 1981).

#### **E. Factores que afectan el eyaculado**

La reproducción es un sistema fisiológico crucial para el desarrollo de una especie que se ve afectado por el estrés ambiental y de gestión. Entre los primeros figuran la humedad, el viento y la temperatura ambiente (frío o calor). La gestión de los traumatismos físicos, el ruido, el flujo de animales, el tránsito, el aislamiento y los propios procesos de manipulación son ejemplos de gestión del estrés. El rendimiento y el bienestar de los animales se ven comprometidos cuando se combinan estas dos formas de estrés (Córdova, 2008).

Dado que los espermatozoides son sensibles a los choques térmicos, la luz intensa, los detergentes, el agua, la sangre, los metales y las temperaturas superiores a 40°C, todo el equipo utilizado para examinarlos debe mantenerse limpio y a una temperatura aproximada de 37°C (Melling y Alder, 2000).

#### **F. Factores relacionados con la colección y calidad del semen**

**Edad:** Las características mejoran sutilmente con el aumento de la edad, pero la diferencia no es estadísticamente significativa, y esto tiene un efecto muy pequeño en la producción de esperma (F. Quispe, 1987).

**Estación:** La producción, concentración y proporción de anomalías de los espermatozoides, especialmente en la cola, también son factores importantes. Las buenas características seminales están presentes

en el verano, mientras que las anomalías empeoran en el invierno (Giuliano et al., 2008).

**Periodos de Colección:** las frecuencias repetitivas de colección y por ende agotamiento del machos durante la estación reproductiva puede ser la causa de la reducción de la fertilidad (Bravo et al., 1997).

**Duración de cópula:** El tiempo de la copula con respecto al volumen de la eyaculación no cambia significativamente, pero sí la concentración y la proporción de espermatozoides (Bravo et al., 2002).

**La luz:** La tasa metabólica, la motilidad y la fertilidad de los espermatozoides pueden verse afectadas negativamente por la intensidad luminosa típica de los laboratorios. Las consecuencias negativas sólo se manifiestan cuando el semen entra en contacto con el oxígeno (Bearden y Fuquay, 1982).

**Presión osmótica:** Dado que los espermatozoides tienen una membrana semipermeable, el uso de soluciones hipo o hipertónicas podría alterar el paso del agua a través de la membrana, comprometiendo la integridad de la célula. Es crucial utilizar únicamente soluciones isotónicas porque prolongan la motilidad de los espermatozoides (Bearden y Fuquay, 1982).

#### 1.1.4 Biotecnologías en camélidos sudamericanos

La inseminación artificial (IA) se reduce al uso de semen fresco con un porcentaje de gestación máximo del 77% en establecimientos experimentales y no más del 50% en ganaderos privados. Usando semen congelado de llama y alpaca en forma limitada e inseminando 24 horas luego de la inducción de la ovulación, se obtuvieron hasta ahora tasas de preñez del 26%, del mismo modo en trabajos actuales con semen fresco y conservado se obtuvo porcentajes de preñez entre 25 a 40% con espermatozoides provenientes del conducto deferente (Bravo et al., 2000; Perez et al., 2014; Vaughan, 2003).

### 1.1.5 Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos

La colección de semen en camélidos es uno de los principales elementos limitantes para el desarrollo de biotecnologías reproductivas tales como la inseminación artificial en alpacas y en llamas debido a las características reológicas que posee el semen de camélidos, así como para la evaluación de la capacidad reproductiva de los machos (Novoa y Leyva, 1996). Los principales métodos de colección son:

#### A. Vagina artificial

Esta técnica de colección de semen fue desarrollada Sumar y Leyva (1981) quienes utilizaron un maniquí con la apariencia de una hembra en posición de cópula, basándose en el hecho de que los machos camélidos montan a toda hembra que tenga la postura de decúbito esternal, que simula una cópula normal. Bravo et al. (1997) realizaron más trabajos con la finalidad de mejorar la técnica teniendo en cuenta la duración prolongada de la cópula el uso de una frazadilla termoeléctrica para la colecta de semen en camélidos. Trabajos actuales mencionan sobre una vagina artificial modificada y comparando con la convencional, incrementando un sistema que mantiene la temperatura constante (Gómez-Quispe et al., 2019).

Según Dávalos et al. (1999), el método de la vagina artificial permite evaluar la libido del macho al tiempo que evita la contaminación del semen por la orina. características del semen dependen de si se utiliza llama hembra o un maniquí.

La vagina artificial, se modifica utilizando un tubo especial provisto de bandas de látex y lleno de agua caliente para ejercer presión sobre el pene del camélido. La vagina artificial se cubre completamente con una manta eléctrica para mantener una temperatura constante, lo que permite simular la cópula con la hembra, la temperatura óptima a la que se puede simular la cópula con la hembra (Alarcón et al., 2012; Valle, 2013).

## B. Electroeyaculación

Para el desarrollo de la técnica primeramente se tiene que tranquilizar al animal con una mezcla de sedante y anestésico general. La colección se realiza con el animal acostado; la sonda del electroeyaculador es introducida vía rectal sobre la próstata, cuya profundidad se evaluada por medio de un ecógrafo para ello aplica una mezcla sedante intravenosa (0,2 mg/kg de xilacina y 1,5 mg/kg de ketamina) para inducir un estado de inconsciencia. Se recoge al animal cuando está en posición supina. La estimulación se efectúa mediante unos estímulos eléctricos de 0,2 V inducidos a intervalos de 1 segundo durante 3 segundos; el voltaje se incrementa paulatinamente de 2 a 10 V a lo largo de 6 a 12 minutos (Giuliano et al., 2008).

Valle (2013), describe el uso de la electroeyaculación, que consiste en aplicar un voltaje de 12 voltios para recolectar el semen de las llamas, se recolectaron muestras de semen con la ventaja de reducir el tiempo de recolección, hacerlo durante todo el año y no requerir que las hembras estén en celo. El voltaje y su intensidad aumentaron gradualmente de 2 voltios a 10 voltios, subiendo cada 0,2 voltios.

Jhonson (1989), en su estudio recuperaron volúmenes pequeños (0,1 a 0,5 ml) de semen altamente concentrado de llamas que habían sido sedadas o anestesiadas; sin embargo, no todos los intentos tuvieron éxito.

Utilizando un electroeyaculador Plectron, que produce buenos resultados con 60 cargas eléctricas de voltaje e intensidad desde 2 voltios aumentando gradualmente cada 0,2 voltios hasta alcanzar 10 voltios y 100 $\mu$ A (microamperios), se comparó la obtención de semen mediante las técnicas de electroeyaculación y vagina artificial. El transductor rectal tenía un diámetro de 2,0 cm, una duración de 2 segundos, 14 voltios, 4 amperios, 25 ciclos por segundo y un período de descanso de 2 segundos entre cada pulso. El semen producido con este método difería de las muestras obtenidas con una vagina artificial (Valle, 2013).

### C. Licuefacción o degelificación de semen de llama

El semen de los camélidos suele ser muy viscoso. Esto añade otro nivel de dificultad a proyectos de investigación como la utilización de la inseminación artificial y la evaluación de las características microscópicas. Numerosos estudios señalan la viscosidad inherente al semen de camélidos como el principal obstáculo para el avance de la inseminación artificial y la conservación (Morton y Maxwell, 2006).

Los investigadores han utilizado métodos mecánicos y enzimáticos para intentar minimizar o erradicar esta viscosidad (Bravo et al., 1997; Giuliano et al., 2010), pero no han sido capaces de identificar la razón fundamental de la viscosidad. En consecuencia, se han examinado varias proteasas y enzimas utilizando una técnica aleatoria. La colagenasa se ha utilizado con cierta eficacia en llamas (Giuliano et al., 2010) y alpacas (Bravo et al., 1997) para conservar la función espermática a la vez que se elimina la viscosidad. Sin embargo, algunos investigadores han demostrado que la colagenasa tiene efectos negativos en las alpacas (Morton y Maxwell, 2006), y no se ha determinado si las alpacas pueden o no criopreservar espermias, o se ha comprobado la crioprevación de los espermatozoides tratados con colagenasa.

La industria debe identificar la fuente y el origen del plasma seminal viscoso y buscar formas de eliminarlo sin dañar los espermatozoides para poder utilizar con éxito la criopreservación de espermias y crear un sistema viable para la inseminación artificial en llamas Kershaw-Young y Maxwell (2012), realizó un estudio sobre camélidos en el que descubrió una serie de proteínas. Entre estas proteínas, se descubrió que la mucina 5B es una gran proteína formadora de gel, cuya fuente es la glándula bulbouretral. La revisión bibliográfica también sugiere que la proteína mucina 5B es la razón por la que el plasma seminal de los camélidos es viscoso.

Aunque la mucina 5B no puede ser descompuesta con precisión por ninguna enzima disponible comercialmente, se han encontrado ciertas proteasas generales apropiadas. Tras una revisión de la literatura, se

determinó que la papaína era la más apropiada de ellas. Según Morton y Maxwell (2006), la papaína es una serina proteasa que disminuye la viscosidad del plasma seminal en las alpacas. Sin embargo, en concentraciones elevadas ( $> 0,5$  mg/ml) y cuando los espermatozoides se exponen a la papaína durante períodos prolongados, la papaína es perjudicial para la función espermática, especialmente para la integridad del acrosoma.

También se estudió si la digestión de las proteínas del plasma seminal podía detenerse utilizando un inhibidor de la papaína (E-64). Se demostró que la aplicación de 0,1 mg/ml de papaína durante 20 minutos a 37 °C, seguida de 5 minutos de incubación con 10  $\mu$ M de E-64 a 37 °C, disminuía la viscosidad del plasma seminal sin afectar a la motilidad ni a la viabilidad de los espermatozoides. Integridad del ADN, integridad del acrosoma, movilidad y viabilidad espermáticas (Kershaw-Young y Maxwell, 2012).

#### **D. Aspiración vaginal postcoital**

Es una técnica en la cual se pueden conseguir muestras de semen por aspiración del fondo de la vagina posterior a la cópula la gran desventaja es que este semen se halla incompleto, contaminado y diluido por las secreciones del tracto genital femenino, estas muestras se obtienen a menudo con residuos sanguinolentos y presentan un color rosado ya que el endometrio está inflamado y lacerado debido a la cópula; la técnica es introducir un espéculo a lo largo de la vulva debidamente limpiada y con la asistencia de una fuente de luz se localiza el cérvix e inmediatamente se aspira con una pipeta acoplada a una jeringa, el empleo de este tipo de semen para evaluar la fertilidad del macho es muy dudoso (Bravo, 2002). Estudios actuales realizan la colecta mediante esta técnica probando diferentes tipos de yema de huevo como parte del dilutor con altos porcentajes de motilidad a la descongelación que van desde 40 a 50% (García et al., 2021).

### **E. Fístula uretral**

Una fístula quirúrgica en la uretra del pene que se encuentra entre el ano y el escroto; el semen se recoge en la cópula natural posterior a todo el desarrollo pre quirúrgico se efectúa la incisión en la piel, se aísla el músculo bulbocavernoso y se divide la uretra del cuerpo cavernoso; esta técnica no impide la cópula y las reacciones postoperatorias no afectan al animal (Kubicek, 1974).

### **F. Desviación de los conductos deferentes**

Se han desarrollado las técnicas de desvío de los conductos deferentes, esta técnica intenta recoger los espermatozoides a partir de su reservorio, la cola del epidídimo, sin que estén en contacto con las secreciones de las glándulas accesorias, desviando quirúrgicamente los conductos deferentes en la región en la cara interna del muslo, conformando una fístula permanente en la piel de donde pueden ser recogidos de manera continua sin que se necesite tener una hembra receptiva (Quintano, 2002; Perez et al., 2014; Pérez et al., 2016).

## **1.1.6 Características macroscópicas del semen en los camélidos**

### **A. El semen**

Los espermatozoides y el plasma seminal constituyen el semen eyaculado en los camélidos sudamericanos; los testículos aportan los componentes celulares (espermatozoides), mientras que las glándulas accesorias aportan la mayor parte del componente líquido (plasma seminal). El epidídimo y los conductos deferentes contribuyen muy poco al volumen del semen (Bearden y Fuquay, 1082).

### **B. Células espermáticas**

En los tubos seminíferos de los testículos es donde se crean los espermatozoides. En estos tubos se encuentran numerosas células germinales en desarrollo que acabarán constituyendo los gametos masculinos. El núcleo se encuentra en la cabeza de los espermatozoides maduros, que son células alargadas con una cola necesaria para el

movimiento celular. Situado entre la membrana plasmática y la parte anterior de la cabeza del espermatozoide, el acrosoma es una estructura de doble pared. La cabeza del espermatozoide y su cola (flagelo), que a su vez está separada en segmentos medio, mayor y caudal o terminal, están conectados por un cuello (Hafez, 2002).

### C. Volumen

La edad, la raza, la alimentación, la frecuencia de recogida, la preparación psicosexual y la técnica de recogida (vagina artificial, vaina vaginal, esponja vaginal, fístula uretral, electroeyaculación, bulbouretrectomía, desviación del conducto deferente y otras) afectan a la cantidad de semen producida por los machos. El volumen del eyaculado varía mucho de una persona a otra e incluso dentro de un mismo individuo de una extracción a otra (Fernandez y Novoa, 1968). La siguiente tabla ilustra esta variabilidad:

**Tabla 1**

*Métodos de colección y volumen de semen de llamas*

Método	Promedio $\pm$ D.S.
Vagina artificial <sup>a</sup>	3,5 $\pm$ 1,7
Vagina artificial <sup>b</sup>	3,0 $\pm$ 1,9
Vagina artificial <sup>c</sup>	2,5 $\pm$ 1,6
Vagina artificial <sup>d</sup>	2,2 $\pm$ 1,3
Electroeyaculación <sup>e</sup>	3,6 $\pm$ 1,3
Electroeyaculación <sup>f</sup>	3,19 $\pm$ 1,8
Electroeyaculación <sup>g</sup>	2,8 $\pm$ 1,6
Electroeyaculación <sup>h</sup>	1,3 $\pm$ 4,3

*Nota.* <sup>a</sup> (Von Baer y Hellemann, 1998). <sup>b</sup> (Lichtenwalner et al., 1996a). <sup>c</sup> (Giuliano et al., 2008). <sup>d</sup> (Aller et al., 2003). <sup>e</sup> (M. Carretero et al., 2009). <sup>f</sup> (Casaretto et al., 2011). <sup>g</sup> (M. I. Carretero et al., 2012). <sup>h</sup> (Giuliano et al., 2008)

## D. Color y filancia

Según Alarcón et al. (2012), el color de las alpacas evaluado por observación directa mediante el método de la vagina artificial oscila entre blanco lechoso en el 60% de los casos, blanco cristalino en el 40% .

El 40% son de color blanco cristalino. Según (Derivaux, 1982), el semen tiene una tonalidad blanquecina en la mayoría de las especies animales y su opacidad varía en función de la concentración de espermatozoides.

El eyaculado de los camélidos no se compone solamente de una fase única (Sumar, 1985); la mayor parte está constituida por plasma seminal, representando el 88,5%, mientras que el 11,5% restante corresponde a espermatozoides (Garnica et al., 1993).

**Tabla 2**

*Método de colección y color de semen en alpacas*

Método	Color
Vagina artificial <sup>a</sup>	Cre moso lechoso a blanco cristalino
Electroeyaculación <sup>b</sup>	Blanco cristalino a blanco lechoso
Electroeyaculación <sup>c</sup>	Blanco lechoso claro a blanco lechoso medio
Vagina artificial <sup>d</sup>	Blanco cristalino

*Nota.* <sup>a</sup> (Galindo, 1995). <sup>b</sup> (Fernandez y Novoa, 1968). <sup>c</sup> (Ordoñez et al., 2013). <sup>d</sup> (González, 2004)

La filancia y el color sirven como criterios iniciales de evaluación visual de la calidad del eyaculado. Se ha observado que el color del semen en muestras tomadas de alpacas a través de fundas vaginales varía del blanco lechoso al blanco cremoso y al blanco cristalino. El semen se presenta en tres colores diferentes: cristalino, cremoso y blanco lechoso. El semen lechoso dificulta enormemente la preparación de frotis porque la muestra no se desliza sobre el portaobjetos. Los espermatozoides migran

lentamente debido a la alta viscosidad del plasma seminal (Fernandez y Novoa, 1968).

Utilizando un viscosímetro de placa cónica, (Casaretto et al., 2011) evaluaron 45 eyaculados flamígeros. Los resultados mostraron que no había correlación entre las viscosidades medidas y la creación de hilo, ya que varias de las muestras presentaban valores de viscosidad aparente y estructural elevados, pero no producían filamento.

La capacidad de formar hilo se conoce como filamentación, y es una propiedad reológica distinta de la viscosidad. Según Giuliano et al. (2010), la producción de hilo es una evaluación de la filancia del semen más que de su viscosidad.

La longitud promedio de la filancia en alpacas, medida mediante el procedimiento post-cópula, es de  $23,8 \pm 0,70$  mm, de acuerdo con el estudio realizado por (Ccoiso, 2018).

#### **E. pH del semen de camélidos**

Los estudios realizados en este campo demuestran lo crucial que es diluir el semen en un medio tamponado resistente a los cambios de pH para preservar la máxima vida viable de los espermatozoides (Bearden y Fuquay, 1982).

Para la mayoría de las enzimas espermáticas, un pH aproximado de 7 (de 6,9 a 7,5 para diversas especies) corresponde a los límites óptimos de actividad. Así pues, se prevé una tasa metabólica elevada si se mantiene un pH neutro de 7,0. La tasa metabólica disminuirá si el pH del semen se desvía hacia la acidez o hacia la alcalinidad (Fernández-Baca, 1991); el semen de llama obtenido por vagina artificial está entre 7,2 y 7,9 (Fowler, 1999), mientras que el semen de llama obtenido por electroeyaculación es de 7,7 (Quispe y Delgado, 2012). Sin embargo, una llama con vagina artificial tiene un pH de  $8,1 \pm 0,1$  (Lichtenwalner et al., 1996).

### 1.1.7 Características microscópicas del semen en los camélidos

#### A. Concentración espermática

Salisbury (1982) mencionan que la concentración espermática es el número de espermatozoides por unidad de volumen de semen. En Alpacas con desviación de los conductos deferentes logro obtener diferentes concentraciones, con un promedio de  $25.53 \times 10^4$  esp/mm<sup>3</sup> (Deza, 2004),  $15.9$  a  $9.8 \times 10^4$  (Perez et al., 2014); mediante la colecta de epidídimo fue de  $51.7$  a  $25.2 \times 10^6$  (Mamani-Mango et al., 2019); mediante la colecta post copula fue  $138 \times 10^6$  (Garcia et al., 2021).

El eyaculado de los espermatozoides tiene características muy variables de acuerdo a diferentes parámetros, Fernandez y Novoa (1968) afirman que es vital establecer cuántas hembras pueden ser inseminadas con un número óptimo de espermatozoides. La concentración de espermatozoides está determinada por la cantidad de testosterona secretada por los testículos y puede fluctuar entre muestras de semen dependiendo de las contribuciones relativas de las diferentes glándulas accesorias (Ccoiso, 2019). Con una media de  $65 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro, la concentración de esperma varía estadísticamente entre las llamas; estas variaciones se deben principalmente al efecto de eyaculaciones repetidas.

**Tabla 3***Concentración de espermatozoides por método de colección*

Método	Promedio ( $10^6/ml$ ) $\pm$ D.S.
Vagina artificial <sup>a</sup>	85,00 $\pm$ 89,0
Vagina artificial <sup>b</sup>	75,20 $\pm$ 20,4
Vagina artificial <sup>c</sup>	72,79 $\pm$ 68,96
Vagina artificial <sup>d</sup>	1,00 $\pm$ 0,8
Electroeyaculación <sup>e</sup>	148,40 $\pm$ 164,4
Electroeyaculación <sup>f</sup>	126,62 $\pm$ 159,2
Electroeyaculación <sup>g</sup>	77,00 $\pm$ 83,6
Electroeyaculación <sup>h</sup>	50,28 $\pm$ 73,13

*Nota.* <sup>a</sup> (Von Baer y Hellemann, 1998). <sup>b</sup> (Aller et al., 2003). <sup>c,h</sup> (Giuliano et al., 2008). <sup>d</sup> (Lichtenwalner et al., 1996b). <sup>e</sup> (M. Carretero et al., 2009). <sup>f</sup> (Casaretto et al., 2011). <sup>g</sup> (Carretero et al., 2012).

## **B. Morfología espermática**

Se obtuvieron las medidas de la morfología de la cabeza del espermatozoide de llama clasificándolo en 5 formas: 9,54% piriforme, 15,78% corto, 53,97% normal, 7,01% redondo y 13,70% largo. Se evaluaron un total de 5.590 espermatozoides de 26 llamas obtenidos por la técnica de post-copulación (Cusiyunca, 2017).

Von Baer y Hellemann (1998), afirman que existen diferencias notables entre machos en los parámetros examinados en la morfología de las llamas y la morfometría espermática de las alpacas, respectivamente.

**Tabla 4***Morfología de espermatozoides en alpacas*

Método	Morfología normal Promedio en %
Vagina artificial <sup>a</sup>	87,60 %
Vagina artificial <sup>b</sup>	75,81 %
Electroeyacuación <sup>c</sup>	62,00 %
Electroeyacuación <sup>d</sup>	61,95 %
Electroeyacuación <sup>e</sup>	61,40 %
Electroeyacuación <sup>f</sup>	57,14 %

*Nota.* <sup>a</sup> (Buendía et al., 2002). <sup>b</sup> (Sumar y Leyva, 1981). <sup>c</sup> (Carretero et al., 2012). <sup>d</sup> (Director et al., 2007). <sup>e</sup> (Giuliano et al., 2008). <sup>f</sup> (Casaretto et al., 2011)

**C. Motilidad**

Es la capacidad de movilidad progresiva se desarrolla a medida que el espermatozoide madura, los espermatozoides tienen un aparato de propulsión llamado flagelo, compuesto por proteínas contráctiles que se halla en órganos longitudinales y fibras burdas que proporcionan la fuerza propulsiva, el flagelo propaga ondas sinusoides repetitivas en ciclos alternos de contracción-relajación. La motilidad lograda a través de la desviación de los conductos deferentes reporta una motilidad individual del 71.89 % (Bertuzzi et al., 2020; Deza, 2004).

Según Sumar y Leyva (1981), la motilidad de los espermatozoides es un factor crucial para evaluar su calidad y revela cuán enérgicos son. Para evaluar con precisión la motilidad de los espermatozoides, uno debe hacer un juicio instantáneo después de la recolección. Debido a que el semen de la llama es filamentoso, su motilidad individual es lenta, lineal y rotacional. Esto significa que, en comparación con el porcentaje de motilidad progresiva en el mismo eyaculado, que siempre es menor, la motilidad espermática de la llama se encuentra en un mayor porcentaje de movimientos no progresivos y estáticos (Rodríguez, 2013).

Los espermatozoides pierden su capacidad de movimiento de forma permanente a medida que la temperatura supera los 50°C, sólo sobrevivirán unas horas a la temperatura corporal debido a la pérdida de sustratos energéticos y al descenso del pH (Bravo, 2002).

**Tabla 5***Motilidad espermática en llamas*

Método	Promedio (%) ± D.S.
Vagina artificial <sup>a</sup>	54,30 ± 10,5
Vagina artificial <sup>b</sup>	27,02 ± 25,44
Vagina artificial <sup>c</sup>	25,50
Vagina artificial <sup>d</sup>	23,70 ± 20,0
Electroeyaculación <sup>e</sup>	38,53 ± 28,5
Electroeyaculación <sup>f</sup>	35,00 ± 17,6
Electroeyaculación <sup>g</sup>	28,20 ± 19,3
Electroeyaculación <sup>h</sup>	26,88 ± 28,66

*Nota.* <sup>a</sup> (Aller et al., 2003). <sup>b,h</sup> (Giuliano et al., 2008). <sup>c</sup> (Von Baer y Hellemann, 1998). <sup>d</sup> (Lichtenwalner et al., 1996). <sup>e</sup> (Casaretto et al., 2011). <sup>f</sup> (Carretero et al., 2009). <sup>g</sup> (Carretero et al., 2012)

#### **D. Vitalidad**

Las tinciones permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos, así la cabeza de los espermatozoides muertos tiene la propiedad de dejar pasar los colorantes por perturbación de la membrana cefálica (Arizabal, 2018). En algunas investigaciones con espermatozoides de alpacas procedentes de los conductos deferentes hallaron para la vitalidad un 58.99% (Paricahua, 2001) y de 41.75 al 86.25% (Quintano, 2002).

## **E. Test hiposmótico**

Jeyendran et al. (1984) realizó esta técnica para espermatozoides humanos y que fue empleado en espermatozoides de alpaca. Esta técnica consiste en incubar los espermatozoides en una solución hipoosmótica para que respondan a dicho estrés con el hinchamiento de la membrana plasmática en la parte distal de la cola. Los espermatozoides con membrana funcional permiten el ingreso de agua por osmosis, lo cual se evidenciará por hinchamiento y enrollamiento de la cola (endosmosis).

### **1.1.8 Criopreservación de semen**

#### **A. La fase de enfriamiento**

Tiene una duración entre 0,5 a 3 horas o en un periodo no menor a 3 horas (Aisen, 2004; Aisen et al., 2021). En esta fase se produce una disminución de la motilidad espermática a causa de un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Banda et al., 2010; Santiani et al., 2013). El principal componente del dilutor que protege a los espermatozoides en esta etapa es la yema de huevo quien protege la membrana plasmática y acrosoma contra la baja de temperatura, se cree que los fosfolípidos, colesterol y las proteínas de baja densidad (LDL) son factores que protegen el shock frío, el mecanismo exacto aún se desconoce (Kulaksız et al., 2010; Yáñez-Ortiz et al., 2021). Al terminar la fase de enfriamiento debe haber un periodo de transición. En este periodo se adicionan sustancias crio protectoras (fracción B) al semen diluido el agregado se fracciona en 3 partes iguales (1º, 2º y 3º glicerolización) a intervalos de 10 minutos, homogenizando diluyente y semen luego de cada agregado (Yeste, 2016).

La mayor parte de los estudios realizados en la crioconservación de semen en camélidos se han enfocado en la estandarización de las distintas variables de los protocolos. En lo que respecta a los crioprotectores de los cuales el glicerol ha sido prácticamente el único crioprotector que se ha empleado utilizándose al 6-7% en los protocolos de CSA (Bravo et al., 2000; Vaughan, 2003; Aller et al., 2003; Santiani *et*

*al.*, 2005). Actualmente se viene investigando en camélidos el uso de otros crioprotectores que no sean el glicerol y su evaluación de la calidad del esperma post-descongelación. En un menor grado, el etilenglicol ha sido experimentado en alpacas y camellos (Santiani et al., 2005; El-Badry et al., 2017; Malo et al., 2016).

### **B. Agentes crioprotectores permeables**

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

### **C. Agentes crioprotectores no permeables**

Los agentes crioprotectores no permeables son sustancias de alto peso molecular que ejercen su acción crioprotectora por inducción osmótica debido a la rápida deshidratación celular, provocando una disminución del contenido hídrico intracelular, evitando la formación de cristales de hielo en la célula criopreservada (Medeiros et al., 2002). También aumentan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas. Por lo tanto, reducen la formación de cristales de hielo (De Leeuw et al., 1991). Además, se ha encontrado que los azúcares interactúan con la membrana plasmática al formar puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los azúcares con los grupos fosfato de los fosfolípidos de membrana. Al reemplazar el agua alrededor de los

fosfolípidos, previenen el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw et al., 1991). Estos agentes suelen usarse en asociación con los agentes penetrantes. Los más utilizados son: sacarosa, glucosa, dextrosa, polivinil- pirrolidona (PVP), dextrano, polietilenglicol.

#### **D. La descongelación del semen**

Es un proceso crítico para el espermatozoide. Aparte del daño ocasionado por la congelación, puede ocurrir daño a los espermatozoides si la descongelación no es el adecuado. Tener presente, si el semen es congelado rápidamente, así también debe ser descongelado para obtener la máxima recuperación de espermatozoides (Yeste, 2016). El semen de carnero congelado por pellets o pajilla debe ser descongelado en un baño de agua de 37°C en un tiempo de 15 a 20 segundos para pajillas y 45 a 60 segundos para pellets (Yáñez-Ortiz et al., 2021).

## **1.2 Antecedentes**

### **1.2.1 Internacionales**

En los laboratorios de reproducción animal y sobre todo aplicado para camélidos sudamericanos, es esencial comprender y aplicar correctamente la crioconservación de material biológico. Sin embargo, aunque se han desarrollado protocolos para criopreservación, aún es necesario experimentar y perfeccionar algunos de los métodos para mantener la viabilidad de los espermatozoides. (Ávila-Portillo et al., 2006) Para evaluar el potencial reproductivo de estas especies, se requiere ahora aplicar métodos alternativos de recolección de semen de camélidos sudamericanos machos, ya sean domésticos o silvestres, si no responden a colectas tradicionales, (Director et al., 2007).

Aller et al. (2003) ya presentaba trabajos en la evaluación del efecto de la criopreservación sobre la motilidad y viabilidad de espermatozoides de llama y obtener gestaciones por medio de la inseminación artificial (IA) con semen congelado en hembras nacidas y adaptadas a la región de la Puna argentina. El trabajo se llevó a cabo en el Campo Experimental de Altura (CEA) del INTA de Abra Pampa (Provincia de Jujuy, Argentina) ubicado a una altitud de 3484 metros sobre el nivel del mar. Los parámetros espermáticos evaluados en el semen fresco

y congelado/descongelado fueron la motilidad, viabilidad y fertilidad mediante un test de IA a campo.

El estudio de Guillén Palomino et al. (2021) propuso evaluar la eficacia de Androcoll-ETM (AE) para separar el espermatozoide de llama del SP y del diluyente de congelación en el semen congelado-descongelado. Mediante electroeyaculación, se obtuvieron un total de 22 eyaculados de cinco machos de Lama glama. Utilizando un diluyente que contenía lactosa, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), yema de huevo y dimetilformamida al 7%, se criopreservaron las muestras tras examinar el semen (motilidad espermática, concentración, viabilidad, función de la membrana e integridad del acrosoma).

En el trabajo de Stuart et al. (2019) se compararon las técnicas de criopreservación de espermatozoides de alpaca tratados con papaína después de la eyaculación. Para evaluar los espermatozoides se utilizaron la precongelación y 0, 30, 60 y 90 minutos después de la descongelación. Entre los que fueron ovulados ( $n = 26$ ), las tasas de preñez variaron poco (1/5 frescos, 1/4 tratados con papaína y 0/17 congelados-descongelados;  $P = 0,10$ ).

Las propiedades físicas y biológicas de los espermatozoides son muy variables y dependen de diversos factores, como: método de recolección, la fertilidad, libido del macho, temperatura del entorno. Aunque las eyaculaciones rara vez implican fraccionamiento, ciertos factores, como la concentración y la proporción de espermatozoides vivos y normales, pueden cambiar ligeramente durante el proceso (Bravo et al., 2002; Lichtenwalner et al., 1996a). El semen de los camélidos sudamericanos tiene por característica una eyaculación muy viscosa y de bajo volumen además de una baja concentración de espermatozoides tales características macroscópicas se reflejan en una baja motilidad progresiva. Actualmente el plasma viscoso es el principal obstáculo para el desarrollo de tecnologías de reproducción asistida (TRA) en camélidos (Kershaw-Young y Maxwell, 2012)

Hoy en día, las características clave que se evalúan en los eyaculados de camélidos sudamericanos incluyen el volumen, la motilidad, la concentración espermática, la integridad y funcionalidad de la membrana, además del estado del acrosoma y la morfología de los espermatozoides. La integridad normal del ADN

espermático es esencial para la calidad del semen, la fertilidad de los machos y también es crucial para el desarrollo temprano del embrión. (Fumuso et al., 2010)

Las técnicas conocidas comúnmente para la colección de semen en alpacas son la vagina artificial (VA), la electroeyaculación y aspiración poscoital; sin embargo, existe otras técnicas como son la fistula uretral y la desviación de conductos deferentes (Vaughan, 2003; Paricahua, 2001). La VA generalmente reporta datos variables siendo para volumen de 1.9 ml con rangos que van desde 0.4 a 1.8 ml, una concentración de  $33 \times 10^6$  espermatozoides por ml con una motilidad baja y un porcentaje de espermatozoides normales de 41%; mientras que para electroeyaculación el volumen va desde 1.3 a 4.3 ml, concentración espermática de 0.01 a 0.14 millones por ml, la motilidad puede variar desde 0 a 55% y porcentaje de espermatozoides normales fue de 41.5 hasta 81-3%. La inseminación artificial con semen fresco en camelidos reportan, en alpacas por vía cervical tasas de 39 a 51% mientras que lo reportado en llamas fue de 39% que representa 37 hembras de 94 inseminadas. Del mismo modo al evaluar dilutores de semen se tiene con tris, ácido cítrico y fructosa (T+AC+F) una tasa de preñez del 31.8%; el mismo dilutor, yema de huevo más tripsina reportan 64.3%, el mismo dilutor tris, yema de huevo agregando colagenasa (5 mg/ml) se obtuvo entre 57.7 a 67 % de preñez, tris más colagenasa (1mg/ml) alcanzó 26% y finalmente con tris, yema de huevo y DMSO solo alcanzaron 7.8% de preñez. Sin embargo, ninguno de estos reportes consiguen tasas de nacimiento (Bravo, et al., 2000; Vaughan, 2003; Aller et al., 2003; Santiani et al., 2005).

Durante el proceso de refrigeración también existe reportes sobre la motilidad siendo de 44.7%, 37.5% y 33% a las 24, 48 y 72 horas respectivamente de refrigeración de las muestras seminales; finalmente los reportes de motilidad posterior al proceso de crioconservación de espermatozoides procedentes del conducto deferente fueron de 18.3 y 25.8%, además se evaluó tinción siendo el porcentaje de 61.4 y 63.4 y Host (Hiposmotic test) de 41.5 y 48.2% con PBS y Plasma seminal respectivamente (Aisen et al., 2021). Al ser una técnica nueva la desviación del conducto deferente la evaluación con sistemas computarizados de evaluación de semen los estudios son escasos, se tienen algunos reportes como son de VCL ( $\mu\text{m/s}$ ) de 61.4, VSL ( $\mu\text{m/s}$ ) de 15.8, VAP ( $\mu\text{m/s}$ ) de 31, LIN (%) de

27.7, STR (%) de 51.1, WOB (%) de 52.4, ALH ( $\mu\text{m}$ ) 3.21 y BCF (Hz) de 4.39 (Meza et al., 2018).

### 1.2.2 Nacionales

La obtención de semen en camélidos requiere una producción espermática constante y de calidad para asegurar un buen semen. Las técnicas de recolección están bien desarrolladas en otros animales, especialmente en rumiantes domésticos donde es una práctica común, pero en camélidos, la colección presenta desafíos debido a sus características reproductivas, anatómicas y fisiológicas particulares. No existe un protocolo recomendado ni una técnica óptima, ni tampoco un manejo posterior establecido. Las características seminales son variables y dependen del método de recolección, y diversos factores influyen en su calidad, como la frecuencia de colección, la edad del animal y la época del año. (Pacheco Curie, 2008)

Mediante la técnica de desviación de conductos deferentes, diversos estudios reportan concentraciones tras la colección de  $253 \times 10^6$ ,  $405 \times 10^6$  espermatozoides siendo estos los datos mas actuales; la motilidad a la colección obtenida mediante esta técnica es necesario indicar que fue altas reportando porcentajes desde 30.4 a 50.9% en un primer reporte, otros autores reportan 57.5% de motilidad a la colección, evaluando dos dilutores como son Tris – yema de huevo reportan motilidad total de 53.3% y con andromed reportan 50.7% y andromed y yema de huevo obtuvieron 54% (Aisen et al., 2021; Bertuzzi et al., 2020).

Cucho et al. (2021), identifico posibles subpoblaciones espermáticas basándose en la morfometría del espermatozoide de llama. A cuatro llamas Q'ara, de edades comprendidas entre los 4 y los 6 años, se les extrajo semen mediante electroeyaculación cuatro veces cada una, con un intervalo de una semana. Se midieron la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos, el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica, el volumen y la motilidad general. Mediante el uso del Sistema Integrado de Análisis de Semen, se evaluaron los parámetros morfométricos de los espermatozoides. Se midieron la longitud, la anchura, el área, el perímetro, la elipticidad, el alargamiento, la regularidad y la rugosidad de la cabeza del espermatozoide de llama, así como la

anchura, el área, la distancia y el ángulo de inserción de la pieza media del espermatozoide.

### 1.2.3 Locales

El comportamiento sexual varía entre las especies, y los camélidos sudamericanos exhiben características únicas. La posición durante el acto coital y su temperamento nervioso hacen que la recolección de semen sea especialmente complicada. (Bustinza, 2001)

Perez et al. (2014) En su estudio determinó las propiedades macroscópicas y microscópicas de los espermatozoides extraídos de los conductos deferentes durante la estación reproductiva. Los espermatozoides se extrajeron de los conductos deferentes reconducidos quirúrgicamente en alpacas macho dos veces por semana durante un total de doce semanas. A continuación, los espermatozoides se diluyeron en el diluyente comercial Triladyl® para determinar sus características.

Estudios previos evaluaron tres tratamientos T1: Tratamiento control (TRIS); T2: 100% leche descremada; T3: 75% leche descremada, 25% yema de huevo (Cabrera, 2018) criopreservó espermatozoides de los conductos deferentes. En el estudio se utilizaron tres machos de alpaca Huacaya mayores de cinco años a los que se les realizó una plastia de derivación de los conductos deferentes. Se recolectó una fracción de 0,5 mL de cada tratamiento.

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 2.1 Identificación del problema

La aplicación de biotecnologías reproductivas depende de la obtención de semen de buena calidad para que los procesos sean eficientes esto es dependiente de la técnica de colección entre las que destacan la vagina artificial (VA), electroeyaculación (EE), aspiración post cópula, fístula uretral y otros (condones, esponjas vaginales) teniendo muestras con y sin plasma seminal que favorece en gran medida el manejo y conservación debido a la naturaleza del plasma seminal en camélidos sudamericanos (CSA) que se caracteriza por su alta viscosidad atribuida principalmente a su contenido de mucina. Las técnicas más utilizadas y con bastantes datos científicos son la VA y EE que permite obtener muestras con plasma seminal por tanto su manejo requiere del uso de enzimas y tratamientos mecánicos que podrían generar efectos negativos sobre la membrana de los espermatozoides en tal sentido disminuir su viabilidad. La evaluación del uso de dilutores en CSA durante los procesos de colección, enfriamiento y post descongelación es problemática debido a que no se tiene métodos de evaluación confiables como indicadores de la fertilidad en CSA que se traduce con tasas de preñez variables tras la IA. La ventaja de utilizar espermatozoides libres de plasma seminal ofrece un modelo más sencillo para establecer y estudiar variables a la criopreservación como tasas de congelación y temperaturas de congelación que permitirían mantener los espermatozoides por mayor tiempo y facilitaría el transporte e intercambio de material genético entre las regiones altoandinas del Perú, en CSA se ha desarrollado solo con muestras de epidídimos *post mortem* alcanzando porcentajes de motilidad post descongelación desde 8 hasta 31%, la presente propuesta de investigación pretende brindar una alternativa nueva de colección de espermatozoides mediante la desviación del conducto deferente en CSA y evaluar la colecta como técnica, protocolos de conservación y la utilización de técnicas ya conocidas de evaluación de espermatozoides complementada con técnicas computarizadas para una mejor objetividad.

## 2.2 Enunciados del problema

### 2.2.1 Problema general

- ¿Cuál es el efecto de diferentes dilutores sobre la producción de espermatozoides del conducto deferente en llamas durante la colección, conservación y evaluación de la calidad espermática?

### 2.2.2 Problemas específicos

- ¿Cómo afectan los diferentes dilutores a la crioconservación de espermatozoides del conducto deferente en llamas?
- ¿Cómo varía la calidad espermática (vitalidad, test hiposmótico y motilidad) de los espermatozoides del conducto deferente en llamas durante la colección, refrigeración y descongelación?
- ¿Qué diferencias existen en las características espermáticas post descongelación utilizando el sistema CASA en espermatozoides del conducto deferente en llamas tratadas con diferentes dilutores?

## 2.3 Justificación

El Perú según el último censo cuenta con una población aproximada de la población nacional total de Llamas se estima en 1257000 cabezas, los principales departamentos productores son: Puno (35%), Cusco (18%), Huancavelica (11%), Ayacucho (9.5%) y Arequipa (9.3%), (INEI, 2013). Los camélidos sudamericanos son importantes en varias partes del mundo teniendo un papel importante en la producción animal en ambientes hostiles como el desierto (camellos) y los andes peruanos (camélidos sudamericanos) (Tibary, 2017). El uso de la inseminación artificial (IA) esta desarrollada en otras especies y es utilizada como la herramienta más importante de mejora genética que permitiría un avance genético en características de importancia económica como la fibra en alpacas y carne en llamas generando mayores ingresos en pobladores altoandinos; en CSA la técnica de IA es limitada por el manejo del semen principalmente para espermatozoides crioconservados donde la técnicas requieren ser optimizadas, sin dejar de lado la falta de información completa sobre la fisiología reproductiva en hembras (Morrell y Abraham, 2020). Las bajas tasas de preñez tras la IA se debe a las característica reológicas del semen (viscosidad, volumen inconstante, etc) que impiden la homogenización con los dilutores convencionales y comerciales, la desviación del

conducto deferente es una alternativa interesante puesto que permite mezclar las muestras con dilutores como ocurre con otras especies domésticas facilitando el manejo, evaluación, conservación en refrigerado y hasta manejar semen criopreservado (Bertuzzi et al., 2020). La criopreservación de semen en muchas especies ofrece la posibilidad de mantener por largos periodos facilitando la técnica de IA en CSA (Malo et al., 2018), el éxito de la criopreservación depende de varios factores aun no estudiados en muestras provenientes del conducto deferente como son: el dilutor más adecuado para mantener espermatozoides refrigerados y criopreservados, las tasas de congelación adecuada, las temperaturas de congelación adecuadas entre los principales factores. El uso de los espermatozoides criopreservados tendría gran utilidad en biotecnologías avanzadas como la fertilización *in vitro* otra herramienta de mejora genética poco estudiada en CSA. En tal sentido es importante caracterizar y mejorar la calidad de espermatozoides obtenidos por este método de colección de espermatozoides que facilitaría enormemente el manejo y criopreservación para usos sobre biotecnologías reproductivas que permite el avance genético de CSA en campo como la IA que según algunos reportes indican que aquellos espermatozoides libres de plasma seminal interactúan con células epiteliales uterinas y oviductales lugares donde se producen la capacitación y posterior fertilización, así lo mencionan (Morrell y Abraham, 2020).

## 2.4 Objetivos

### 2.4.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de dilutores sobre la producción de espermatozoides procedentes del conducto deferente durante la colección, conservación y evaluación de la calidad espermática en llamas (*Lama glama*).

### 2.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la acción de dilutores para la crioconservación de espermatozoides del conducto deferente en llamas
- Evaluar la calidad espermática (Vitalidad, Test hiposmótico y Motilidad) de los espermatozoides del conducto deferente a la Colección, refrigeración y descongelación en llamas

- Comparar las características espermáticas post descongelación mediante el sistema CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides procedentes del conducto deferente en llamas

## 2.5 Hipótesis

### 2.5.1 Hipótesis general

- Existe variaciones de la calidad espermática pre y post crioconservación frente a los efectos de los dilutores en llamas (Lama glama).

### 2.5.2 Hipótesis específicas

- La crioconservación de espermatozoides del conducto deferente en llamas se ve afectada por la elección del dilutor utilizado.
- La calidad espermática (vitalidad, test hiposmótico y motilidad) de los espermatozoides del conducto deferente en llamas varía durante las etapas de colección, refrigeración y descongelación en función del dilutor empleado.
- Las características espermáticas post descongelación, evaluadas mediante el sistema CASA (Computerized Assisted Sperm Analysis), difieren entre los espermatozoides del conducto deferente en llamas tratadas con diferentes dilutores.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de estudio

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno ubicado a 3850 msnm; ubicado en el distrito de Puno, provincia de Puno, departamento de Puno, donde la fase experimental se realizó durante el mes de enero a octubre del 2020 determinado con una temperatura promedio de 10°C durante todo el periodo que tuvo duración el estudio.

#### 3.2 Población

La población para el estudio estuvo constituida por 6 llamas macho donadores de espermatozoides de 3 a 4 años de edad y fueron criados en iguales condiciones de alimentación el cual fue en base a trébol blanco y césped común albergadas en las instalaciones del hospital veterinario.

#### 3.3 Muestra

La muestra fue realizada mediante el muestreo no probabilístico por conveniencia con referencia a estudios similares para experimentos similares. Las muestras de espermatozoides fueron colectadas 9 veces por mes los mismo que fueron diluidos con diferentes dilutores comerciales y preparados en el mismo Laboratorio (Tris, Andromed®, Bioxcell®) que posteriormente serán especificados.

#### 3.4 Método de investigación

El método de investigación realizada es experimental debido a que posee variables independientes como son los procesos de crioconservación de espermatozoides y dilutores debido a que ellos han sido manipulados para la obtención de los resultados (variables dependientes) como son características microscópicas a la colección, refrigeración y post crioconservación que fueron evaluadas mediante pruebas de laboratorio y equipo computarizado.

### 3.5 Descripción detallada de métodos por objetivos específicos

#### 3.5.1 Metodología

##### A. Desviación del conducto deferente

La técnica se realizó según Pérez et al. (2014) para el presente estudio se realizó la desviación de los conductos deferentes de 6 llamas machos con los protocolos y técnicas descritas según lo recomendado por el autor antes mencionado y siguiendo todos los protocolos por el Comité de ética para el manejo de animales de experimentación.

##### B. Preparación de dilutores

Para la preparación del dilutor Tris – ácido cítrico – yema de huevo; la preparación se realizó según lo mencionado por Arizabal (2019) con algunas modificaciones iniciando se realizó el pesado de los insumos como: ácido cítrico 2.4 gr, fructosa 1 gr y tris (Trihidroximetilaminometano) 2.242 gr, todo vertido a una probeta graduada de 100 ml, la probeta fue homogenizada y disuelto los reactivos se colocaron en agua a 80°C (ebullición) durante 10 min (esterilizar), finalmente se envaso el dilutor separando en fracción A que contenía el dilutor tris al 75% y se le añadió yema huevo al 20%, mientras que la fracción B contuvo un volumen total de 1 ml (dilutor madre tris 75% + yema de huevo 20% + glicerol 5%).

El dilutor Andromed®; la preparación fue realizada según las indicaciones del fabricante y (Rojas, 2014; Bustillos y Sandoval, 2015; Rojas, 2019), en una proporción de 1:4; colocando 4 ml de agua tridestilada (en baño maría) seguidamente se colocó 1 ml de Andromed® manteniendo en baño de maría por 10 minutos, la preparación del dilutor a 35°C, seguidamente se homogenizó en un vortex y se mantuvo hasta su uso. El dilutor Bioxcell® la preparación fue realizada según las recomendaciones del fabricante y lo mencionado por Huaman (2010) y Bustillos y Sandoval (2015) en una proporción de 1:4 similar a lo explicado con el dilutor Andromed®.

### **C. Colección de espermatozoides con diferentes dilutores**

La colección fue realizada según lo descrito por Perez et al. (2014); Cabrera (2018); Arizabal (2019) se realizó en un ambiente donde no se permita el ingreso de los rayos solares colectando de los reproductores directamente del conducto deferente desviado, previamente los animales fueron inmovilizados y derribados en posición de cubito lateral, seguidamente se realizó la limpieza del área de colección con algodón humedecido con suero fisiológico tratando de coleccionar desde la cola del epidídimo hasta la fistula del conducto deferente desviado realizando masajes en dirección caudo-craneal; facilitando la salida de los espermatozoides.

Las microgotas de espermatozoides que se obtuvieron fueron colectadas con un tips de 10µl acoplados a una jeringa de tuberculina colocando en tubos de ensayo de 5ml con 1 ml de dilutor tris (fracción A) en cambio para los dilutores andromed y bioxcell se colocó 2 ml de dilutor (temperatura de 37°C), la colecta fue realizada 3 veces a la semana por espacio de 5 a 6 meses en todos los machos en estudio; luego de la colección sobre la fistula del conducto se añadió vaselina con antibiótico para la protección de la fistula, seguidamente se trasladó los espermatozoides para la evaluación macroscópica y microscópica.

### **D. Enfriamiento y fase de equilibrio de espermatozoides**

Se realizó según lo recomendado por Delgado y Quispe (2015) enseguida se realizaron las evaluaciones de motilidad total, vitalidad, integridad de acrosoma e integridad de membrana, antes de realizar el descenso de la temperatura; se procedió a descender la temperatura, con una curva de enfriamiento de -1°C/3 minutos aproximadamente hasta llegar a 5°C, para el descenso de la temperatura se usó una caja de Tecnopor con bloques de hielo en cada lado y al medio de estos bloques se colocó un vaso de precipitados de 500ml donde se contenía el tubo de ensayo con la fracción A y B del dilutor TRIS y los dilutores Andromed® y Bioxcell® respectivamente. La fase de equilibrio, fue realizada según lo recomendado por Antezana (2019) siendo tal como sigue: una vez que la

fracción A con la muestra de espermatozoides y la fracción B con glicerol 5 % se encontraron en una temperatura de 5°C, se procedió a homogenizar tanto la fracción A con las muestras de espermatozoides y la fracción B que contiene glicerol 5% donde se añadió esta última sobre la fracción A lentamente finalmente se homogenizó el tubo de ensayo ya con ambas fracciones y se dejó equilibrar durante 30 minutos realizando al final las evaluaciones respectivas de motilidad total, vitalidad, integridad de acrosoma e integridad de membrana, antes de realizar el proceso de empajillado.

### **E. Crioconservación de espermatozoides**

Previo a la crioconservación se realizó el rotulado de las pajillas de 0.25ml con un plumón indeleble de diferente color para poder diferenciar la identificación de macho, fecha, tipo de dilutor y número de tratamiento; Posteriormente se realizó el sellado con alcohol polivinílico y se introdujeron al recipiente con agua a 5°C. Seguidamente se procedió con la crioconservación propiamente dicha de espermatozoides en un biocongelador de semen utilizando una tasa de descenso de la temperatura de -20°C/minuto llegando hasta una temperatura de -120°C en 6 minutos aproximadamente; finalmente, las pajillas fueron sumergidas directamente al nitrógeno líquido y almacenadas en un tanque criogénico que contenía nitrógeno líquido.

### **F. Evaluación de la viabilidad espermática microscópica y descongelación**

La evaluación de las características microscópicas como son la motilidad, vitalidad, integridad de acrosoma e integridad de la membrana plasmática (host). Se realizaron en tres etapas las cuales fueron: a la colección 37°C, en fase de equilibrio 5°C y a la descongelación a 38°C.

#### **F.1 Motilidad espermática**

La evaluación de la motilidad se realizó según lo descrito por Montoya (2009) que fue realizada con un microscopio óptico Leica® provisto de una platina calentadora, seguidamente se colocaron laminas

cubre objetos y porta objetos sobre la platina, tomando una muestra de 10 ul de espermatozoides la cual fue colocada sobre la lámina porta objeto atemperada a 37°C seguidamente se cubrió la gota de espermatozoides diluido con una lámina cubre objetos también atemperada a 37°C.

La evaluación se realizó a 400X el microscopio en todo momento estuvo conectada por un puerto USB a una laptop provista del programa LAZ EZ® que permite capturar imágenes y videos el conteo de los espermatozoides fueron como mínimo un total de 200 espermatozoides de cada muestra y los datos fueron expresados en porcentajes atreves de la siguiente formula:

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

## F.2 Vitalidad espermática

Se realizó según lo descrito por Rodríguez et al. (2018) en todos los casos fue necesario que se calentaran las láminas porta objetos sobre una platina calentadora a 37°C, seguidamente se colocó 4ul de muestra de espermatozoides adyacente a ella se colocó 4ul de colorante eosina-nigrosina y se esperó por 4 segundos a que ambas gotas calienten y se mezclaron. Con otra lamina porta objetos se extendieron las muestras finalmente la evaluación se realizó en un microscopio óptico se colocó una lámina cubre objetos encima de ella una gota de aceite de inmersión. Del mismo modo que para motilidad se realizó la evaluación se contaron un total de 200 espermatozoides como mínimo, en donde se consideraron espermatozoides vivos aquellos que no se lograron teñir y espermatozoides muertos aquellos que se tiñeron de color rosado.

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

## F.3 Integridad de membrana plasmática o Hiposmotic test (HOST)

Se realizó según lo mencionado por Apaza (2017) para todo el procedimiento se realizó en baño de maría a 37°C incubando en un tubo de ensayo de 3 ml donde se colocó 500 ul de solución HOST para que

pueda atemperarse (37°C) seguidamente se añadió 50 ul de muestra de espermatozoides y se dejó en incubación en baño de maría a 37°C durante 45 minutos. La evaluación se realizó en un microscopio óptico a 400X de ampliación, para lo cual se contaron un mínimo de 200 espermatozoides. El criterio de clasificación fue de dos formas donde aquellos espermatozoides que presentaron la cola enrollada a las que se denominaron vivos, y los que no presentaron cola enrollada se consideraron como espermatozoides muertos.

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

### **G. Evaluación de la viabilidad espermática mediante el sistema computarizado de análisis de semen (CASA)**

Para la evaluación por sistema CASA fue necesario el uso de un microscopio de contraste de fase con un contraste negativo de 10X, los videos registrados fueron analizado a 25 cuadros por segundo evaluando las siguientes características de motilidad: Motilidad total y Motilidad progresiva (motilidad progresiva rápida, motilidad progresiva lenta, motilidad circular progresiva, motilidad circular local, motilidad local e inmóvil).

VCL (µm/s): Velocidad curvilínea

VSL (µm/s): Velocidad rectilínea

VAP (µm/s): Velocidad promedio del recorrido

DCL (µm): Distancia en línea curva

DSL (µm): Distancia en línea recta

DAP (µm): Distancia en el camino Promedio

ALH (µm): amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide

BCF (Hz): Frecuencia de batido de la cabeza

WOB (VAP/VCL): índice de oscilación (promedio entre VAP/VCL)

LIN (VSL/VCL): índice de linealidad

STR (VSL/VAP): índice de rectitud

### 3.5.2 Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el sistema de análisis estadístico Jamovi 1.6.23.0 (R core team, 2021). Los parámetros espermáticos obtenidos en la colección a 37°C y fase de equilibrio 5°C y posterior a la crioconservación primeramente fueron transformados a valores angulares y posteriormente sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza si cumplen ambos los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y diseño completamente al azar. Mientras que aquellos datos que no cumplieron con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas fueron sometidos mediante la prueba no paramétrico de kruskal-wallis con su respectiva prueba post hoc.

El modelo aditivo lineal del DCA fue:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_y$$

Donde

$i$  = tratamientos 1 (TRIS), 2 (andromed) y 3 (bioxccl).

$y_{ij}$  = variable respuesta

$\mu$  = media general

$\alpha_i$  = efecto del  $i$ -ésimo dilutor para crioconservación

$e_y$  = error experimental

## CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.1 Resultados

## 4.1.1 Evaluación de espermatozoides a la colección (37°C)

La tabla 6 muestra la motilidad total, Host y vitalidad todas ellas expresada en porcentajes dichos resultados son obtenidos tras la evaluación al momento de la colecta (37°C) y diluidos con los respectivos dilutores.

Tabla 6

*Características espermáticas a la colección (37°C)*

	<i>n</i>	<i>Tris</i>	<i>Andromed</i>	<i>Bioxcell</i>
<i>Motilidad total (%)</i>	36	64.71 ± 1.86 a	63.42 ± 1.59 a	37.92 ± 0.58 b
<i>Test hiposmótico (%)</i>	36	46.9 ± 2.15 a	61.9 ± 0.83 b	58.8 ± 1.50 b
<i>Vitalidad (%)</i>	36	59.85 ± 0.79 a	67.94 ± 2.43 b	55.48 ± 1.02 a

*Nota.* <sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada fila denota diferencia estadística.

## 4.1.2 Evaluación de espermatozoides al enfriamiento (5°C)

La tabla 7 muestra la motilidad total, Host y vitalidad todas ellas expresada en porcentajes dichos resultados son obtenidos tras la evaluación al momento del enfriamiento (5°C) de los espermatozoides diluidos con los respectivos dilutores.

Tabla 7

*Características espermáticas en fase de equilibrio (5°C)*

	<i>n</i>	<i>Tris</i>	<i>Andromed</i>	<i>Bioxcell</i>
<i>Motilidad total (%)</i>	36	52.35 ± 2.96 a	56.73 ± 0.75 a	32.59 ± 1.14 b
<i>Test hiposmótico (%)</i>	36	40.91 ± 2.21 a	59.28 ± 1.26 b	48.54 ± 0.95 c
<i>Vitalidad (%)</i>	36	57.93 ± 2.19ab	60.23 ± 1.95 a	51.59 ± 0.84 b

*Nota.* <sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada fila denota diferencia estadística.

## 4.1.3 Evaluación de espermatozoides post crioconservación

La tabla 8 muestra la motilidad total, Host y vitalidad todas ellas expresada en porcentajes dichos resultados son obtenidos tras la evaluación posterior a la

crioconservación o dicho de otra forma a la descongelación de los espermatozoides procedentes del conducto deferente diluidos con los respectivos dilutores.

**Tabla 8**

*Características espermáticas post crioconservación/descongelación*

	<i>n</i>	<i>Tris</i>	<i>Andromed</i>	<i>Bioxcell</i>
<i>Motilidad total (%)</i>	36	26.15 ± 1.04 <i>a</i>	32.65 ± 0.53 <i>b</i>	10.07 ± 0.29 <i>c</i>
<i>Test hiposmótico (%)</i>	36	23.20 ± 2.50 <i>a</i>	31.91 ± 1.35 <i>b</i>	17.46 ± 0.82 <i>a</i>
<i>Vitalidad (%)</i>	36	38.73 ± 0.97 <i>a</i>	29.25 ± 0.38 <i>b</i>	10.80 ± 0.24 <i>c</i>

*Nota.* <sup>a,b</sup> Letras diferentes en cada fila denota diferencia estadística.

#### **4.1.4 Evaluación de espermatozoides post crioconservación mediante equipo computarizado (casa)**

La tabla 9 muestra una serie de parámetros de viabilidad espermática desarrollada por el equipo CASA expresada en diferentes unidades, dichos resultados son obtenidos tras la evaluación posterior a la crioconservación o dicho de otra forma a la descongelación de los espermatozoides procedentes del conducto deferente diluidos con los respectivos dilutores.

**Tabla 9**

*Características espermáticas post criopreservación/descongelaciones evaluadas mediante el sistema computarizado (CASA)*

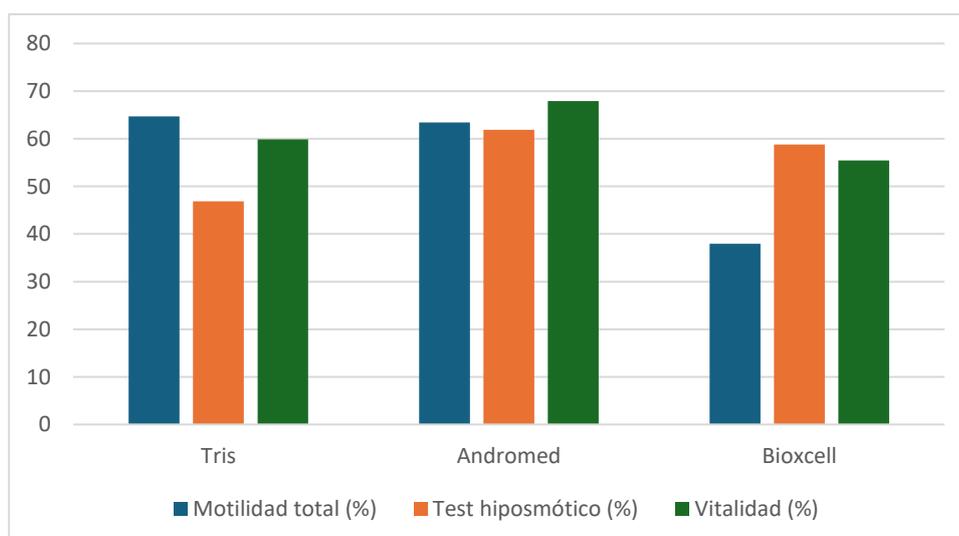
	<i>Valor de F</i>	<i>Grados de libertad 1</i>	<i>Grados de libertad 2</i>	<i>p value</i>
<i>VCL (μm/s)</i>	12.20	2	9.35	0.0025
<i>VSL (μm/s)</i>	8.19	2	9.62	0.0084
<i>VAP (μm/s)</i>	9.74	2	9.67	0.0048
<i>DCL (μm)</i>	7.49	2	9.06	0.0120
<i>DSL (μm)</i>	7.25	2	9.82	0.0117
<i>DAP (μm)</i>	7.49	2	9.31	0.0115
<i>ALH (μm)</i>	3.37	2	8.78	0.0821
<i>BCF (Hz)</i>	12.98	2	9.42	0.0020
<i>WOB (VAP/VCL)</i>	0.42	2	9.68	0.6658
<i>LIN (VSL/VCL)</i>	3.31	2	9.17	0.0830
<i>STR (VSL/VAP)</i>	12.47	2	7.55	0.0041

## 4.2 Discusión

### 4.2.1 Evaluación de espermatozoides a la colección (37°C)

**Figura 1**

*Características espermáticas a la colección (37°C)*



Observamos que los porcentajes en los tres parámetros de evaluación son diferentes comparando las medias y sus respectivos errores estándar ( $p < 0.05$ ); Los resultados de motilidad total a la colección (Figura 1) fueron superiores para los dilutores Andromed® (63.42%) y Tris (64.71%) en comparación con Bioxcell® (37.92%). Estudios previos de Núñez et al. (2009) en alpacas reportaron motilidad inicial de 60% utilizando un dilutor a base de tris, citrato, fructosa y yema de huevo, resultados muy similares a los del presente estudio para Tris y Andromed®. Sin embargo, Guerra et al. (2013) hallaron motilidad inicial de solo 36% en llamas con un dilutor tris-yema, algo inferior al Tris en este estudio. Las diferencias podrían deberse a variaciones individuales entre los machos donantes, también algunos resultados fueron ligeramente superiores a lo reportado por otros autores quienes reportan porcentajes entre 56.8% y 56.2% de motilidad utilizando otro dilutor comercial como es el Triladyl® probablemente debido a la composición de los dilutores (Perez et al., 2014). Deza (2004) reporta una motilidad de 77.7%, vitalidad de 58.25% en espermatozoides de alpaca con dilutor Tris con 20% de yema de huevo resultados que no superan a lo reportado en el presente estudio. Todos los porcentajes muestran porcentajes aceptables de conservación a la colección debido probablemente a la composición de los dilutores que contienen principalmente un buffer (evita los cambios bruscos de pH), fuente de energía como la glucosa o fructosa principalmente (Yeste, 2016).

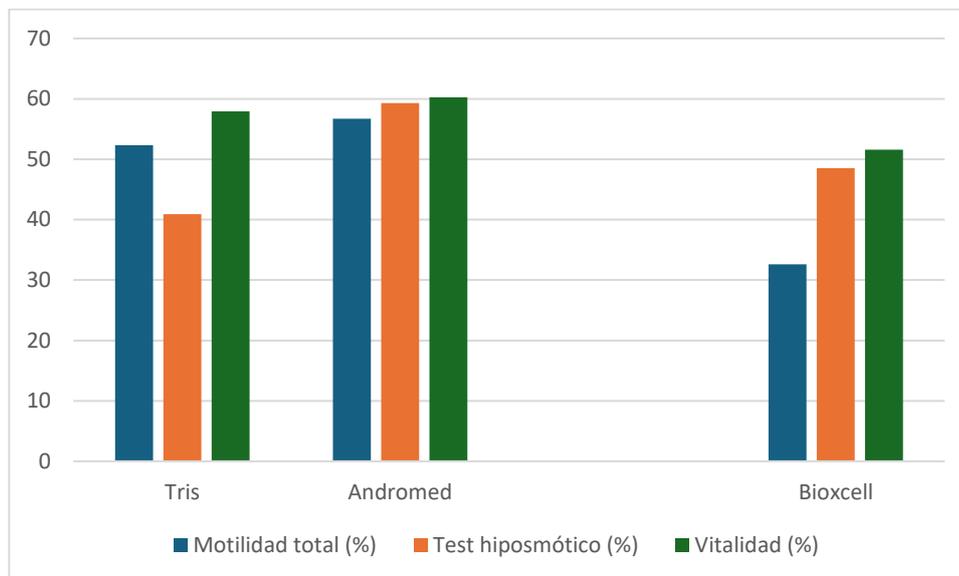
La comparación de los presentes resultados son superiores a lo reportado con otros autores que realizaron otro método de colección de semen como lo mencionado por Banda et al. (2010) en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de testículos de alpacas en una solución fisiológica buffer (PBS) y diluidas con Tris, Tes y leche descremada (dilutores utilizados) reportando motilidad de 14.0, 8.6 y 17.0% respectivamente, 32.6% de vitalidad y 34.5% integridad de membrana de espermatozoides; mediante el método de vagina artificial y evaluando tres dilutores Raymundo et al. (2006) alcanzan una motilidad de  $54.0 \pm 8.0\%$ . Por otra parte Giuliano et al. (2019) reportan en llamas a la colección una motilidad de  $32.3 \pm 20.4$ , Host de  $36.1 \pm 13.1\%$  y vitalidad  $54.1 \pm 17.0\%$  mediante la colección de semen por electroeyaculación la mayoría de los resultados son inferiores a los del presente estudio, podría deberse al tipo de colecta que presenta diferentes características seminales ya que los eyaculados

presentas secreciones de las glándulas anexas y le dan la característica viscosa al semen de camélidos (Aisen et al., 2021).

#### 4.2.2 Evaluación de espermatozoides al enfriamiento (5°C)

**Figura 2**

*Características espermáticas en fase de equilibrio (5°C)*



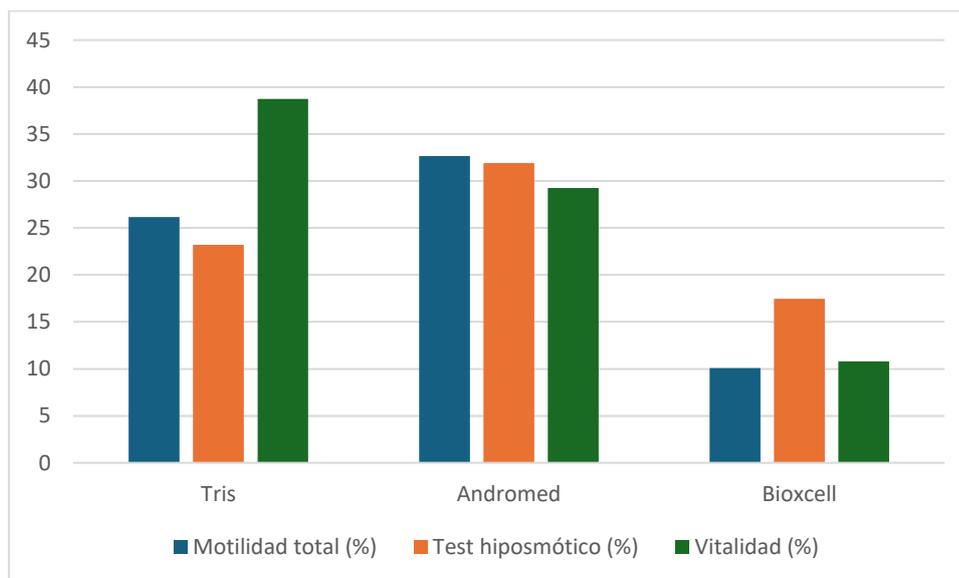
En la Figura 2 observamos para motilidad total similitud al comparar el dilutor Tris con Andromed® ambos superiores al dilutor Bioxcell®; en cuanto al porcentaje de Host se determina una diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre los tres dilutores siendo superior Andromed® seguida por Bioxcell y finalmente el dilutor Tris; para la comparación de la vitalidad observamos diferencia entre Andromed® y Bioxcell® mientras que en este caso el dilutor Tris es similar a ambos dilutores ( $p > 0.05$ ). Estos resultados son superiores a lo reportado por Cabrera (2018) quien también hizo la colección por el método de desviación de los conductos deferentes en alpacas y trabajo con T1: Tratamiento control (TRIS); T2: Leche descremada 100%; T3: Leche descremada 75%, yema de huevo 25% obtuvieron una motilidad a la refrigeración a 5°C fue 33.24% (T1), 42.83% (T2) y 41.98% (T3); para Host porcentajes a la refrigeración a 5°C fue 33.52% (T1), 66.18% (T2) y 53.59% (T3) y para Vitalidad a la refrigeración a 5°C fue 26.45% (T1), 36.65% (T2), 29.47% (T3); esta diferencia probablemente se deba a la especie animal y también en nuestro experimento al TRIS de le adiciono 20 % de yema de huevo. Con otras técnicas de colección Choez et al. (2015) indica que en semen recuperado

mediante la técnica de electroeyaculación evaluó motilidad y Host durante el proceso de refrigeración con dilutor Tris observo en la primera hora de refrigeración 50.93% y 46.78% respectivamente, los resultados de motilidad son similares al presente estudio esto probablemente es debido principalmente a la acción de la yema de huevo (Tris) y lecitinas (Andromed® y Bioxcell®) estos componentes tienen como función principal el mantener la estabilidad de membrana en escenarios de enfriamiento; además, que poseen gran porcentaje de Colesterol que mantiene la estructura de la membrana plasmática de los espermatozoides (De Leeuw et al., 1991; Garcia et al., 2021; Hammerstedt et al., 1990; Yeste, 2016).

#### 4.2.3 Evaluación de espermatozoides post crioconservación

**Figura 3**

*Características espermáticas post crioconservación/descongelación*



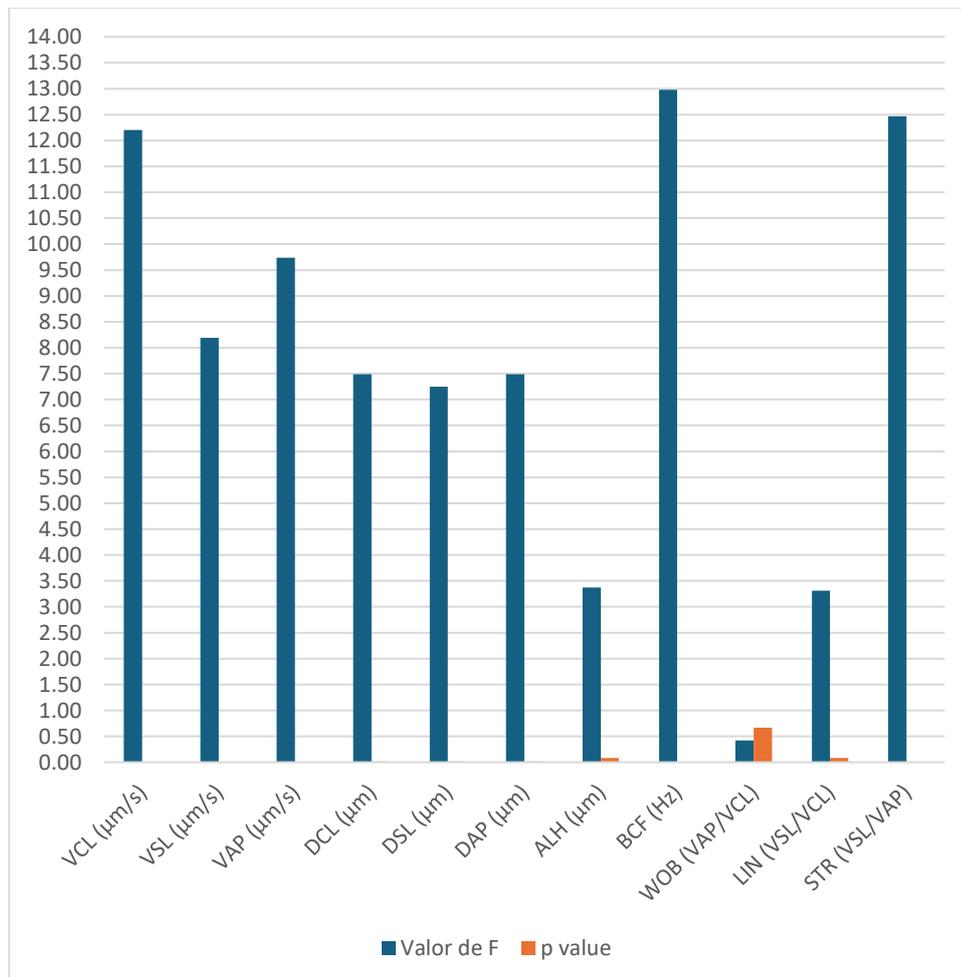
En la figura 3 observamos para motilidad total una diferencia significativa al comparar los tres dilutores siendo superior Andromed®, seguida por Tris y finalmente Bioxcell®; para Host observamos una superioridad por parte de Andromed® seguida por una similitud entre la respuesta de Tris y Bioxcell®; para el análisis de vitalidad observamos un mayor porcentaje de espermatozoides vivos cuando fueron procesados con el dilutor Tris seguida por Andromed® y finalmente el dilutor Bioxcell®. Resultados inferiores son reportados por Torres (2018) el método de colección fue por VA, con porcentajes de motilidad de 12.04

% para Tris – yema de huevo y con Leche descremada porcentaje de 11.32%; para vitalidad espermática con Tris-yema de huevo fue de 18.96% y con Leche descremada fue de 14.2%. Otros estudios de Banda et al. (2010) empleando diferentes dilutores como Tris, Tes y leche descremada para la criopreservación de espermatozoides de alpaca obtenidos por vagina artificial reportaron porcentajes de motilidad de 14.0, 8.6 y 17.0% respectivamente, para Host reportan 17.0, 19.1 y 17.9%; para vitalidad obtuvieron 32.6, 26.3 y 27.2%; resultados similares a lo reportado en el presente estudio probablemente a la acción que generan los dilutores similares como son el Tris y Tes. mientras que Garde et al. (2008) hallaron motilidad de solo 10% post-descongelación en llamas con un dilutor leche descremada-glucosa-gema. Las variaciones entre dilutores resaltan la importancia de incluir componentes que protejan la célula espermática del daño por congelación. Utilizando la electroeyaculación, Ordoñez (2015) en alpacas para la criopreservación en pellets usando el dilutor Andromed® y base tris obtuvieron 0% y 11.08% de motilidad respectivamente a la descongelación probablemente debido al tipo de colecta de semen debido a que la desventaja que posee la colección mediante electroeyaculación viene contaminada con orina que podría ser perjudicial para la posterior recuperación de los espermatozoides (Aisen et al., 2021). En líneas generales observamos una recuperación baja para Bioxcell® y de regular a buena para los dilutores Andromed® y Tris se debe a que posterior al proceso de congelación de los espermatozoides se genera cambios en la morfología espermática incluyendo daños en la mitocondria, acrosoma y cola del espermatozoide tal como señala (Mc Clure et al., 2002). Kumar et al. (2003) menciona que las membranas espermáticas ricas en ácidos grasos poliinsaturados son sensibles al daño inducido por la peroxidación lipídica y por lo tanto son sensibles al ataque de especies reactivas al oxígeno (ROS) que genera una disminución de la motilidad de los espermatozoides debido probablemente a la pérdida rápida de ATP intracelular que conduce a daños en el axonema, disminución de la viabilidad espermática.

#### 4.2.4 Evaluación de espermatozoides post criopreservación mediante equipo computarizado (casa)

**Figura 4**

*Características espermáticas post criopreservación/descongelaciones evaluadas mediante el sistema computarizado (CASA)*



La evaluación mediante CASA post-descongelación (Figura 4) mostró diferencias significativas en la mayoría de parámetros cinéticos, evidenciando valores superiores para Andromed®. Estudios en alpacas de Canorio et al. (2019) también hallaron diferencias en parámetros espermáticos post-descongelación según el dilutor, reportando mayor VCL, VSL y VAP para el dilutor tris-tes-yema. Asimismo, Santiani et al. (2005) encontraron valores superiores de VCL (106 vs 77 µm/s) y VSL (54 vs 41 µm/s) post-descongelación en alpacas usando tris-citrato-yema vs tris-leche. Los resultados confirman el impacto del dilutor sobre la preservación de la cinética espermática durante la criopreservación, en la mayoría de las características evaluadas mediante el sistema CASA son

significativas o diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ); mientras que las características que no muestran diferencias estadísticas son ALH, WOB y LIN ( $p > 0.05$ ). La diferencia observada en la mayoría de los parámetros evaluados coincide con lo determinado en laboratorio cuando se determinó la motilidad total teniendo valores superiores para el dilutor Andromed®, seguida por Tris y finalmente por Bioxcell®, todo ello debido a que estas características en su mayoría evalúan los tipos de velocidades que son correlacionadas con la motilidad obtenida a la descongelación de los espermatozoides procedentes del conducto deferente. Las características que son similares son ALH que es amplitud media o lateral del movimiento de la cabeza del espermatozoide, WOB que está relacionado con la proporción de velocidad promedio en trayectoria sobre la velocidad curvilínea expresada en porcentaje y LIN provee una relación entre la trayectoria recta recorrida y la trayectoria promedio del espermatozoide esta variable fue similar en los tratamientos esto se verifica al observar el STR alto para los tres dilutores utilizados. En tal sentido, todas las variables similares son proporciones mientras que aquellas que tienen diferencia estadística son aquellas relacionadas directamente con el tipo de movimiento que generan tras la recuperación post crioconservación de espermatozoides procedentes del conducto deferente en llamas. Las variables de VCL, VSL y VAP muestran ser superiores cuando se utilizó el dilutor Andromed® en comparación de Tris eso indica que los espermatozoides a la descongelación tuvieron mayores indicadores de velocidad (Andromed®) debido probablemente a que en sus componentes poseen lecitinas de soya a diferencia de la yema de huevo (en dilutor Tris), esta podría estar relacionado a la mayor proporción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que proporcionan mayor estabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide (Yeste 2016).

## CONCLUSIONES

- Los dilutores al momento de la colecta (37°C) muestran porcentajes de motilidad con mejor respuesta al Tris 64,71% y Andromed® 63.42%, Para Host Andromed® y Bioxell® con 61.9% y 58.8 % concomitantemente. Para Vitalidad logro mejor resultado Andromed® 67.94%.
- Durante la fase de equilibrio (5°C) se mantuvieron los valores de motilidad, Host y vitalidad tras ser sometidos a los tres dilutores, el Andromed fue quien tuvo mejores resultados, por ello se sugiere su uso para procesos de conservación a 5°C de espermatozoides procedentes del conducto deferente en llamas.
- La viabilidad espermática post crioconservación para motilidad los que obtuvieron mejores resultados fueron Andromed® y Tris 32.65% y 26.15%; para Host con mejor resultado fue Andromed® y Tris 31.91% y 23.20% respectivamente, por último para vitalidad respondió mejor el Tris con 38.73% y Andromed® 29.25%.
- Las características espermáticas evaluadas a la descongelación mediante el sistema computarizado que no mostraron estadística fueron ALH, WOB y LIN, la mayoría de los parámetros tiene diferencia estadística esto al tener una correlación con la motilidad y siendo superior el dilutor Andromed® en comparación a lo demás dilutores.



## RECOMENDACIONES

- Los dilutores Tris y Andromed® son las mejores opciones para la crioconservación de espermatozoides procedentes del conducto deferente en llamas para su uso posterior en diversas biotecnologías reproductivas.
- Utilizar los espermatozoides provenientes del conducto deferente en llamas para la producción de embriones *in vitro* debido a que podría ser una opción ya que estos gametos se encuentran libres de plasma seminal.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aisen, E. (2004). Inseminación artificial de ovejas y cabras. In *Reproducción Ovina y Caprina* (pp. 104–108). Editorial Inter-Médica.
- 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., y 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>
- Alarcón, V., García, W., y Walter, B. (2012). Inseminacion articial de alpacas con semen colectado por aspiracion vagina y vagina artificial. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(1), 58–64.
- Aller, F., Rebuff, G., Cancino, A., y Albeiro, R. (2003). Viabilidad y Fertilidad de Espermatozoides de Llama ( Lama Glama ). *Archivos de Zotecnia*, 52(197), 15–23.
- Antezana, D. washington calderon. (2019). “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*.
- Apaza, L. stephany. (2017). “Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero.” *Universidad Nacional del Altiplano*.
- Arizabal, J. C. (2019). “Efecto de tres niveles de congelamiento de espermatozoides del conducto Deferente en Alpacas (Vicugna pacos).” *Universidad Nacional del Altiplano de Puno*.
- Ávila-Portillo, M., Madero, L., López, J. I., León, C. F., Acosta, M., Gómez, L., Delgado, C. G., Gómez, L., Lozano, C. M., y Reguero, J. (2006). Fundamentos de Criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57, 291–300.
- Banda, J., Evangelista, S., Ruiz, L., Sandoval, R., Rodríguez Ll, C., Valdivia, M., y Santiani, A. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 21(2), 145–153.

- Bearden, J., y Fuquay, J. (1982). Reproducción Animal Aplicada. In *El manual moderno*.
- Bertuzzi, M. L., Torres, E. Y., Huanca, T., Neild, D., y 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. (2002). *The reproductive process of South American camelids*. Seagull Printing.
- Bravo, P. W., Ccallo, M., y Garnica, J. (2000). *The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas*. 38, 91–95.
- Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J., y Ordofiez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 48(97), 361–367.
- Bravo, P. W., y Johnson, L. W. (1994). Reproductive physiology of the male camelid. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 10(2). [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30560-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30560-0)
- Bravo, P. W., Moscoso, R., Alarcon, V., y Ordonez, C. (2002). Ejaculatory process and related semen characteristics. *Archives of Andrology*, 48(1). <https://doi.org/10.1080/014850102753385224>
- Buendía, P., Soler, C., Paolicchi, F., Gago, G., Urquieta, B., Pérez-Sánchez, F., y Bustos-Obregón, E. (2002). Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer-assisted system. *Theriogenology*, 57(4). [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00724-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00724-5)
- Bustillos, jose oswaldo gallardo, y Sandoval, cesar andres vargas. (2015). Evaluación de tres diluyentes para criopreservar semen bovino de toros cruce sahiwal (bos taurus) en el trópico húmedo.
- Bustinza, V. (2001). *La Alpaca* (Editorial Universitaria (ed.); Primera ed).

- Cabrera, M. ali P. (2018). Viabilidad in vitro de los espermatozoides de alpacas congelados/descongelados con dilutores a base de leche descremada (Issue 051). *Universidad Nacional del Altiplano Puno*.
- Canorio, M., Vilchez, B., Forno, F., Abreu, M., y Ordoñez, N. (2019). Biophysical and biochemical characteristics of seminal plasma proteins in alpaca. *Protein and Peptide Letters*, 26(5), 393-400.
- Carretero, M., Giuliano, S., Casaretto, C., Gambarotta, M., y Neild, D. (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *InVet*, 11(1), 55–63.
- Carretero, M. I., Lombardo, D., Arraztoa, C. C., Giuliano, S. M., Gambarotta, M. C., y Neild, D. M. (2012). Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Animal Reproduction Science*, 131(1–2), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.02.008>
- Casaretto, C., Lombardo, D. M., Giuliano, S., Gambarotta, M., Carretero, M. I., y Miragaya, M. H. (2011). Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head. *Andrologia*, 44(SUPPL.1), 424–430. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01200.x>
- Ccoiso, R. (2019). *Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de llama (Lama glama), por dos métodos de colección* [Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco]. <http://hdl.handle.net/20.500.12918/3790>
- Choez, K., Arriaga, I., Terreros, M., Condori, R., Arroyo, G., y Huanca, W. (2015). Características del semen de alpacas obtenido por electroeyaculación y su motilidad durante la refrigeración. *Spermova*, 5(1), 42–46. <https://doi.org/10.18548/aspect/0002.9>
- Córdova, A. (2008). Bienestar y Reproducción Animal. *Revista Electrónica de Veterinaria.*, IX(12).
- Cucho, H., Gallegos, M., Ccoiso, R., Meza, A., Ampuero, E., Ordóñez, C., y Valverde, A. (2021). Morphometry and subpopulation of llama (*Lama glama*) sperm using the ISAS® CASA-Morph system. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 32(1). <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V32I1.19506>

- Cusiyunca, P. E. (2017). Características morfométricas y morfológicas de la cabeza del espermatozoide de la llama (*Lama glama*) usando el Integrated Sperm Analysis Sistem (ISAS.). *Escuela Profesional de Zootecnia. Facultad de Ciencias Agrarias Univesidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco.*
- Damas Huaman, R. E. (2010). Evaluación de dos dilutores comerciales en semen congelado de toros en el Banco Nacional. *Universidad Nacional Del Centro Del Perú.*
- Dávalos, R., Olazabal, J., y Echevarría, L. (1999). Avances en la evaluacion de dos formas de coleccion de semen en alpacas. *Resúmenes II Congreso Mundial Sobre Camélidos*, 74.
- De Leeuw, F. E., Colenbrander, B., y Verkleij, A. J. (1991). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reproduction in Domestic Animals*, 1(9), 95–104.
- Delgado, P., y Quispe, Y. (2015). Efecto de tres niveles de glicerol y tiempos de equilibramiento sobre la viabilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*) post-descongelado. *Revista Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Investigation*, 17(3), 445. <https://doi.org/10.18271/ria.2015.169>
- Delhon, G., y von Lawzewitsch, I. (1994). Ductus epididymidis compartments and morphology of epididymal spermatozoa in llamas. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 23(3), 217–225. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1994.tb00470.x>
- Derivaux, J. (1982). Reproducción de los animales domésticos (2da ed.). Edit. Acribia Zaragoza-España.
- Deza, H. (2004). Conservación de Espermatozoides Obtenidos a través del Conducto deferente en Alpacas (*Vicugna pacos*) y Llama (*Lama glama*) y su Posterior Viabilidad. *Universidad Nacional del Altiplano.*
- Director, A., Giuliano, S., Trasorras, V., Carretero, I., Pinto, M., y Miragaya, M. (2007). Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research*, 14(2).
- Fernández-Baca, S. (1991). Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago de Chile : Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. <https://bibliotecadigital.uchile.cl/discovery/fulldisplay?docid=alma99100264925970>

3936&context=L&vid=56UDC\_INST:56UDC\_INST&lang=es&adaptor=Local  
Search Engine&tab=Everything&query=title,exact,Avances en  
investigación,AND&mode=advanced

- Fernández-Baca, S., Novoa, C., y Sumar, J. (1972). Actividad reproductiva en la alpaca mantenida en separación del macho. *Asociación Latinoamericana de Producción Animal (A.L.P.A.)*, 7: 7-18.
- Fernandez, B. S., y Novoa, C. (1968). Primer ensayo de inseminación Artificial en Alpacas (Lama pacos) con semen de Vicuña (vicugna vicugna). *Revista Mededica Veterinaria UNMSM-Perú*, 22, 9–17.
- Fowler, M. E. (1999). Medicine and Surgery of South American Camelids: Llama, Alpaca, Vicuña, Guanaco,. *The Canadian Veterinary Journal*, 2nd ed, 40(6), 428. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539733/>
- Franco, J., Sumar, J., y Valera, M. (1981). Eyaculación en la alpaca (lama pacos). In IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos (Ed.), *Corporación Nacional Forestal*.
- Fumuso, F., Giuliano, S. M., Miragaya, M., y Carretero, M. I. (2010). Simplificación de la técnica de dispersión de la cromatina espermática para evaluar el estado de fragmentación de ADN en espermatozoides de llama (Lama glama). *Cátedra de Teriogenología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA, February 2017*. [https://www.researchgate.net/publication/313479528\\_Simplificacion\\_de\\_la\\_tecnica\\_de\\_dispersion\\_de\\_la\\_cromatina\\_espermatologica\\_para\\_evaluar\\_el\\_estado\\_de\\_fragmentacion\\_de\\_ADN\\_en\\_espermatozoides\\_de\\_llama\\_Lama\\_glama](https://www.researchgate.net/publication/313479528_Simplificacion_de_la_tecnica_de_dispersion_de_la_cromatina_espermatologica_para_evaluar_el_estado_de_fragmentacion_de_ADN_en_espermatozoides_de_llama_Lama_glama)
- Galindo, M. (1995). *Efecto de las Eyaculaciones Sucesivas Sobre las Características del Semen de la Alpaca*. Universidad Nacional del Altiplano Puno-Perú.
- Garcia, W., Maxi, E., Macedo, V., Ampuero, E., y Malaga, J. (2021). Cryopreservation of alpaca spermatozoa obtained via post copula in a tris extender with egg yolk from three avian species. *SPERMOVA*, 11(1), 11–16. <https://doi.org/10.18548/aspe/0009.02>
- Garde, J., Madrigal, M., Pérez, L., Fernández, M., Maroto, A., y Montoro, V. (2008). Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in alpaca. *59th Annual Meeting of the Canadian Society of Animal Science*.

- Garnica, J., Achata, R., y Bravo, P. W. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*, 32(1–2), 85–90. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90059-Z](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90059-Z)
- Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M., y Miragaya, M. (2010). Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science*, 118(1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.005>
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., y 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., Santa Cruz, R., Arraztoa, C., Fumuso, F. G., Bertuzzi, M., y Carretero M, M. I. (2019). Sperm selection in cooled llama semen with egg yolk extender. *Spermova*, 9(1), 35–41. <https://doi.org/10.18548/aspe/0007.05>
- 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., y 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. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2019.5257>
- González, V. E. (2004). Effect of bulbourethrectomy and collection frequency on macro- and microscopic characteristics of llama (*Lama glama*) ejaculate [Univeersidad Católica Boliviana San Pablo - Brigham Young University ProQuest Dissertations Publishing]. <https://scholarsarchive.byu.edu/etd/5371>
- Guerra, M., Fornés, M., Kaabi, M., Abecia, J. A., Marini, P., y Anel, L. (2013). Effects of dilution, seminal plasma and incubation period on sperm motility in thawed llama semen. *Small Ruminant Research*, 109(1), 17–21.
- Guillén Palomino, C. Y., Fumuso, F. G., Bertuzzi, M. L., Giuliano, S. M., Velásquez González, N., Bariani, M. V., y Carretero, M. I. (2021). Use of Androcoll-ETM to Separate Frozen-Thawed Llama Sperm From Seminal Plasma and Diluent. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.594926>

- Hafez, E. S. E. (2002). *Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales (7ª ED.)*. McGraw-Hill / Interamericana.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., y Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Journal of Andrology*, *11*(1), 73–88. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>
- INEI. (2013). *Resultados definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario*.
- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., y 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. *Reproduction*, *70*(1), 219–228.
- Jhonson, L. (1989). Llama reproduction, en: Llama medicine. The veterinary clinics of north america. *Food Animal Practice*, *5*(1), 159–182.
- Jorge Banda, R., Shirley Evangelista, V., Luis Ruiz, G., Rocío Sandoval, M., Claudia Rodríguez, L., Martha Valdivia, C., y Alexei Santiani, A. (2010). Effect of extenders based on tris, tes and skim milk on cryopreservation of epididymalalpaca sperm. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, *20*(1), 145–153.
- Kershaw-Young, C. M., y Maxwell, W. (2012a). Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reproduction in Domestic Animals*, *47*(SUPPL.4). <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02100.x>
- Kershaw-Young, C. M., y Maxwell, W. M. (2012b). Advancing artificial insemination in camelids, particularly the alpacas. RIRDC Publication No. 12/016.
- Kubicek, J. (1974). Semen collection in alpaca with an urethral fistula. *Zeitschrift Fuer Tierzuechtung Und Zuechtungsbiologie (Germany, FR)*.
- Kulaksız, R., Akc, E., y Das, A. (2010). The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *88*, 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.014>
- Kumar, S., Millar, J. D., y 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)
- Lichtenwalner, A. B., Woods, G. L., y Weber, J. A. (1996a). Ejaculatory pattern of llamas during copulation. *Theriogenology*, 46(2), 285–291. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00185-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00185-9)
- Lichtenwalner, A. B., Woods, G. L., y Weber, J. A. (1996b). Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology*, 46(2), 293–305. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00186-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00186-0)
- Malo, C., Crichton, E. G., Morrell, J. M., Pukazhenth, B. S., Johannisson, A., Splan, R., y Skidmore, J. A. (2018). Colloid centrifugation of fresh semen improves post-thaw quality of cryopreserved dromedary camel spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 192(2010), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.005>
- Mamani-Mango, G., Gonzales, M. M., Hidalgo, M. R., Mallma, J. M., Béjar, J. R., Palma, V. R., y Salas, E. M. (2019). Effect of Extender and Freezing Rate on Quality Parameters and in Vitro Fertilization Capacity of Alpaca Spermatozoa Recovered from Cauda Epididymis. *Biopreservation and Biobanking*, 17(1), 39–45. <https://doi.org/10.1089/bio.2018.0021>
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., y Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, February 1921, 1–4.
- Melling, M., y Alder, M. (2000). *Práctica ovina y caprina*. Intermedica.
- Mendoza, G., Castro, A., Lupidio, M., Domínguez, M., Gómez, S., y Ghezzi, M. (2012). Caracterización macroscópica y microscópica de las glándulas anexas del aparato reproductor masculino de la llama (*Lama glama*). *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(1), 27–42. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i1.879>
- Montalvo, C., Cevallos, E., y Copaira, M. (1979). *Estudio microscópico del parenquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año*. Universidad Nacional Mayor San Marcos.
- Montoya, A. isabel toro. (2009). Espermograma. *Medicina & Laboratorio*, 15(3–4), 145–170.

- Morrell, J. M., y Abraham, M. C. (2020). Semen Handling in South American Camelids: State of the Art. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(November), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.586858>
- Morton, K. M., y Maxwell, W. M. C. (2006). The continued development of artificial insemination technologies in alpacas. *Accelerating the World's Research.*, 9.
- Novoa, C., y Leyva, V. (1996). Reproducción en alpacas y llamas. *Publ. Cient. IVITA*, 26, 1–2.
- Núñez, C., Tezón, J., Urbano, C., Orihuela, A. y Cortez, P. (2009). Effect of seminal plasma on the cryopreservation of alpaca semen. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 3(1), 26–30.
- Ordoñez, C. (2015). Evaluación de tres dilutores en la criopreservación de semen de alpaca (Vicugna pacos) en pelets. *SPERMOVA*, 5(1), 119–123. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.27>
- Ordoñez, C., Cucho, H., Ampuero, E., Antezana, W., y Cayo, S. (2013). Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Fresco, Refrigerado y Descongelado Colectado por Electroeyaculación. *Spermova*, 3(1).
- Osorio, E., y San Martin, M. (1966). Aspecto histológico del epididimo, conducto deferente y glándulas sexuales accesorias del aparato reproductor masculino de la alpaca (Lama glama pacos). *Archivos Instituto Biología Andina*, 1: 128-141.
- Pacheco Curie, J. I. (2008). Métodos de de semen en camélidos sudamericanos - Methods of semen collection in south american camelids. *Revista Electrónica de Veterinaria*, IX(4), 1–15. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040806.pdf>
- Paricahua, E. (2001). Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. *Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.*
- Perez, G., Zeballos, J., y Perez, H. (2014). Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru. SUPERNOVA*, 23(2), 294–302.

- Quintano, J. (2002). *Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (lama pacos) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores*. Universidad Nacional del Altiplano.
- Quispe, C., y Delgado, P. (2012). Desarrollo de tres protocolos de colección de semen en llamas (lama glama). *Resumen VI Congreso Mundial de Camelidos Sudamericanos*, 157.
- Quispe, F. (1987). Evaluación de Las Características Físicas del semen de la Alpaca (Lama pacos) Durante la Época de Empadre. *Univesidad Nacional del Altiplano*.
- Ramírez Rojas, A. A. (2019). Evaluación de tres tratamientos de semen sobre la filancia, motilidad y vitalidad espermática en alpacas (Vicugna pacos) a 2736 m.s.n.m. - Ayacucho 2017. In *repositorio de tesis digital - unsch. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga*.
- Raymundo, T., Wilfredo Huanca, L., Teodosio Huanca, M., Sandra Huerta, O., y Aída Cordero, R. (2006). Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 17(2), 125–130. <https://doi.org/10.15381/rivep.v17i2.1524>
- Rodríguez, A. Á., Santos, J. A. G., Ibarra, A. K. V., y Barragán, J. A. H. (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro. In *Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco* (1st ed., Vol. 1).
- Rodríguez, C. M. (2013). Índice de Fragmentación del ADN Espermático y Test de HOS en semen de llamas (Lama glama) utilizando el Integrated Sperm Analysis. *Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco*.
- Rodríguez, T. (1982). Epocas de reproducción en llamas. *Seminario Reproducción de Camélidos. Instituto Nacional de Fomento Lanero (INFOL). Ministerio de Asuntos Campesinos y Agropecuarios, La Paz, Bolivia*, 62–68.
- Rojas, E. C. (2014). Evaluación espermática en sementales de la raza (brown swiss) americano adaptados a condiciones medioambientales de cajamarca. *Universidad nacional de cajamarca*.
- Salisbury, G. W. (1982). Fisiología de la Reproducción Animal. *España: Edit. ACRIBIA*.

- San-Martin, M., Copaira, M., Zuniga, J., Rodreguez, R., y Bustinza, G. (1967). Aspects of reproduction in the alpaca. *Society for Reproduction and Fertility*, 16(3), 395–399. <https://doi.org/doi.org/10.1530/jrf.0.0160395>
- Santiani, A., Huanca, W., Sapana, R., Huanca, T., Sepúlveda, N., y Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology*, 7(3), 303–309. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x>
- Santiani Acosta, A., Evangelista Vargas, S., Valdivia Cuya, M., Risopatrón González, J., y Sánchez Gutiérrez, R. (2013). Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology*, 79(5), 842–846. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.12.012>
- Stuart, C. C., Vaughan, J. L., Kershaw, C. M., de Graaf, S. P., y 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). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49203-z>
- Sumar, J. (1985). Reproductive Physiology in South American Camelids. *Veterinary Institute for Tropical and High Altitude Research*.
- Sumar, J., y Leyva, V. (1981). Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). *Memorias Del IV Convención Internacional Sobre Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas. Chile*.
- Tapia, P. A. (2015). *Evaluación de la morfometría testicular y la concentración espermática por edad (2-4 y de 4-6 años) en llamas (lama glama) en el barrio igshagua, parroquia Juan Montalvo, Latacunga- Ecuador [Universidad Tecnica de Cotopaxi]*. <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2861>
- Tibary, A. (2017). Theriogenology Monitoring and controlling follicular activity in camelids. *Theriogenology*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.011>
- Torres, E. A. (2018). Comparación de dos tipos de dilutores (tris - yema de huevo y leche descremada) en la sobrevivencia espermática post – descongelamiento de semen de

alpaca (vicugna pacos) de la raza huacaya en la zona costa de tacna. *universidad nacional jorge basadre grohmann-tacna*.

Valle, E. (2013). *Evaluacion de dos tecnicas de coleccion de semen en llamas (lama glama) en la estacion experimental de choquenaira* [Universidad Mayor de San Andres]. <https://repositorio.umsa.bo/handle/123456789/4259>

Vaughan, J. (2003). *Artificial insemination in alpacas (Lama pacos)* (Issue 03).

Von Baer, L., y Hellemann, C. (1998). Variables seminales en llama (Lama glama). *Archivos de Medicina Veterinaria*, 30(2), 171–176. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X1998000200019>

Wheeler, J. (1984). La domesticación de la alpaca (Lama pacos) y la llama (Lama glama) y el desarrollo temprano de la ganadería autóctona en los Andes Centrales. (pp. 74–84). Boletín de Lima.

Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., y Yeste, M. (2021). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, December, 106904. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>

Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47–64. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.047>

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistencia

**PRODUCCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PROCEDENTE DEL CONDUCTO DEFERENTE: COLECCIÓN, CONSERVACIÓN  
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN LLAMAS (Lama glama)**

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADORES	CATEGORÍA
<p><b>Problema general</b></p> <p>•¿Cuál es el efecto de diferentes dilutores sobre la producción de espermatozoides del conducto deferente en llamas durante la colección, conservación y evaluación de la calidad espermática?</p> <p><b>Problemas específicos</b></p> <p>•¿Cómo afectan los diferentes dilutores a la criopreservación de espermatozoides del conducto deferente en llamas?</p> <p>•¿Cómo varía la calidad espermática (vitalidad, test hiposmótico y motilidad) de los espermatozoides del conducto deferente en llamas durante la colección, refrigeración y descongelación?</p> <p>•¿Qué diferencias existen en las características espermáticas post descongelación utilizando el sistema CASA en espermatozoides del conducto deferente en llamas tratadas con diferentes dilutores?</p>	<p><b>Objetivo general</b></p> <p>•Evaluar el efecto de dilutores sobre la producción de espermatozoides procedentes del conducto deferente durante la colección, conservación y evaluación de la calidad espermática en llamas (Lama glama).</p> <p><b>Objetivos específicos</b></p> <p>•Evaluar la acción de dilutores para la criopreservación de espermatozoides del conducto deferente en llamas</p> <p>•Evaluar la calidad espermática (Vitalidad, Test hiposmótico y Motilidad) de los espermatozoides del conducto deferente y descongelación en llamas</p> <p>•Comparar las características espermáticas post descongelación mediante el sistema CASA de espermatozoides procedentes del conducto deferente en llamas</p>	<p><b>Hipótesis general</b></p> <p>•Existe variaciones de la calidad espermática pre y post criopreservación frente a los efectos de los dilutores en llamas (Lama glama).</p> <p><b>Hipótesis específicas</b></p> <p>•La criopreservación de espermatozoides del conducto deferente en llamas se ve afectada por la elección del dilutor utilizado.</p> <p>•La calidad espermática (vitalidad, test hiposmótico y motilidad) de los espermatozoides del conducto deferente en llamas varía durante las etapas de colección, refrigeración y descongelación en función del dilutor empleado.</p> <p>•Las características espermáticas post descongelación, evaluadas mediante el sistema CASA difieren entre los espermatozoides del conducto deferente en llamas tratadas con diferentes dilutores.</p>	<p>Motilidad</p> <p>Motilidad progresiva</p> <p>Motilidad progresiva</p> <p>Motilidad individual</p> <p>vitalidad</p> <p>Porcentaje vivos</p> <p>Porcentaje de muertos</p> <p>Vivos o Muertos</p> <p>Test hiposmotico</p> <p>Test</p> <p>Presión osmótica del espermatozoide</p> <p>Vivos o Muertos</p>	<p>Motilidad</p> <p>progresiva</p> <p>Motilidad individual</p> <p>Porcentaje vivos</p> <p>Porcentaje de muertos</p> <p>Porcentaje vivos</p> <p>Presión osmótica del espermatozoide</p> <p>Presión osmótica del espermatozoide</p>	<p>Buena Mala</p> <p>Vivos o Muertos</p> <p>Vivos o Muertos</p> <p>Presión osmótica del espermatozoide</p> <p>Presión osmótica del espermatozoide</p>	<p>La capacidad de movilidad progresiva a medida que el espermatozoide madura</p> <p>Las tinciones permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos, así la cabeza de los espermatozoides muertos tiene la propiedad de dejar pasar los colorantes por perturbación de la membrana celular</p> <p>Está basado en la presión osmótica del espermatozoide</p>

## Anexo 2. Anexos estadísticos

Descriptores	Tratamiento	Motilidad_total	Motilidad_progresiva	Motilidad_oscilatoria	Motilidad_circular	Acrosoma_integro	Vivos	Host_po
N	T1	8	8	8	8	8	8	8
	T2	8	8	8	8	8	8	8
	T3	8	8	8	8	8	8	8
Missing	T1	0	0	0	0	0	0	0
	T2	0	0	0	0	0	0	0
	T3	0	0	0	0	0	0	0
Mean	T1	64.11	21.20	35.02	7.88	82.26	59.85	59.85
	T2	63.62	21.99	36.04	5.59	86.26	67.49	67.49
	T3	37.92	19.33	15.57	3.02	92.83	55.78	55.78
Std. error mean	T1	1.86	1.66	1.09	0.98	1.36	0.79	0.79
	T2	1.59	1.24	1.61	0.64	2.69	2.43	2.43
	T3	0.58	0.92	0.72	0.24	0.67	1.02	1.02
Median	T1	63.33	19.15	34.70	6.69	81.16	59.51	59.51
	T2	61.67	22.07	34.81	5.32	89.93	64.46	64.46
	T3	37.12	19.52	15.85	2.92	93.13	55.09	55.09
Standard deviation	T1	5.25	4.71	3.09	2.78	3.85	2.23	2.23
	T2	4.51	3.52	4.54	1.80	7.60	6.88	6.88
	T3	1.65	2.60	2.05	0.68	1.88	2.87	2.87
Minimum	T1	57.23	15.46	31.30	5.62	77.50	57.20	57.20
	T2	59.06	17.00	30.82	3.43	76.05	60.37	60.37
	T3	36.10	15.77	12.47	2.00	88.45	52.35	52.35
Maximum	T1	72.36	28.45	38.75	12.60	88.12	62.96	62.96

Descriptores										
Tratamiento	Motilidad_total	Motilidad_progresiva	Motilidad_oscilatoria	Motilidad_circular	Acrosoma_integro	Vivos	Host_po			
T2	71.69	28.45	45.20	8.43	95.05	78.47				
T3	40.27	23.53	18.33	4.06	94.48	59.40				
Shapiro-Wilk W	0.90	0.89	0.88	0.81	0.89	0.91				
T2	0.82	0.97	0.90	0.93	0.84	0.83				
T3	0.83	0.97	0.95	0.98	0.73	0.88				
Shapiro-Wilk p	0.2813	0.2139	0.1845	0.0326	0.2478	0.3650				
T2	0.0474	0.8954	0.3087	0.5298	0.0686	0.0585				
T3	0.0629	0.9297	0.7244	0.9784	0.0054	0.1900				
Descriptores										
Tratamiento	Motilidad_total	Motilidad_progresiva	Motilidad_oscilatoria	Motilidad_circular	Acrosoma_integro	Vivos	Host_positivo			
N	T1 36	36	36	36	36	36	36			
	T2 36	36	36	36	36	36	36			
	T3 36	36	36	36	36	36	36			
Missing	T1 0	0	0	0	0	0	0			
	T2 0	0	0	0	0	0	0			
	T3 0	0	0	0	0	0	0			
Mean	T1 53.99	17.96	29.32	6.7	81.42	55.63	39.09			
	T2 56.49	16.13	32.71	7.6	85.90	62.57	57.08			
	T3 33.19	15.29	15.75	2.1	90.73	51.42	48.46			
Std. error mean	T1 2.96	1.29	1.08	1.5	0.90	2.19	2.21			
	T2 0.75	0.55	0.54	0.9	1.72	1.95	1.26			
	T3 1.14	0.71	0.93	0.2	0.76	0.84	0.95			

<b>Median</b>	T1	52.35	16.63	30.10	4.4	81.22	57.93	40.91
	T2	56.73	16.84	32.59	8.0	87.68	60.23	59.28
	T3	32.59	15.93	15.77	1.8	90.71	51.59	48.54
<b>Standard deviation</b>	T1	8.38	3.65	3.07	4.45	2.55	6.19	6.24
	T2	2.12	1.55	1.52	2.64	4.87	5.53	3.58
	T3	3.21	2.01	2.63	0.77	2.15	2.36	2.68
<b>Minimum</b>	T1	42.99	13.11	22.58	3.42	78.11	41.58	30.49
	T2	52.97	13.40	30.92	2.97	74.57	57.62	51.50
	T3	30.03	12.29	10.86	1.48	86.82	48.18	44.31
<b>Maximum</b>	T1	66.99	23.84	32.62	15.05	85.64	60.35	46.93
	T2	59.17	17.39	35.59	10.68	89.04	71.85	60.38
	T3	39.32	18.14	18.94	3.79	94.65	54.41	53.68
<b>Shapiro-Wilk W</b>	T1	0.87	0.93	0.84	0.78	0.97	0.76	0.91
	T2	0.96	0.83	0.89	0.91	0.69	0.75	0.79
	T3	0.89	0.94	0.95	0.83	0.89	0.89	0.93
<b>Shapiro-Wilk p</b>	T1	0.1654	0.5314	0.0825	0.0156	0.8567	0.0105	0.3521
	T2	0.8296	0.0552	0.2201	0.3422	0.0016	0.0085	0.0237
	T3	0.2593	0.5850	0.7491	0.0555	0.2543	0.2192	0.5608

Descriptores

	Tratamiento	Motilidad total (2)	Host_positivo (2)	Vivos (2)	Acrosoma_integro (2)
<b>N</b>	T1	28	28	28	28
	T2	47	47	47	47
	T3	40	40	40	40
<b>Missing</b>	T1	0	0	0	0
	T2	0	0	0	0
	T3	0	0	0	0
<b>Mean</b>	T1	26.15	23.20	38.73	88.06
	T2	32.65	31.91	29.25	87.05
	T3	10.07	17.46	10.80	79.30
<b>Std. error mean</b>	T1	1.04	2.50	0.97	0.80
	T2	0.53	1.35	0.38	0.50
	T3	0.29	0.82	0.24	0.65
<b>Median</b>	T1	25.21	20.59	39.65	88.03
	T2	32.34	30.95	29.64	87.29
	T3	9.79	16.34	10.43	79.34

<b>Standard deviation</b>	T1	5.49	13.25	5.12	4.22
	T2	3.66	9.28	2.62	3.43
	T3	1.83	5.19	1.50	4.12
<b>Minimum</b>	T1	17.11	10.26	30.10	77.90
	T2	25.62	25.36	21.44	78.28
	T3	6.73	10.14	8.77	70.65
<b>Maximum</b>	T1	38.57	84.47	47.55	99.00
	T2	40.92	92.57	32.58	93.93
	T3	14.50	37.38	14.80	98.00
<b>Shapiro-Wilk W</b>	T1	0.94	0.55	0.94	0.94
	T2	0.96	0.31	0.92	0.98
	T3	0.97	0.71	0.93	0.79
<b>Shapiro-Wilk p</b>	T1	0.0896	< .0001	0.1199	0.0953
	T2	0.1618	< .0001	0.0041	0.7960
	T3	0.2547	< .0001	0.0194	< .0001

## Resultados

### One-Way ANOVA

One-Way ANOVA (Welch's)				
	F	df1	df2	p
VCL	12.20	2	9.35	0.0025

### Descriptores por Grupo

	TRATAMIENTO	N	Mean	SD	SE
VCL	ANDROMD	6	25.33	4.76	1.94
	BIOXELL	6	15.33	3.83	1.56
	TRIS	6	14.17	2.56	1.05

### Comprobación de supuestos

Pruebas de homogeneidad de varianzas					
		Statistic	df	df2	p
VCL	Levene's	1.14	2	15	0.3447
	Bartlett's	1.66	2		0.4361

Note. Additional results provided by *moretests*

### Pruebas de normalidad

		statistic	p
VCL	Shapiro-Wilk	0.97	0.7215
	Kolmogorov-Smirnov	0.13	0.9225
	Anderson-Darling	0.26	0.6704

Note. Additional results provided by *moretests*

### Prueba post hoc de Tukey – VCL

		ANDROMED	BIOXELL	TRIS
ANDROMED	Mean difference	—	10.00	11.17
	p-value	—	0.0011	0.0004
BIOXELL	Mean difference		—	1.17
	p-value		—	0.8588
TRIS	Mean difference			—
	p-value			—

Descriptores

	TRATAMIENTO	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	DCL	WOB	HAC	BCF	ALH	DAP	DSL
<b>N</b>	ANDROMED	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	BIOXELL	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	TRIS	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
<b>Missing</b>	ANDROMED	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	BIOXELL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TRIS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Mean</b>	ANDROMED	25.33	12.90	17.17	0.51	0.75	8.40	0.68	0.05	2.02	0.32	4.45	2.33
	BIOXELL	15.33	9.03	10.50	0.59	0.86	4.67	0.69	0.04	0.57	0.18	2.30	1.60
	TRIS	14.17	7.57	10.00	0.54	0.77	4.73	0.70	0.04	0.82	0.22	2.77	1.55
<b>Median</b>	ANDROMED	26.00	14.00	17.50	0.48	0.75	8.60	0.66	0.06	1.85	0.35	4.40	2.40
	BIOXELL	15.50	8.90	10.30	0.60	0.86	4.80	0.69	0.04	0.55	0.20	2.25	1.60
	TRIS	14.00	7.35	10.30	0.54	0.77	4.75	0.70	0.04	0.80	0.20	2.75	1.50
<b>Standard deviation</b>	ANDROMED	4.76	2.65	3.37	0.10	0.08	2.14	0.06	0.01	0.60	0.10	1.12	0.39
	BIOXELL	3.83	2.21	2.66	0.04	0.02	1.24	0.04	0.01	0.31	0.08	0.70	0.47
	TRIS	2.56	1.65	2.11	0.05	0.05	0.85	0.04	0.01	0.28	0.04	0.52	0.33
<b>Minimum</b>	ANDROMED	18	8.40	11.00	0.40	0.65	5.90	0.62	0.04	1.50	0.20	3.20	1.80
	BIOXELL	11	6.40	7.40	0.53	0.84	3.00	0.62	0.02	0.20	0.10	1.40	1.00
	TRIS	11	5.30	7.20	0.47	0.70	3.60	0.66	0.04	0.50	0.20	2.10	1.10
<b>Maximum</b>	ANDROMED	31	15.00	21.00	0.67	0.87	11.00	0.77	0.06	2.80	0.40	6.00	2.80
	BIOXELL	20	12.00	14.00	0.64	0.89	6.00	0.74	0.05	1.00	0.30	3.40	2.40
	TRIS	18	10.00	13.00	0.60	0.83	5.70	0.75	0.05	1.10	0.30	3.50	2.10

### One-Way ANOVA

One-Way ANOVA (Welch's)				
	F	df1	df2	p
<b>VCL</b>	12.20	2	9.35	0.0025
<b>VSL</b>	8.19	2	9.62	0.0084
<b>VAP</b>	9.74	2	9.67	0.0048
<b>DCL</b>	7.49	2	9.06	0.0120
<b>DSL</b>	7.25	2	9.82	0.0117
<b>DAP</b>	7.49	2	9.31	0.0115
<b>ALH</b>	3.37	2	8.78	0.0821
<b>BCF</b>	12.98	2	9.42	0.0020
<b>HAC</b>	3.10	2	9.11	0.0940
<b>WOB</b>	0.42	2	9.68	0.6658
<b>LIN</b>	3.31	2	9.17	0.0830
<b>STR</b>	12.47	2	7.55	0.0041

### Comprobaciones de supuestos

Pruebas de homogeneidad de varianzas					
		Statistic	df	df2	p
<b>VCL</b>	Levene's	1.14	2	15	0.3447
	Bartlett's	1.66	2		0.4361
<b>VSL</b>	Levene's	1.02	2	15	0.3833
	Bartlett's	1.00	2		0.6076
<b>VAP</b>	Levene's	0.18	2	15	0.8364
	Bartlett's	0.99	2		0.6084
<b>DCL</b>	Levene's	9.18	2	15	0.0025
	Bartlett's	3.88	2		0.1436
<b>DSL</b>	Levene's	0.26	2	15	0.7739
	Bartlett's	0.53	2		0.7657
<b>DAP</b>	Levene's	3.47	2	15	0.0576
	Bartlett's	2.77	2		0.2499
<b>ALH</b>	Levene's	3.44	2	15	0.0589
	Bartlett's	3.17	2		0.2053
<b>BCF</b>	Levene's	7.53	2	15	0.0054
	Bartlett's	3.31	2		0.1908
<b>HAC</b>	Levene's	1.21	2	15	0.3254
	Bartlett's	1.93	2		0.3818
<b>WOB</b>	Levene's	1.01	2	15	0.3882
	Bartlett's	1.14	2		0.5649
<b>LIN</b>	Levene's	3.01	2	15	0.0799
	Bartlett's	4.20	2		0.1222
<b>STR</b>	Levene's	4.56	2	15	0.0284
	Bartlett's	8.50	2		0.0143

Note. Additional results provided by *moretests*

Pruebas de normalidad			
		statistic	p
<b>VCL</b>	Shapiro-Wilk	0.97	0.7215
	Kolmogorov-Smirnov	0.13	0.9225
	Anderson-Darling	0.26	0.6704
<b>VSL</b>	Shapiro-Wilk	0.95	0.4548
	Kolmogorov-Smirnov	0.15	0.8349
	Anderson-Darling	0.34	0.4588
<b>VAP</b>	Shapiro-Wilk	0.96	0.6870
	Kolmogorov-Smirnov	0.11	0.9882
	Anderson-Darling	0.21	0.8229
<b>DCL</b>	Shapiro-Wilk	0.97	0.7143
	Kolmogorov-Smirnov	0.14	0.8148
	Anderson-Darling	0.31	0.5248
<b>DSL</b>	Shapiro-Wilk	0.98	0.9192
	Kolmogorov-Smirnov	0.11	0.9794
	Anderson-Darling	0.16	0.9290
<b>DAP</b>	Shapiro-Wilk	0.98	0.9764
	Kolmogorov-Smirnov	0.08	0.9992
	Anderson-Darling	0.12	0.9839
<b>ALH</b>	Shapiro-Wilk	0.92	0.1301
	Kolmogorov-Smirnov	0.18	0.5716
	Anderson-Darling	0.63	0.0868
<b>BCF</b>	Shapiro-Wilk	0.94	0.2434
	Kolmogorov-Smirnov	0.16	0.7255
	Anderson-Darling	0.45	0.2495
<b>HAC</b>	Shapiro-Wilk	0.94	0.3304
	Kolmogorov-Smirnov	0.21	0.3944
	Anderson-Darling	0.49	0.1903
<b>WOB</b>	Shapiro-Wilk	0.97	0.7376
	Kolmogorov-Smirnov	0.13	0.9009
	Anderson-Darling	0.24	0.7543
<b>LIN</b>	Shapiro-Wilk	0.96	0.6928
	Kolmogorov-Smirnov	0.10	0.9828
	Anderson-Darling	0.23	0.7888
<b>STR</b>	Shapiro-Wilk	0.98	0.9623
	Kolmogorov-Smirnov	0.09	0.9984
	Anderson-Darling	0.16	0.9328

Note. Additional results provided by *moretests*

### Pruebas post hoc

Prueba post hoc de Tukey – VCL				
		ANDROMED	BIOXELL	TRIS
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	10.00	11.17
	p-value	—	0.0011	0.0004
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	1.17
	p-value		—	0.8588

<b>TRIS</b>	Mean difference	—
	p-value	—

Prueba post hoc de Tukey – VSL

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	3.87	5.33
	p-value	—	0.0216	0.0022
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	1.47
	p-value		—	0.4996
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

Prueba post hoc de Tukey – VAP

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	6.67	7.17
	p-value	—	0.0022	0.0012
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	0.50
	p-value		—	0.9475
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

Prueba post hoc de Tukey – DCL

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	3.73	3.67
	p-value	—	0.0018	0.0021
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	-0.07
	p-value		—	0.9968
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

Prueba post hoc de Tukey – DSL

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	0.73	0.78
	p-value	—	0.0169	0.0110
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	0.05
	p-value		—	0.9748
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

Prueba post hoc de Tukey – DAP

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	2.15	1.68

	p-value	—	0.0011	0.0076
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	-0.47
	p-value		—	0.5968
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

Prueba post hoc de Tukey – ALH

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	0.13	0.10
	p-value	—	0.0201	0.0865
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	-0.03
	p-value		—	0.7283
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

Prueba post hoc de Tukey – BCF

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	1.45	1.20
	p-value	—	<.0001	0.0005
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	-0.25
	p-value		—	0.5723
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

Prueba post hoc de Tukey – HAC

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	0.01	0.01
	p-value	—	0.0256	0.4118
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	-0.01
	p-value		—	0.2614
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

Prueba post hoc de Tukey – WOB

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	-0.01	-0.03
	p-value	—	0.9294	0.6403
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	-0.02
	p-value		—	0.8490
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—



---

Prueba post hoc de Tukey – LIN

---

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	-0.09	-0.03
	p-value	—	0.1075	0.7600
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	0.06
	p-value		—	0.3339
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

---

---

Prueba post hoc de Tukey – STR

---

		<b>ANDROMED</b>	<b>BIOXELL</b>	<b>TRIS</b>
<b>ANDROMED</b>	Mean difference	—	-0.12	-0.02
	p-value	—	0.0091	0.8253
<b>BIOXELL</b>	Mean difference		—	0.10
	p-value		—	0.0296
<b>TRIS</b>	Mean difference			—
	p-value			—

---

### Anexo 3. Anexos Fotográficos



Llamas macho donadores 2 -3 años



Baño de maría a 37°C, acondicionado en un termo donde se colocaron tubos de ensayo con dilutor y jeringas de colección



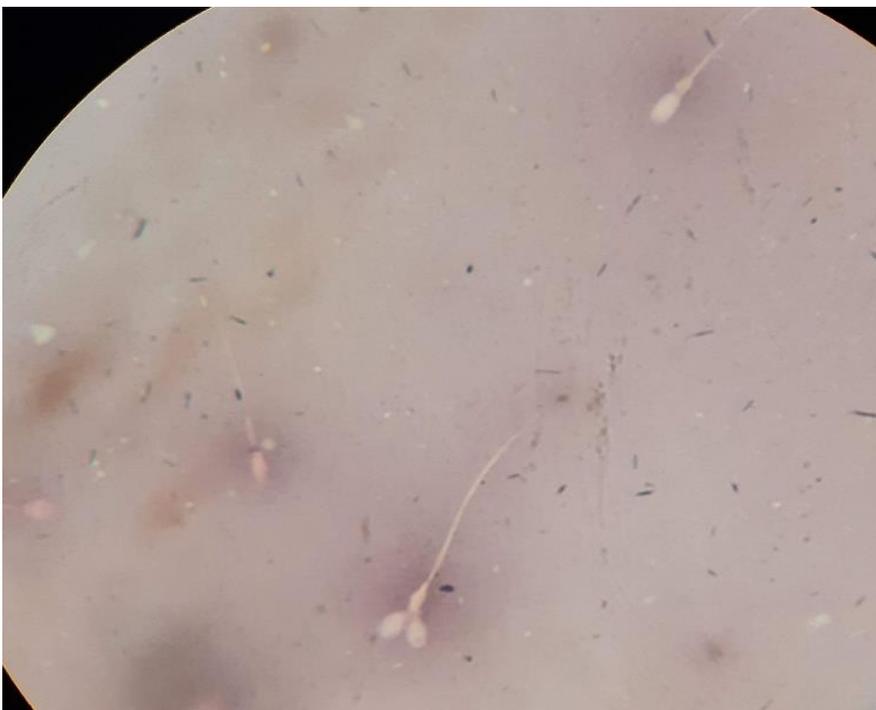
Preparación del dilutor andromed



Fase de equilibrio a 4.5°C durante 30 minutos



Evaluación de vitalidad



Evaluación de vitalidad y anomalías



## DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo Pedro Percy MACHACA TICONA,  
identificado con DNI 46844590 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL CON MENCIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL

informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:

“ PRODUCCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PROCEDENTE DEL CONDUCTO  
DEFERENTE: COLECCIÓN, CONSERVACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA  
CALIDAD ESPERMÁTICA EN LLAMAS (*Lama glama*) ”

Es un tema original.

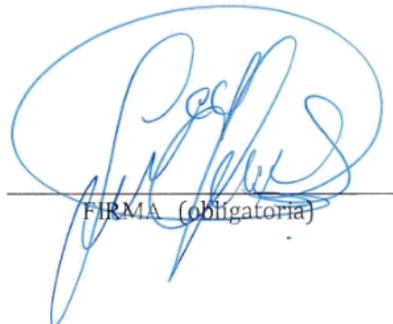
Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y no existe plagio/copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

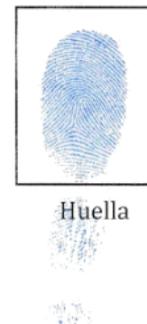
Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 16 de Mayo del 2024



FIRMA (obligatoria)



Huella



Universidad Nacional  
del Altiplano Puno



VRI  
Vicerrectorado  
de Investigación



Repositorio  
Institucional

## AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo Pedro Percy MACHACA TICONA  
identificado con DNI 46844590 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado

MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL CON MENCIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL,

informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:

“ PRODUCCIÓN DE ESPERMATOZOIDES PROCEDENTE DEL CONDUCTO

DEFERENTE: COLECCIÓN, CONSERVACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA

CALIDAD ESPERMÁTICA EN LLAMAS (*Lama glama*) ”

para la obtención de  Grado,  Título Profesional o  Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

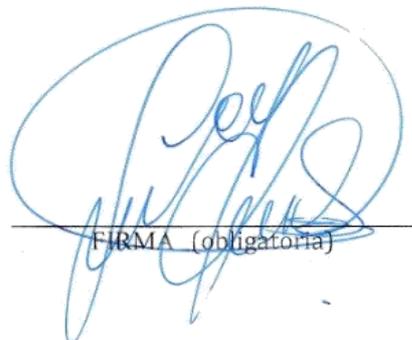
En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 16 de Mayo del 2024

  
FIRMA (obligatoria)



Huella