

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**



**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE  
CONSERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA (*Vicugna pacos*)  
EN MEDIO SÓLIDO”**

**Presentada por:  
OSCAR ELISBAN GOMEZ QUISPE**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR  
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE* EN CIENCIA ANIMAL**

**Lima – Perú**

**2020**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL**

**“DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE  
CONSERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA (*Vicugna pacos*) EN  
MEDIO SÓLIDO”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR  
*DOCTORIS PHILOSOPHIAE* EN CIENCIA ANIMAL**

**Presentado por:**

**OSCAR ELISBAN GÓMEZ QUISPE**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

Ph.D. Javier Ñaupari Vasquez  
**PRESIDENTE**

Ph.D. Henry W. Vivanco Mackie  
**ASESOR**

Ph.D. Gustavo A. Gutierrez Reynoso  
**MIEMBRO**

Ph.D. Victor R. Guevara Carrasco  
**MIEMBRO**

Dr. Alexei Santiani Acosta  
**MIEMBRO EXTERNO**

## **DEDICATORIA**

A mi esposa Fanny, por su amor y su inmenso afecto. Sin su apoyo, no habría sido posible este logro.

A mis hijas, Liliam Eliana y Estrella Milagros, porque representan la razón de mi existencia y el impulso en mis esfuerzos por avanzar.

## AGRADECIMIENTO

- Al Ph.D. William Vivanco Mackie por su acertada dirección en el desarrollo de esta investigación.
- Al Ph.D. Gustavo Gutierrez Reynoso, Ph.D. Victor Guevara Carrasco, Ph.D. Javier Ñaupari Vasquez y Dr. Alexei Santiani Acosta, por los sabios consejos impartidos y orientación en este trabajo.
- Al Ph.D. Curtis Youngs, por ser un gran guía y consejero, y al Dr. Antonio Vaamode por su contribución en el logro de este trabajo
- A la M.Sc. Amalia Gallegos por su apoyo durante mi estadía en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Zootecnia de la UNALM, Lima-Perú. No quiero dejar de mencionar a Nataly Zirena y Gaby Quispe, amigos y compañeros en el laboratorio.
- Al Ing. Moises Asparrin, Administrador del Fundo Mallkini de Michell & Cia, por su inmenso apoyo. A los amigos y colaboradores de este Centro Genético, Carlos Jara y Moises Asparrin (Junior) por hacerse parte en este trabajo.
- A los amigos de Vivanco International S.A.C., Daniel Ponce y Marlene Miguel, por compartir sus experiencias conmigo.
- A mis compañeros de estudio, Manuel More y Juan Moscoso, por sus constantes alientos. Gracias por vuestro compañerismo y amistad.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE ANEXOS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
I. INTRODUCCIÓN.....	11
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
2.1 LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS, IMPORTANCIA Y CARACTERÍSTICAS.....	14
2.2 LIMITACIONES REPRODUCTIVAS EN LOS CAMÉLIDOS .....	15
2.3 SEMEN Y ESPERMATOZOIDES DE LA ALPACA .....	16
2.4 PRESERVACIÓN DE SEMEN DE LOS CAMÉLIDOS.....	26
2.5 INSEMINACIÓN CON SEMEN DE CAMÉLIDOS .....	30
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	34
3.1 LOCALIZACIÓN .....	34
3.2 ANIMALES .....	34
3.3 FASE PRE EXPERIMENTAL .....	34
3.4 FASE EXPERIMENTACIÓN .....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
4.1 EXPERIMENTO 1: SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES POR CENTRIFUGACIÓN.....	48
4.2 EXPERIMENTO 2: CONSERVACIÓN DE SEMEN EN MEDIO SÓLIDO Y LÍQUIDO A 5 °C .....	59
4.3 EXPERIMENTO 3: CAPACIDAD GESTACIONAL DEL SEMEN EN ESTADO SÓLIDO Y LÍQUIDO .....	65
V. CONCLUSIONES .....	70
VI. RECOMENDACIONES.....	71
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	72
ANEXOS .....	90

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Medias $\pm$ EE de motilidad de espermatozoides (%) de alpaca posgelificación (280 °Bloom) a diferentes horas de conservación por tratamiento.....	60
Tabla 2.	Medias $\pm$ EE de integridad funcional de membrana espermática (%) de espermatozoides posgelificación (280 °Bloom) a diferentes horas de conservación por tratamiento.....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Vagina artificial modificada por Vivanco para colecta de semen.....	35
Figura 2.	Colecta de semen por un operador que utiliza vagina artificial modificada.....	36
Figura 3.	Disposición de espermatozoides poscentrifugación en diferentes medios y fuerzas de centrifugación por tiempo.....	49
Figura 4.	Tasa de recuperación espermática segregada por fuerzas de centrifugación por tiempo.....	51
Figura 5.	Tasa de recuperación espermática segregada por medios de centrifugación.....	52
Figura 6.	Pérdida de motilidad de espermatozoides por fuerzas de centrifugación por tiempo	54
Figura 7.	Pérdida de motilidad de espermatozoides por medios de centrifugación.....	55
Figura 8.	Tasa de pérdida de integridad funcionalidad de la membrana espermática segregada por fuerzas de centrifugación por tiempo.....	58
Figura 9.	Comparación de los tratamientos Pspe-gelificado, Tris-gelificado y Control sobre la motilidad (%) de espermatozoides gelificados (gelatina de 280° Bloom) de alpaca a diferentes horas de conservación.....	61
Figura 10.	Comparación de los tratamientos Pspe-gelificado, Tris-gelificado y Control sobre la motilidad (%) de espermatozoides gelificados (gelatina de 280° Bloom) de alpaca a diferentes horas de conservación.....	63
Figura 11.	Capacidad de preñez a 30 días de gestación del semen conservado a 5 °C en estado sólido (gelificado en gelatina de 280 °Bloom) y líquido (diluido en Tris-yema de huevo) hasta 48 horas.....	66

# ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Análisis de varianza del modelo para recuperación de espermatozoides.....	91
Anexo 2.	Análisis de varianza para variables fuerza de centrifugación por tiempo, medios e interacción.....	91
Anexo 3.	Interacción: efecto dividido por fuerza de centrifugación por tiempo para recuperación de espermatozoides.....	91
Anexo 4.	Interacción: efecto dividido por medios para recuperación de espermatozoides.	91
Anexo 5.	Análisis de varianza del modelo para pérdida de motilidad .....	92
Anexo 6.	Análisis de varianza para las variables de pérdida de motilidad .....	92
Anexo 7.	Interacción: efecto dividido por fuerza de centrifugación por tiempo para pérdida de motilidad .....	92
Anexo 8.	Interacción: efecto dividido por medios para pérdida de motilidad.....	92
Anexo 9.	Análisis de varianza del modelo para integridad funcional de la membrana espermática.....	93
Anexo 10.	Análisis de varianza para las variables de integridad funcional de membrana espermática .....	93
Anexo 11.	Procedimiento mixed. Información del modelo para motilidad.....	94
Anexo 12.	Procedimiento mixed. Estadísticos de ajuste para motilidad .....	94
Anexo 13	Procedimiento mixed. Test para efectos fijos para motilidad .....	94
Anexo 14	Procedimiento mixed. Diferencias de medias de mínimos cuadrados para motilidad.....	95
Anexo 15	Procedimiento mixed. Diagnóstico de residuos (Post Hoc) para motilidad.....	96
Anexo 16	Procedimiento mixed. Información del modelo para integridad funcional de membrana del espermatozoide.....	97
Anexo 17	Procedimiento mixed. Estadísticos de ajuste para integridad funcional de membrana del espermatozoide.....	97
Anexo 18	Procedimiento mixed. Test para efectos fijos para integridad funcional de membrana del espermatozoide.....	97
Anexo 19	Procedimiento mixed. Diferencias de medias de mínimos cuadrados para integridad funcional de membrana del espermatozoide	98
Anexo 20	Procedimiento mixed. Diagnóstico de residuos (Post Hoc) para integridad funcional de membrana del espermatozoide.....	99
Anexo 21	Análisis de estimadores de parámetros de máxima verosimilitud de regresión logística binomial para datos cualitativos.....	100
Anexo 22	Estadísticos para análisis de regresión logística binomial y contrastes.....	100
Anexo 23	Parámetros espermáticos (tasas) poscentrifugación a diferentes fuerzas de centrifugación por tiempo, medios de centrifugación e interacción.....	100

## RESUMEN

Debido a las dificultades, como la alta viscosidad del semen de la alpaca (*Vicugna pacos*) y la baja congelabilidad a la criopreservación, los objetivos de esta investigación han sido, determinar el efecto de la centrifugación a diferentes fuerzas de centrifugación por tiempo y en distintos medios sobre la recuperación de espermatozoides, la motilidad y la integridad funcional de la membrana espermática; estimar el tiempo de conservación bajo refrigeración de espermatozoides en medio sólido y líquido; y evaluar la capacidad gestacional del semen sólido y líquido de alpacas. Con estos propósitos, se han llevado a cabo tres experimentos, en el primer caso, se ha colectado semen de alpaca, luego centrifugado a tres fuerzas de centrifugación por tiempo ( $492 \times g$  por 15 min,  $1968 \times g$  por 10 min, y  $4448 \times g$  por 7 min) y dos medios de centrifugación (Tris y PureSperm®80); en el segundo experimento, se ha conservado semen centrifugado en medio PureSperm®80 a  $4448 \times g$  por 7 min en forma líquida y sólida hasta 96 horas; en el tercero, se ha inseminado alpacas con semen que estaban conservados a  $5^\circ\text{C}$  por 48 horas en estado líquido y sólido (gelificado a  $280^\circ\text{Bloom}$ ). Los resultados encontrados indican que, la centrifugación de eyaculados a  $4448 \times g$  durante 7 minutos en medio PureSperm®80 proporcionó una alta tasa de recuperación de espermatozoides (98.46%) con una pérdida mínima de la motilidad (3.45%) y la integridad funcional de la membrana plasmática (5.75%); la refrigeración de semen a  $5^\circ\text{C}$  en estado líquido y sólido hasta 48 horas, previamente centrifugado a esta fuerza de centrifugación en PureSperm®80, mostraron valores de motilidad de 41.20 y 52.06% e integridad funcional de la membrana de los espermatozoides de 49.84 y 64.90% respectivamente; y se evidenció capacidad gestacional del semen refrigerado en forma líquida (4/12), más no en el caso del semen refrigerado en forma sólido (0/12), siendo ambos (previamente centrifugados a  $4448 \times g$  por 7 min en PureSperm®80) superados por la proporción de preñeces por empadre controlado (6/12).

Palabras clave: motilidad, PureSperm, refrigeración, gelificación, inseminación

## ABSTRACT

Due to difficulties, such as the high viscosity of the semen of the alpaca (*Vicugna pacos*) and the low freezability to cryopreservation, the objectives of this research have been to determine the effect of centrifugation at different centrifugal forces for time and in different media on sperm recovery, motility and functional integrity of the sperm membrane; estimate the storage time under refrigeration of sperm in solid and liquid medium; and evaluate the gestational capacity of the solid (gelled) and liquid semen of alpacas. For these purposes, three experiments have been carried out, in the first case, alpaca semen was collected and centrifuged at three speeds-time ( $492 \times g$  for 15 min,  $1968 \times g$  for 10 min and  $4448 \times g$  for 7 min) and two different media (Tris and PureSperm®80). In the second experiment, the centrifuged semen was preserved in PureSperm®80 at  $4448 \times g$  for 7 min, isolated, gelled, conserved and evaluated up to 5 days. In the third, alpacas have been inseminated with semen that stored at 5 °C for 48 hours in liquid and solid state (gelled at 280 °Bloom). Results were that the centrifugation of ejaculates at  $4448 \times g$  for 7 minutes in PureSperm®80 medium provided a high rate of sperm recovery (98.46%) with a minimal loss of sperm motility (3.45%) and of the functional integrity of the plasma membrane (5.75%), that the semen refrigerated in liquid and solid state at 5 °C up to 48 hours, previously centrifuged at high speed in PureSperm®80, showed motility values of 41.20 and 52.06%, and functional integrity of the sperm membrane of 49.84 and 64.90% respectively, and that gestational capacity of this refrigerated liquid semen (4/12) has been evidenced, but not in the case of gelled semen (0/12), both (previously centrifuged at high speed in PureSperm®80) were surpassed by the proportion of pregnancies by controlled breeding (6/12).

**Keywords:** motility, PureSperm, refrigeration, gelation, insemination

# I. INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos (CSA), constituye una fuente de ingresos para las poblaciones localizadas en los altos Andes de Sudamérica (Quispe *et al.* 2009). Sin embargo, esta actividad se desarrolla aún con bajos rendimientos productivos debido a la baja utilización de material genético de importancia, e inadecuadas estrategias de alimentación y manejo.

Como se sabe, la inseminación artificial ayuda en la velocidad de la mejora genética de caracteres de interés para el productor. En la alpaca, esta tecnología reproductiva ha tenido uso limitado y bajos resultados a nivel de campo (Alarcón *et al.* 2012; Bravo *et al.* 2000a), debido a que aún no ha sido posible congelar-descongelar el semen de alpaca (en general de los camélidos) con parámetros espermáticos utilizables para inseminación artificial (Santiani *et al.* 2005; Bravo *et al.* 2000a). Al respecto, se han estudiado varios factores con resultados desalentadores.

El problema central radica en la existencia de una tecnología inadecuada de criopreservación de semen de la alpaca, determinado por la baja congelabilidad del semen (Santiani *et al.* 2005), la alta viscosidad (Adams *et al.* 2009) y el bajo volumen de las eyaculaciones, que conjuntamente han restringido su procesamiento, y conllevado a bajas tasas de natalidad por inseminación artificial (I.A.). Debido a estas dificultades, en los camélidos e inclusive en los camellos, se han incorporado previos procesos a la criopreservación de semen con el fin de disminuir (Bravo *et al.* 2000a; Santiani *et al.* 2005), anular (Morton *et al.* 2012; Giuliano *et al.* 2010; El-Bahrawy 2010) y evadir (Morton *et al.* 2007; Pérez *et al.* 2014; Gómez-Quispe *et al.* 2016) la viscosidad del plasma seminal, los cuales no han mejorado significativamente los parámetros espermáticos para fines de inseminación artificial.

Entre otras tecnologías, en otras especies se ha ensayado la separación de espermatozoides del plasma seminal utilizando bajas fuerzas de centrifugación (perro: Dorado *et al.* 2013; porcino: Matás *et al.* 2007), y altas fuerzas de centrifugación (humanos: Jecht y Poon, 1975) en medio Tris (camellos: El-Bahrawy 2010), y en gel PureSperm® de dos capas (oso pardo: Nicolas *et al.* (2012) y Gomes-Alves *et al.* (2014); toros: Maxwell *et al.* 2007; carnero: Hollinshead *et al.* 2004; caballos: Morrell *et al.* 2009; alpacas: Morton *et al.* 2008) o una sola capa (perro: Dorado *et al.* 2013; porcino: Matás *et al.* 2007; toros: Thys *et al.* 2009), consiguiéndose con altas fuerzas de centrifugación en medio protector, aceptables parámetros espermáticos. Estas técnicas promisorias, en el caso de la alpaca aún no se han explorado.

Por otro lado, como una alternativa a la criopreservación, en varias especies se ha empleado la conservación de semen en medio gel o sólido que utiliza la capacidad de gelificación para mantener la viabilidad de los espermatozoides hasta por 5 días (Nagy *et al.* 2002; López-Gatius *et al.* 2005; Salvador *et al.* 2006; Yaniz *et al.* 2005), el cual facilita el transporte del semen. En los camélidos, no se tiene conocimiento sobre la utilización de la inseminación artificial con semen conservado en medio sólido. En otras especies (conejo, López-Gatius *et al.* 2005; cabra, Salvador *et al.* 2006) se ha conseguido realizar inseminación artificial utilizando el semen conservando en medio sólido (gelificado) con tasas de gestación entre 60 y 47% que son alentadores.

Estas consideraciones nos han conducido a proponer una tecnología alternativa que intenta separar el plasma seminal del semen (Brahem *et al.* 2011; Morton *et al.* 2008), preservarlo en medio sólido a través de la gelificación durante un tiempo (Nagy *et al.* 2002; Salvador *et al.* 2006; López-Gatius *et al.* 2005; Yaniz *et al.* 2005) y utilizarlo para inseminación artificial como en otras especies (conejo: López-Gatius *et al.* 2005; cabra: Salvador *et al.* 2006; la oveja: Paulenz *et al.* 2010), donde se ha conseguido preñeces en los animales. Los procedimientos podrían facilitar una mejora de los parámetros espermáticos y conservar el semen en forma sólida (gelificado) por el tiempo suficiente para trasladar el semen desde los lugares de procesamiento hasta los lugares de inseminación artificial, y permitir el rápido avance de los programas de mejora genética de la alpaca.

Dado, las consideraciones expuestas y los promisorios resultados en otras especies, los objetivos de esta investigación han sido (a) determinar el efecto de diferentes medios y

fuerzas de centrifugación (g) por tiempo sobre la motilidad e integridad funcional de membrana del semen de alpacas (b) conservar semen en estado líquido y sólido (gelificado) bajo refrigeración, y (c) determinar la capacidad gestacional por inseminación artificial (I.A.) con semen de alpaca refrigerado en forma líquida y sólida.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 LOS CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS, IMPORTANCIA Y CARACTERÍSTICAS

#### 2.1.1 Los camélidos sudamericanos

Los camélidos derivan de especies prehistóricas originadas en Norteamérica que desaparecieron hace más de 11 millones de años. Antes de su desaparición algunos camélidos ancestrales migraron hacia el sur del continente para evolucionar en dos especies domésticas (llama: *Lama glama*, alpaca: *Vicugna pacos*) y dos especies silvestres (guanaco: *Lama guanicoe*, vicuña: *Vicugna vicugna*). Estudios de ADN mitocondrial sugieren que la vicuña y el guanaco fueron los antecesores de las alpacas y las llamas respectivamente, en un proceso de domesticación que se inició en los Andes centrales de Sudamérica hace 6000 años. Estos conocimientos han sido ampliamente desarrollados por Kadwell *et al.* (2001), Gentry *et al.* (2004) y Marin *et al.* (2007).

#### 2.1.2 Importancia

La crianza de camélidos domésticos constituye el principal medio de sustento para muchos productores de escasos recursos en los países andinos centrales de Sudamérica que incluyen a Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina y Chile (Quispe *et al.* 2009). Estos animales, convierten con eficiencia la vegetación nativa de los altos Andes en varios productos, principalmente en carne y fibras de alta calidad (Iñiguez y Alem, 1996).

#### 2.1.3 Características

La alpaca es uno de los camélidos sudamericanos importantes en la producción de fibra, estos tienen un peso ligero y buena fortaleza (Wuliji *et al.*, 2000). En esta especie, hay dos variedades que tienen distintas características fenotípicas. La alpaca Huacaya se caracteriza por tener un vellón compacto y esponjoso; mientras que la alpaca Suri por presentar fibras de gran longitud organizadas en rizos colgantes (Antonini *et al.*, 2004). Ambas variedades tienen similar comportamiento reproductivo tales como la ovulación

inducida, viscosidad de semen, bajas tasas de fertilidad y la producción de una cría por año.

## **2.2 LIMITACIONES REPRODUCTIVAS EN LOS CAMÉLIDOS**

En los CSA, y principalmente en la alpaca, aún no se dispone de procedimientos rutinarios de inseminación artificial a nivel de campo, debido a que la tecnología de producción de semen congelado aún no ha sido desarrollada completamente, y no está disponible para los criadores con la calidad necesaria. Esta limitación, afecta el mejoramiento genético de la alpaca, convirtiéndola en un proceso lento de diseminación de los caracteres de alto valor genético de animales selectos hacía los rebaños de los criadores de alpacas.

Desde el punto de vista de la reproducción, existen algunos factores que estarían afectando directamente el poco desarrollo de la tecnología de inseminación artificial, los cuales se indican a continuación.

### **2.2.1 La eyaculación intermitente y el largo tiempo de copula**

En esta especie, la eyaculación es intermitente y la cópula dura de 12 a 47 minutos (Raymundo *et al.* 2006; San-Martin *et al.* 1968; Fernández-Baca, y Calderon 1965), por lo que los valores de los parámetros espermáticos de la colección de semen no son necesariamente los mismos que de la eyaculación. En ovinos y bovinos, estos valores son aproximadamente similares debido a su rápido tiempo de eyaculación. Es posible que, también este largo tiempo de copula y eyaculación intermitente contribuyan a las variaciones de los parámetros espermáticos de las colectas. Según Garnica *et al.* (1993), el largo tiempo de copula también dificulta la colecta de semen.

### **2.2.2 El bajo volumen del eyaculado**

Existe una variada información sobre el volumen de la eyaculación que se debería al tipo de colecta, tiempo y frecuencia de colecta, pero en general son bajos los volúmenes de eyaculado. En los eyaculados colectados por vagina artificial se ha obtenido  $1.7 \pm 0.2$  ml cuando se colecta dos veces por semana (Garnica *et al.* 1993) y  $2.7 \pm 0.8$  ml en colectas de tres veces por semana (Raymundo *et al.* 2006), los cuales limitan la preparación del número de pajillas por eyaculados. También se ha observado que a mayor volumen de colecta se obtiene baja concentración de espermatozoides.

### **2.2.3 La alta viscosidad del semen**

El carácter viscoso de los eyaculados de la alpaca, dificulta el procesamiento del semen con fines de criopreservación y la preparación de frotices (Adams *et al.* 2009; Santiani *et al.* 2005; Aller *et al.* 2003; Von Baer y Hellemann, 1998; Bravo *et al.* 1997a; Fernández-Baca y Calderon, 1965). Una revisión sobre el carácter viscoso del semen, se presenta más adelante.

### **2.2.4 La baja congelabilidad del semen**

Muchos experimentos se han realizado en congelación de semen usando diversos dilutores, crioprotectores y curvas de enfriamiento (Santiani *et al.* 2005; Aller *et al.* 2003; Bravo *et al.* 2000b). Al parecer los espermatozoides de la alpaca, serían susceptibles a los procesos de criopreservación (Santiani *et al.* 2005). Estos estudios, han demostrado una baja congelabilidad del semen criopreservado.

### **2.2.5 Bajas tasas de preñez**

En esta especie, la tasa de gestación disminuye de 78.1 a 76.6% a los 15 a 30 días respectivamente, después del empadre partiendo de monta natural (Bravo *et al.* 1997b), hasta el 55-48% cuando se utiliza inseminación artificial con semen fresco (Alarcón *et al.* 2012), y puede llegar a disminuir hasta 26% cuando se emplea inseminación artificial con semen congelado (Bravo *et al.* 2000b). Estas bajas tasas de gestación han sido atribuidas a la pérdida embrionaria que ocurre cercano a los 30 días después del empadre (Fernández-Baca *et al.* 1970), y la utilización de semen de baja congelabilidad (Santiani *et al.* 2005) en la inseminación artificial de la alpaca.

## **2.3 SEMEN Y ESPERMATOZOIDEOS DE LA ALPACA**

### **2.3.1 Características del semen de alpacas**

El semen de camélidos sudamericanos, tiene una naturaleza viscosa (Adams *et al.* 2009; Von Baer y Hellemann, 1998; Bravo *et al.* 1997a; Fernández-Baca y Calderon, 1965), bajo volumen de colecta (Kershaw-Young y Maxwell WMC, 2012) cuando se utiliza el método de vagina artificial con maniquí que varía en el rango de 1.03 a 3.4 ml (Raymundo *et al.* 2006; Dávalos y Olazábal 2002) donde el 88.5% del volumen es plasma seminal

(Garnica *et al.* 1993), el pH varía entre 6.8 a 7.83 (Villanueva *et al.* 2018; Bravo *et al.* 1997a), el color es blanco lechoso (Raymundo *et al.* 2006; Bravo *et al.* 1997a; Garnica *et al.* 1993), tiene una baja concentración por colecta a través de vagina artificial Kershaw-Young & Maxwell, 2012) que oscila entre 21.8 a  $105.8 \times 10^6$  espermatozoides / ml (Morton *et al.* 2010; Bravo *et al.* 1997a; Alarcón *et al.* 2012), motilidad entre 46 a 87.6% (Raymundo *et al.* 2006; Villanueva *et al.* 2018; Bravo *et al.* 1997a; García *et al.* 2017; Bravo *et al.* 2000a; Santiani *et al.* 2005), vitalidad entre 40.7 a 82.5% (Villanueva *et al.* 2018; Bravo *et al.* 1997a; Bravo *et al.* 2000b; Alarcón *et al.* 2012), integridad funcional de membrana entre 30.7 a 67.5% (Villanueva *et al.* 2018; García *et al.* 2017; Pacheco *et al.* 2017).

Las características morfométricas de los espermatozoides de alpaca tienen valores mayores que de la llama (Soler *et al.* 2014). La cabeza de los espermatozoides de la alpaca tiene un área entre 10.08 a  $18.2\mu\text{m}^2$ , el perímetro 12.33 a  $14.91\mu\text{m}$ , el largo 4.91 a  $6.73\mu\text{m}$  y el ancho 2.66 a  $3.96\mu\text{m}$  (Soler *et al.* 2014; Evangelista-Vargas *et al.* 2016; Buendía *et al.* 2002). Se han reportado diferentes formas de la cabeza de los espermatozoides, entre los principales tenemos cabezas elípticas (48.6%), cabezas largas (17.5%), piriformes (12%), entre otras, y entre los defectos se ha encontrado que el 51% de los espermatozoides tenían defectos en la cabeza, el 4% en el cuello/media pieza y el 16% en la pieza principal (Evangelista-Vargas *et al.* 2016).

La característica viscosa del semen de los camélidos sudamericanos (Adams *et al.* 2009; Von Baer y Helleman, 1998; Bravo *et al.* 1997a; Fernández-Baca y Calderon, 1965), sería útil y funcionaría como un reservorio de espermatozoides o una trampa de red fibrinosa (Wani *et al.* 2008), lo que facilitaría la disminución de la motilidad, y la producción de movimientos oscilatorios de los espermatozoides (Garnica *et al.* 1993; Bravo *et al.* 1997a) para mantener su capacidad fertilizante en la espera de la ovulación (Brown 2000) que ocurre 26 horas después de la deposición de semen en el útero de la alpaca empadrada.

### **2.3.2 Funciones del plasma seminal relacionadas con el espermatozoide**

#### **a. Congelabilidad**

Se han identificado varias proteínas involucradas con la congelabilidad del semen, entre las principales tenemos al grupo de proteínas de 16 kDa del plasma seminal

que afectan negativamente la congelabilidad del semen de equinos (Zahn *et al.* 2006; Brandon *et al.* 1999). En la dilución de semen, estas proteínas serían capturadas por las lipoproteínas de la yema de huevo para impedir la adhesión a la membrana del espermatozoide, provocando cambios mínimos durante la criopreservación y disminuyendo el daño por shock frío (Manjunath *et al.* 2002).

Concordante con el anterior, se han encontrado diferencias significativas entre las abundantes proteínas en el plasma seminal de toros con alta y baja congelabilidad de semen, y se han sugerido que las proteínas aSFP, el clusterin, la proteína spot 3 y spot 11 podrían ser utilizados como indicadores de alta congelabilidad, mientras que la proteína spot 25 como un indicador de baja congelabilidad del semen bovino (Jobim *et al.* 2004).

La HBP (heparin binding seminal plasma proteins) es otra proteína asociada con la congelabilidad del semen de los bovinos, y esta fue encontrada en la superficie de los espermatozoides eyaculados, pero en menor cuantía en la membrana plasmática de los espermatozoides epididimales (Miller *et al.* 1990). La adición de estas proteínas al semen epididimal mejoraba la motilidad progresiva, el test BCMPT (bovine cervical mucus penetration test) y el test HOST (hypo-osmotic sperm swelling test), pero el seguir aumentando estas proteínas afectaba negativamente a los espermatozoides descongelados, lo que demostró que la acción de la HBP en la refrigeración, congelación y descongelación depende de su concentración (Harshan *et al.* 2006).

## **b. Capacidad fecundante**

El plasma seminal también ha sido asociado con la capacidad fecundante del espermatozoide (Gwathmey *et al.* 2006). Según, Vera *et al.* (2007), el proceso de congelación-descongelación altera los espermatozoides afectando la fertilidad del semen. Así, la resuspensión de los espermatozoides en plasma seminal después de la descongelación mejoró la viabilidad de los mismos en varias especies. Concordantemente, se observó que una proteína (SP-26) prevalecía en el plasma seminal de toros de alta fertilidad (Hayaishi, 1993). Otra proteína encontrada en el plasma seminal de toros de alta fertilidad fue la Osteopontin (OPN), que participa en la interacción del espermatozoide y ovocito, afectando favorablemente la

fertilización y el desarrollo embrionario temprano (Souza *et al.* 2008). En equinos de baja fertilidad, Brandon *et al.* (1999), encontró tres proteínas (SP-2, SP-3 y SP-4) en altas concentraciones que tenían una correlación negativa con la fertilidad.

#### **c. Capacitación y descapitación**

Se ha encontrado una proteína (PDC-109) en el plasma seminal, sintetizado por los epitelios de la vesícula seminal, que al unirse a la heparina interviene en la capacitación de espermatozoides estimulando la acción del colesterol y la emanación de fosfolípidos (Gasset *et al.* 2000). Al respecto, se ha observado que la presencia del plasma seminal impide la capacitación inducida en el enfriamiento, pero produce capacitación inducida cuando se calienta desde 5 °C (Vadnais *et al.* 2005), y participaría en la descapitación de los espermatozoides al inhibir la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosómica externa frenando la reacción acrosomal (Kgtaska *et al.* 1996).

#### **d. Formación de reservorio**

El plasma seminal también desempeña un rol en la formación de un reservorio para el espermatozoide oviductal (Gwathmey *et al.* 2006; Deen *et al.* 2005). Así en el semen entero de camello, los espermatozoides están como atrapados en un gel (viscosidad), esta característica parece jugar un papel vital parecido a un reservorio de espermatozoides (Deen *et al.* 2005). La proteína PDC-109 desempeña el papel de formar un reservorio de espermatozoides en el oviducto de la hembra para permitir al espermatozoide unirse al epitelio oviductal (Gwathmey *et al.* 2006).

#### **e. Transporte útero tubal**

Se ha identificado una prostaglandina en toros (Killiam *et al.* 1996), y equinos de alta fertilidad, y sugerido que podría facilitar el transporte de espermatozoides a través de la unión útero-tubal (Troedsson *et al.* 2005).

#### **f. Protección espermática**

Algunas proteínas del plasma seminal equino protegen a los espermatozoides viables en el tracto reproductivo de la hembra, pero no a los inviables y dañados de la adhesión a los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) impidiendo la fagocitosis de espermatozoides; al respecto, se ha sugerido que habría un mecanismo entre el espermatozoide y los PMN, que sería inhibida por los componentes del plasma seminal como el Opsonin, un anticuerpo de la sangre (Troedsson *et al.* 2005). Entre las enzimas del plasma seminal equino se encontraron correlaciones significativas entre la GGT (g-glutamyl-transferasa) y la LDH (lactato-deshidrogenasa) con la motilidad individual, motilidad progresiva y la vitalidad, que puede ser un signo de la función de protección de la célula en contra de los radicales libres (Pesch, *et al.* 2006).

#### **g. Acción enzimática**

La presencia de lipasas en el plasma seminal tiene un efecto perjudicial sobre los parámetros espermáticos, así al adicionar lipasas a los espermatozoides epididimales (Pellicer-Rubio *et al.* 1997) o en ausencia de plasma seminal, produjo una disminución de la motilidad espermática, la viabilidad y la integridad acrosomal; y estas enzimas actuarían en presencia de calor (Carver y Ball, 2002). Entre otras enzimas encontradas (Aspartato-amino-transferasa, AST; g-glutamyl-transferasa, GGT; fosfatasa alcalina, ALP; fosfatasa ácida, AcP; y lactato-deshidrogenasa, LDH) había correlaciones significativas entre la concentración del semen y el volumen espermático con el AST, GGT, ALP, AcP y LDH, de igual modo entre GGT con la motilidad, y la LDH con la motilidad individual, motilidad progresiva, la tasa vivos/muertos y la patomorfología (Pesch *et al.* 2006). Asimismo, se ha encontrado que las enzimas como la proteasa, acrosina, nucleasas, fosfatasa alcalina y ácida, y el superóxido dismutasa participan durante el proceso de licuefacción del semen, la penetración del ovocito y la digestión de espermatozoides muertos y dañados (Harrison 1974; Zini *et al.* 1993).

#### **h. Inducción de la ovulación**

Aunque se conoce que en los camélidos sudamericanos la ovulación es inducida, se ha informado ovulación por efecto del plasma seminal, el cuál fue reportado a partir de la observación de la deposición del semen en la vagina del camello en ausencia de cópula (Chen *et al.* 1985). Esto mismo, fue observado por Paolichi *et al.* (1999) en las alpacas, y sugerían que algún factor diferente a la GnRH podría contribuir al mecanismo de secreción de la LH (a nivel de las células hipofisiales gonadotrópicas) y la inducción de la ovulación. Según, Ratto *et al.* (2003, 2006) en la llama y alpaca, un factor de inducción de la ovulación (OIF) del plasma seminal de alpacas provocaría la ovulación por una ruta sistémica en vez de una ruta local, que no estaría asociada con una estimulación física del tracto genital de la hembra por el pene del macho, sino por un sistema neuroendocrino de inducción de la ovulación, y sería no producido en los tejidos del tracto reproductivo de la hembra. Este OIF del toro produce el mismo efecto, pero con menor intensidad, y sería capaz de favorecer la formación de un cuerpo lúteo fisiológicamente normal. Se ha detectado que el plasma seminal de camellos (Pan *et al.* 2001), contiene actividad análoga a la GnRH pero diferente de LHRH, LH, HCG, PMSG y PGF-2 $\alpha$  nativos, y que probablemente sería sintetizado en el hipotálamo o en la pituitaria del camello macho. La respuesta sería tipo oleada de LH que induce la ovulación y respuesta luteotrópica en alpacas y llamas (Adams *et al.* 2005), y que tendrían efecto en la tasa de ovulación, la formación y el funcionamiento del cuerpo lúteo en llamas (Tanco *et al.* 2007).

#### **i. El rol del plasma seminal en la acción antimicrobiana**

En algunas especies, como en el plasma seminal del cangrejo (*Scylla serrata*) habría un factor antibacterial (proteína de 20kDa) contra algunas bacterias marinas como *Cytophaga sp.*, *Furnissi vibrio* y *Alteromonas sp.* (Jayasankar y Subramoniam, 1999). Esta es una proteína diferente a la proteína antibacteriana del plasma seminal del bovino (3600 Da) que actúa a nivel de la transcripción inhibiendo la síntesis de RNA (Bhargava, 1981).

#### **j. Actividad de los micro y macroelementos**

En el plasma seminal existe, concentraciones de microelementos (magnesio, cloro, cobre, hierro y zinc) y macroelementos (sodio, potasio, calcio y fosforo), y del análisis de estos micro y macroelementos se obtuvo correlaciones significativas entre la concentración del semen y el volumen espermático con el Fe y Zn (Pesch *et al.* 2006).

#### **k. Proteínas con diversas participaciones**

Varias proteínas con diversas funciones han sido aislados del plasma seminal, entre ellos tenemos, la proteína TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2), una enzima capaz de degradar los componentes extracelulares en la embriogénesis y la remodelación celular, y ha sido implicado en la invasión de las células tumorales y la metástasis, neoplasias, angiogénesis, periodontitis, osteoporosis, y artritis reumatoideo (Woessner *et al.* 1991); la proteína MMPs (Matrix metalloproteinases) involucrado en la remodelación de tejidos, migración celular, y la interacción entre células; asimismo la prostaglandina D2 sintasa, que podría actuar como un transportador lipofílico de retinoides y prostaglandinas; la proteína BSP (30 kDa, proteína ácida de la familia BSP), que posiblemente pierda uniones a las células espermáticas después de su interacción con las células epiteliales del oviducto (Gwathmey *et al.* 2006); el Clusterin, una glicoproteína principal del fluido de la rete testis que podría provenir de las células Sertoli, e involucrado en la maduración del esperma (Jobima *et al.* 2005); la proteína aSFP bovina (acidic seminal fluid protein) que posee actividad miogénica, estimula la división celular y la secreción de prostaglandina de la granulosa *in vitro* (Einspanier *et al.* 1991); y la BSRnase (Bovine seminal ribonuclease) que despliega un sorprendente actividad antispermatogénica, antitumoral, y actividad inmunosupresiva (Kim *et al.* 1995), entre otros.

### **2.3.3 Estrategias de manejo del plasma seminal y la viscosidad**

Dado las dificultades en el procesamiento rutinario del semen de los camélidos debido a la alta viscosidad de esta, se han diseñado y aplicado diversas técnicas con el objeto de

conseguir un mejor manejo del semen; sin embargo, no se han conseguido resultados favorables, entre estos tenemos, técnicas dirigidas a disminuir, anular o evadir de la viscosidad del semen.

### **2.3.3.1 Disminución de la viscosidad**

Los procedimientos para disminuir la viscosidad del semen de los camélidos han sido, el uso de métodos de degelificación por cultivo a temperatura ambiental que consistía en dejar las muestras de semen por 18 a 24 horas a temperatura de laboratorio y posterior almacenamiento a -20°C (Gárnica *et al.* 1993), el cultivo de las muestras a temperatura corporal durante 60 a 90 minutos a 37 °C utilizando dilutores (Wani *et al.* 2008), el uso de procedimientos mecánicos como la aspiración repetida del semen con una jeringa de 1 ml de capacidad (Raymundo *et al.* 2006; Santiani *et al.* 2005, 2012), y la agitación magnética del semen que consistió en poner el semen en baño María sobre un agitador magnético dentro de una incubadora a 37 °C (Mosaferi *et al.* 2005; Niasari-Naslaji *et al.* 2006; Niasari-Naslaji *et al.* 2007).

### **2.3.3.2 Anulación parcial de la viscosidad**

El procedimiento más empleado para eliminar la viscosidad del semen de los camélidos, ha sido la práctica de la licuefacción del semen usando métodos enzimáticos. Utilizando este método la viscosidad de semen fue eliminada rápida e irreversiblemente por la adición de enzimas como colagenasa, fibrinolisina, hialurodinasa y tripsina, donde estas enzimas fueron más efectivas en las muestras de semen de alpaca que en las de llamas, quizás debido a la mayor viscosidad del semen de la llama respecto al semen de alpaca (Bravo *et al.* 2000a). Aunque, el efecto en la viscosidad fue rápido, el efecto fue dependiente del tiempo, la colagenasa actuó más rápido que las otras enzimas usadas, g produciendo menos efectos en la motilidad, en los espermatozoides vivos e integridad del acrosoma en llamas y alpacas (Giuliano *et al.* 2010). A diferencia de estudios previos, Kershaw *et al.* (2017) utilizó la papaína para conseguir anular la viscosidad del semen, así como un inhibidor E-64 para detener la acción enzimática.

### 2.3.3.3 Evasión de la viscosidad

Con el propósito de evadir del plasma seminal, se han ensayado técnicas traumáticas y no traumáticas. Entre las técnicas traumáticas se tiene, la colecta de espermatozoides de animales bulbouretrectimizadas, del epidídimo del testículo de los animales, y a través del conducto deferente del animal, y entre las técnicas no traumáticas, tenemos al uso de la separación del plasma seminal por centrifugación del semen. En todos los casos, se ha conseguido mejoras en los parámetros espermáticos, pero con baja viabilidad en la fertilización.

Una breve descripción de cada una de estas técnicas traumáticas de evasión de la viscosidad, se realizan a continuación. La técnica de **colecta de semen por bulbouretrectomía**, consiste en retirar a través de un procedimiento quirúrgico la glándula bulbouretral del macho, y coleccionar directamente con una vagina artificial utilizando una hembra receptiva en posición de copula (Copa *et al.* 2003; González *et al.* 2003; Maceda *et al.* 2003).

La **colecta de espermatozoides del epidídimo**, se ha llevado a cabo utilizando testículos de animales sacrificados en el camal (Canorio y Valdivia, 2007), o de animales vivos sometidos a la castración (Morton *et al.* 2007), ambos han servido como un modelo para estudiar el comportamiento de los espermatozoides bajo condiciones de diferentes dilutores y crioprotectores (Canorio y Valdivia 2007), curvas de enfriamiento y congelación (Morton *et al.* 2007), y métodos de conservación seminal como la criopreservación (Terreros *et al.* 2015; Banda *et al.* 2010; Morton *et al.* 2007), y la vitrificación (Santiani *et al.* 2010). La técnica incluye procedimientos para aislar el testículo, el transporte al laboratorio, la debridación de restos o tejidos, la separación del epidídimo, el lavado del contenido seminal de la cabeza del epidídimo y someter este contenido a diversos ensayos.

La **recuperación de espermatozoides por desviación del conducto deferente** se realiza por procedimiento quirúrgico. El conducto deferente es trasladado desde su posición normal hacia la cara interna del muslo del animal, donde se deja una abertura del conducto expuesta en la piel externa; después de la cicatrización, y realizando suaves masajes desde la cabeza del epidídimo hacia la abertura del

conducto deferente se colecta espermatozoides desprovistos de plasma seminal, evitándose así el contacto con las secreciones de las glándulas anexas (Paricahua 2001; Quintano 2002; Pérez *et al.* 2014; Deza 2004; Gómez-Quispe *et al.* 2016). Sin embargo, la viscosidad y forma de gel del semen, parecen servir de reservorio de espermatozoides en el tracto genital de la hembra y tendría alguna acción protectora en la viabilidad de espermatozoides (Deen, *et al.* 2005), lo cual afectaría en la baja capacidad fertilizante de estos espermatozoides.

Entre las técnicas no traumáticas de evasión de la viscosidad, se describe la **técnica de centrifugación del semen** realizado con el objeto de aislar el contenido de espermatozoides del plasma seminal en el semen, pero también para seleccionar espermatozoides. En la centrifugación de semen de camélidos y camellos, se ha empleado bajas (Giuliano *et al.* 2010) y altas fuerzas de centrifugación (El-Bahrawy 2010), asimismo se ha utilizado medios de protección o amortiguadores durante este proceso tales como dilutores o geles (Morton *et al.* 2012), y varios gradientes en otras especies (Guimarães *et al.* 2014; Folchini *et al.* 2012; Carvalho *et al.* 2010; Machado *et al.* 2009).

Respecto al uso de *altas fuerzas de centrifugación por corto tiempo*, se tiene disponible algunos trabajos publicados en varias especies. En ovinos, al incrementar la centrifugación a  $5000 \times g$  por 5 min utilizando mini Percoll, aunque la tasa de recuperación de espermatozoides fue baja, la mayoría de los parámetros de la motilidad, la capacitación y la integridad de la membrana plasmática fueron similares entre los tratamientos (Olivares *et al.* 2019). En el porcino, una combinación de alta fuerza de centrifugación y corto tiempo ( $2400 \times g$  por 3 minutos) minimizaron los daños letales de los espermatozoides, no se afectaron la recuperación, se observaron efectos positivos sobre la criopreservación, y se mantuvieron la capacidad de penetración y fertilización (Carvajal *et al.* 2004).

En el caso de bovinos, se cuenta con más trabajos donde se usa altas fuerzas de centrifugación (Guimarães *et al.* 2014; Folchini *et al.* 2012; Carvalho *et al.* 2010; Machado *et al.* 2009). Así, después de centrifugar semen a altas ( $9000$ ,  $6500$ ,  $4500 \times g$  por 5 min) y medianas fuerzas de centrifugación ( $2200 \times g$  por 5 min) por tiempo en gradientes de Percoll, los tratamientos tuvieron valores, en las anomalías espermáticas, motilidad e integridad de la membrana plasmática,

que no fueron menores que antes de la centrifugación (Guimarães *et al.* 2014). En la misma especie, al centrifugar semen descongelado a  $9000 \times g$  por 5 min en diferentes gradientes de mini Percoll, no se encontraron diferencias en los espermatozoides defectuosos (13%), la recuperación ( $66.25 \times 10^6$  espermatozoides/ml), la motilidad progresiva (58.5%) y la integridad de la membrana (22.85%), pero se consiguió reducir la producción de ROS (Folchini *et al.* 2012). Similarmente, después de centrifugar semen de bovino en gradiente de Percoll a  $5400 \times g$  por 5 minutos, se encontró que la motilidad, la morfología, vivos y muertos, y la integridad de cromatina no tuvieron mayores cambios, y el semen fue exitosamente utilizado en el proceso de fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario (Carvalho *et al.* 2010). Asimismo, después de centrifugar semen bovino a diferentes tiempos y fuerzas de centrifugación, entre ellos a  $5000 \times g$  por 5 minutos en gradiente Percoll, no se encontraron diferencias en la motilidad, morfología, integridad de membrana, vivos y muertos, y en las cromatinas intactos al comparar con los valores no centrifugados (Machado *et al.* 2009).

Respecto al caso del camello dromedario, una especie que tiene similares características seminales que los camélidos sudamericanos, previa centrifugación a  $18000 \times g$  por 15 min, se observaron que después de la descongelación, el porcentaje de motilidad disminuyó hasta 38.3 a 40.3%, aunque la tasa de sobrevivencia estaba entre 62.2 a 72.2% (El-Bahrawy 2010).

## **2.4 PRESERVACIÓN DE SEMEN DE LOS CAMÉLIDOS**

En general, en todas las especies, y con mayor o menor grado, durante los procesos de preservación del semen, los espermatozoides son vulnerables al lavado, la dilución, a los cambios osmóticos y a las variaciones de temperatura (Silva y Gadella 2006) como los que ocurre durante la refrigeración (Vaughan *et al.* 2003; Giuliano *et al.* 2012), criopreservación (Adams *et al.* 2009; Santiani *et al.* 2005; Aller *et al.* 2003), vitrificación (Santiani 2012), gelificación (Salvador *et al.* 2006; Yaniz *et al.* 2005; López-Gatius *et al.* 2005; Nagy *et al.* 2002), y a otras técnicas.

Como en todas las especies, en los camélidos sudamericanos se han ensayado una variedad de metodologías para conservar el semen por corto (refrigeración) y largo

tiempo (criopreservación y vitrificación). Sin embargo, dado las características del semen, aún no se han conseguido resultados satisfactorios. En otras especies, la conservación de semen a corto plazo, se ha realizado a través de la gelificación. Una breve descripción de estas técnicas y los progresos se presenta a continuación.

#### **2.4.1 Refrigeración**

A pesar de existir varios procedimientos de almacenamiento de semen a temperaturas de 0 a 5 °C, 10 a 15 °C, y a temperatura ambiental (Salamon y Maxwell 2000), en camélidos sudamericanos solo se ha ensayado la conservación de semen a temperaturas de 15 (García *et al.* 2017) y 4 (Vaughan *et al.* 2003) o 5 °C (García *et al.* 2017; Giuliano *et al.* 2012) con fines de inseminación artificial.

El procedimiento se inicia inmediatamente después de la colección de semen, después de realizar la dilución, se disminuye la temperatura del eyaculado desde la temperatura de semen colectado hasta 4 °C que se alcanza aproximadamente en 1.5 a 2 horas (Vaughan *et al.* 2003) o de 37 a 5 °C (Giuliano *et al.* 2012) para utilizarlo después de este tiempo. Ambos casos de enfriamiento proveen una disminución uniforme y lineal de la temperatura.

El otro procedimiento consiste en diluir el semen fresco a 35 °C por 10 min y disminuir la temperatura del entorno hasta 15 °C y conservarlo hasta 8 horas (García *et al.* 2017). Al respecto, los autores no informaron el tiempo que utilizaron en el enfriamiento de las muestras hasta 15 °C, ni sobre el procedimiento aplicado para este propósito.

En general, la disminución de la temperatura conlleva a reducir la tasa metabólica de los espermatozoides (Vishwanath y Shannon 2000) y la actividad de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, que reducen la capacidad de la difusión de iones a través de la membrana celular (Sweadner y Goldin 1980), lo cuales afectan la sobrevivencia prolongada de los espermatozoides. Son escasos los trabajos de refrigeración de semen de camélidos sudamericanos con los que se ha conducido protocolos de inseminación artificial, la mayoría fue realizada como parte del proceso de la criopreservación de semen.

### **2.4.2. Criopreservación**

El enfriamiento lento o rápido seguido de la congelación, constituyen las etapas de la criopreservación del semen. En el caso de los camélidos sudamericanos, se han ensayado diversas variantes en cada una de estas etapas.

El enfriamiento lento se ha realizado en 2 horas a una tasa de  $-0.14\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$  (Morton *et al.* 2007), y en 3 horas a una tasa de enfriamiento de  $-1\text{ }^{\circ}\text{C} / 3\text{ min}$  (Santiani *et al.* 2005). Existen variaciones en la temperatura máxima de enfriamiento lento, esta se realiza hasta  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Morton *et al.* 2007) o a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Santiani *et al.* 2005; Aller *et al.* 2003). En cambio, el enfriamiento rápido se ha realizado a una tasa de  $-0.55\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta llegar a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguido de un tiempo de estabilización más largo como por una hora (Canorio *et al.* 2015).

En la etapa del congelamiento para protocolos de enfriamiento rápido, se parte de la temperatura inicial de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mantenida por 5 min, se desciende de 4 a  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $3\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ , y mantenido a  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min. Seguidamente se realiza el "seeding" de las pajillas, se continua el descenso de la temperatura hasta  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $5\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ , y de  $-30$  a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  a una velocidad de  $8\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$ , y luego se colocan en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Canorio *et al.* 2015). En el enfriamiento lento, después de empacar las muestras en pajillas, se exponen a vapores de nitrógeno sobre 10 (Santiani *et al.* 2013), 8 o 4 cm (Morton *et al.* 2007) por 15 (Santiani *et al.* 2013), 10 o 5 (Morton *et al.* 2007) minutos, sobre la superficie del nitrógeno líquido. Seguidamente, las pajuelas son sumergidas en nitrógeno líquido, y luego se almacenan hasta su utilización (Morton *et al.* 2007; Santiani *et al.* 2005).

Los estudios realizados han mostrado que la crio-preservación de semen de los camélidos sudamericanos disminuyen la calidad seminal y proveen baja viabilidad a la descongelación (Adams *et al.* 2009; Santiani *et al.* 2005; Aller *et al.* 2003).

### **2.4.3. Vitrificación**

Esta técnica ha sido utilizada principalmente en la criopreservación de embriones (camellos: Herrid *et al.* 2017; ratas: Taketsuru *et al.* 2018; cerdos: Nohalez *et al.* 2018; y otros), y semen de algunos animales (caninos: Sánchez *et al.* 2011; equinos: Pérez-Marín *et al.* 2018; carnero: Arando *et al.* 2017). La técnica consiste en disminuir la temperatura

rápidamente, por este proceso la muestra pasa rápidamente del estado líquido a otro parecido al vidrio (Shaw y Jones 2003).

En los escasos reportes en el caso de los camélidos sudamericanos, aún no se ha conseguido desarrollar una técnica exitosa de vitrificación. En este contexto, Santiani (2012), realiza una descripción del proceso de vitrificación de semen de alpaca, el mismo que se indica a continuación. Una vez colectada la muestra de semen o espermatozoides, y mezclada con distintos dilutores, las muestras se mantuvieron por 5 minutos a 37 °C. La vitrificación se realiza colocando gotas (30 µL) de semen directamente al nitrógeno líquido, luego recuperadas y almacenadas en nitrógeno líquido (-196 °C). La desvitrificación se realiza retirando las esferas del nitrógeno y colocándolas en 1 mL de dilutor a 37 °C por 10 minutos.

#### **2.4.4 Gelificación**

La tecnología de gelificación de semen, utiliza la alta capacidad de los geles o gelatina de gelificarse y mantener la viabilidad de los espermatozoides por más de 5 días (Nagy *et al.* 2002; Salvador *et al.* 2006).

El poder gelificante de los geles o la fuerza del gel es determinado por su valor Bloom que oscila entre 30 a 300, esta medida refleja el peso molecular promedio de sus componentes, y cuanto más alto es este valor más alto es la intensidad de la gelificación (Hanani, 2016). Esta capacidad de gelificación de los geles y su fiable estabilidad, han sido utilizados en la conservación seminal en diferentes especies como el conejo (Nagy *et al.* 2002; López-Gatius *et al.* 2005), la cabra (Salvador *et al.* 2006), el ovino (Yaniz *et al.* 2005), obteniéndose bajas pérdidas de la calidad seminal a la desgelificación durante los primeros días después de gelificación, y una gradual pérdida conforme transcurría el tiempo de conservación.

Al respecto, López-Gatius *et al.* (2005), indica que el almacenamiento del semen en forma solidificada o en medio menos líquida reduciría la demanda metabólica necesarias para la producción de la motilidad espermática. Además, se sabe que los geles o gelatina incrementan la viscosidad del medio, lo cual afectaría al semen disminuyendo la motilidad (Hirai *et al.* 1997). Este último, caracteriza al semen de la alpaca y a los CSA dado su viscosidad y naturaleza gelatinosa (Kershaw-Young *et al.* 2012; Adams *et al.*

2009; Von Baer y Hellemann 1998; Bravo *et al.* 1997a; Fernández-Baca y Calderón, 1965), siendo relacionado con la ausencia de motilidad progresiva y presencia de motilidad oscilatoria (Garnica *et al.* 1993; Bravo *et al.* 1997a), y al parecer prolongando el tiempo de vida de los espermatozoides por algunas horas en el trato reproductivo de la hembra (Brown 2000).

En referencia a la temperatura de conservación del semen en estado sólido o gelificado, esta tecnología se ha ensayado utilizando diversas temperaturas de conservación, entre los que más destacan tenemos, la temperatura a medio ambiente utilizada por López-Gatius *et al.* (2005) y Yaniz *et al.* (2005), y la temperatura de refrigeración a 5 °C. A esta baja temperatura (5 °C), se ha conseguido conservar el semen de conejo (Nagy *et al.* 2002) hasta 72h, y se ha encontrado un mayor porcentaje de espermatozoides viables con acrosoma intacto que el control (solo dilutor) y el semen fresco, cuando fue agregado 1g de gelatina a 100 ml de dilutor. Asimismo, al conservar el semen de cabra (Salvador *et al.* 2006) a esta misma temperatura de refrigeración en un gel al 1.5% respecto dilutor, fue encontrado una motilidad del 56% hasta las 72 horas.

## **2.5 INSEMINACIÓN CON SEMEN DE CAMÉLIDOS**

### **2.5.1 Colecta de semen y espermatozoides**

Las principales técnicas ensayadas en la colecta de muestras seminales se pueden dividir en colecta de semen entero y recuperación de espermatozoides. En el primer caso, como técnicas no traumáticas de colecta de semen entero, se ha utilizado mayormente la colecta de semen utilizando una vagina artificial modificada de vacunos adosado a un maniquí (Sumar y Leyva 1981). A este grupo, pertenece también, aquella que se colecta directamente por un operador (como en la oveja o la vaca) pero en posición de copula de los camélidos para el cual se tuvo que modificar la vagina artificial comúnmente utilizada en camélidos sudamericanos (Vivanco *et al.* 2010). En las técnicas indicadas, durante las colectas se suele acompañar a la hembra con otra hembra receptiva para estimular la libido del macho (Dávalos y Olazábal 2002). Otra técnica propuesta, es aquella que se realiza inmediatamente después del empadre, una aspiración del semen depositado en el tracto reproductivo de la hembra con fines de procesamiento para I.A. (Alarcón *et al.* 2012). En todos los casos, no se producen considerables cambios en las muestras, ni efectos irreversibles en los machos, y los animales conservan su integridad física.

Entre las técnicas traumáticas de colecta de semen entero, la colecta de semen por electroeyaculación aún es utilizada en los camélidos sudamericanos (Giuliano *et al.* 2008), aunque solo con fines experimentales. En este procedimiento, la erección y la eyaculación son controladas por los nervios parasimpáticos sacros que forman los nervios pudendos pélvicos e internos (Ball 1986), los cuales son estimulados a través de descargas eléctricas de bajos voltajes (Carter *et al.* 1990).

### **2.5.2 Preparación de semen para inseminación artificial**

En la fase final del procesamiento de semen, tanto para conservar semen en fase líquida bajo refrigeración (García *et al.* 2017; Vaughan *et al.* 2003; Giuliano *et al.* 2012) o criopreservación en nitrógeno líquido (Morton *et al.* 2007; Santiani *et al.* 2013; Canorio *et al.* 2015), las muestras han sido envasados y almacenados en forma de pajillas de 0.25 ml (Santiani *et al.* 2013; Morton *et al.* 2007), pero también en pajillas de 0.5 ml (Morton *et al.* 2007; Vaughan *et al.* 2003), así como en forma de pellets (Morton *et al.* 2007).

En todos estos casos, se han utilizado dilutores que contienen o se agregan diversos aditivos, para dotar de propiedades protectivas a los espermatozoides. Entre los varios aditivos, se mencionan la yema de huevo o lecitina de soya como fuentes de lipoproteínas y componentes de alto peso molecular (Beccaglia *et al.* 2009) que protegen contra lesiones de la membrana plasmática y del acrosoma durante la exposición a bajas temperaturas (Abdel-Aziz *et al.* 2018). Adicionalmente, se agregan, antibióticos de amplio espectro como aminoglicosidos (Althouse *et al.* 2005; Aurich y Spersger 2007) y betalactámicos (Jasko *et al.* 1993; Aurich y Spersger 2007) que tienen acción frente a bacterias que se agregan durante la colecta de semen o debidas a la posición y prolongado tiempo de copula (Ghoneima *et al.* 2014); antioxidantes, que evitan altos niveles de sustancias reactivas de oxígeno y la peroxidación de lípidos producidos por el estrés de los espermatozoides (Santiani *et al.* 2013); azúcares como la glucosa y fructosa (Shahiduzzaman y Linde-Forsberg 2007) como fuente energética para prolongar la motilidad durante la conservación; crioprotectores, como el glicerol, aunque tóxico en altas concentraciones, sustituye el agua intracelular (Holt 2000) y reduce el punto de congelación extracelular (Leahy y Gadella 2011) que le brinda la capacidad de sobrevivencia a los espermatozoides después de la descongelación; y buffers, como el tris

o citrato, entre otros, que tienen la función de regular el pH (Echegaray-Torres *et al.* 2004).

### **2.5.3 Manejo de la ovulación e inseminación artificial**

#### **2.5.3.1 Inducción de la ovulación**

La inseminación es una herramienta para la mejora genética, ya que ayuda a diseminar con rapidez el material genético de importancia. Sin embargo, en la alpaca, y en los CSA esto no ha sido posible aún, debido a dificultades en el manejo y procesamiento del semen.

Las alpacas producen bajos volúmenes de semen por eyaculación (Villanueva *et al.* 2018; Garnica *et al.* 1993; Bravo *et al.* 2000b) en comparación con especies más pequeñas como el ovino o el cerdo. De manera que la deposición intracornual de semen realizado por las alpacas parece ser una adaptación para usar menos cantidad de espermatozoides en la fertilización (Brown 2000) y optimizar el bajo volumen del eyaculado. En la práctica común, en los CSA aún se realiza la I.A. como en la vaca, por lo general en forma transcervical.

A diferencia de los vacunos, la alpaca no presenta un ciclo estral, y la ovulación es inducida (San Martín *et al.* 1968; Fernández-Baca *et al.* 1970). Esta ovulación ha sido atribuida a estímulos audiovisuales y olfatorios que incluyen vocalización (Fernández-Baca *et al.* 1970), a estímulos mecánicos producidos por la penetración del pene al cérvix, a la acción de las gonadotropinas (Kauffman y Rissman 2006), a factores de la ovulación presentes en el plasma seminal (Adams y Ratto, 2001; Tanco *et al.* 2007), o a una acción combinada entre estos. Se ha estimado que la ovulación ocurre entre las 26 a 30 horas después de la copula o administración gonadotropina coriónica humana (hCG) (San Martín *et al.* 1968) que corresponde al intervalo de tiempo que transcurre desde la monta o aplicación de hormonas hasta la ovulación (San Martín *et al.* 1968; Bourke *et al.* 1995; Adams y Ratto, 2001; Ratto *et al.* 2006).

Solo los folículos dominantes de 6 a 15 mm de diámetro han mostrado capacidad para ovular (Adams *et al.* 1989, 1990; Ratto *et al.* 2003; Vaughan *et al.* 2003).

Estos folículos corresponderían a la fase de crecimiento y estática temprana del desarrollo folicular de la alpaca donde se encuentran los ovocitos con mayor probabilidad de fertilización (Ratto *et al.* 2003; Vaughan *et al.* 2003).

### **2.5.3.2 Inseminación artificial y gestación**

En los últimos años los resultados alcanzados con la inseminación vía transcervical con semen fresco han sido tasas de gestación entre 48.4% (García *et al.* 2012), 55% (Alarcón *et al.* 2012) y 28% (Apaza *et al.* 2001); con semen refrigerado 31.7% (García *et al.* 2017); y 26.36% con semen congelado (Bravo *et al.* 2000). Asimismo, en un estudio sobre inseminación artificial de alpacas donde la deposición de semen fue intracornual (Bravo *et al.* 1997a), se alcanzó una tasa de preñez de 69.2%, pero no se dio a conocer la concentración de espermatozoides en las dosis utilizadas en la inseminación.

En otras especies, en la inseminación artificial se han utilizado semen conservado en medio sólido, como en el caso del conejo (López-Gatius *et al.* 2005) donde se obtuvo 60% de preñez, aunque los resultados fueron similares con el uso de medio líquido. En la cabra, Salvador *et al.* (2006), obtuvo una tasa de preñez del 47%. En el caso de la alpaca, aun no se han experimentado trabajos con semen conservado en estado sólido, y menos se han llevado a la inseminación artificial.

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 LOCALIZACIÓN**

La investigación fue desarrollada en el Fundo Mallkini de Michell & Cia S.A., ubicada a 4200 metros de altitud en los Andes peruanos. El Fundo está localizada en el distrito de Muñani, provincia de Azángaro, departamento de Puno. En esta zona geográfica, la temperatura máxima y mínima se encuentra entre 15° y -8°C, la precipitación pluvial en 91.2 mm, y la humedad relativa promedio anual en 54.16%.

#### **3.2 ANIMALES**

En el experimento 1 y 2, se utilizaron siete alpacas machos de variedad Huacaya con fertilidad comprobada con edades entre tres a cinco años y pesos corporales entre 90 a 95 kg. En el experimento 3, se utilizaron 36 hembras multíparas de la misma variedad, con edades entre 3 a 5 años y pesos entre 60 a 70 kg. La alimentación permanente de estos animales estaba basada en pasturas naturales con predominancia de *Festuca dolichophylla*, *Mulenbergia fastigiata*, *Stipa ichu*, *Calamagrostis vicunarum*, entre las gramíneas, y *Trifolium amabili* entre las leguminosas. Durante los días de colecta de semen, los animales se encontraban pastando en potreros cercados que tenían pasturas cultivadas con *rye grass* y *trébol blanco*, y agua *ad libitum*, el cuál fue complementado con heno de avena.

#### **3.3 FASE PRE EXPERIMENTAL**

Durante dos semanas previas a la etapa experimental, los animales fueron sometidos a un periodo de acostumbamiento al manejo de personal dentro del corral, alimentación, y principalmente al proceso de colecta directa de semen utilizando una vagina artificial a través de un operador (Figura 2, y descrito más adelante).

### 3.4 FASE EXPERIMENTACIÓN

En esta investigación se ha considerado tres experimentos, el primero consistió en la separación de espermatozoides usando diferentes medios y fuerzas de centrifugación por tiempo (experimento 1), el segundo fue la conservación de semen en estado líquido y sólido a temperatura de refrigeración (5 °C) (experimento 2), y el tercero consistió en la determinación de la capacidad gestacional por inseminación artificial con semen refrigerado a 5 °C en estado sólido y líquido durante 48 horas (experimento 3).

#### 3.4.1 Experimento 1: Separación de espermatozoides por centrifugación

##### 3.4.1.1 Vagina artificial

En el proceso de recuperación de los eyaculados se ha utilizado una vagina artificial modificada por Vivanco *et al.* (2010) para la colecta directa a través de un operador, la misma que se utilizaba rutinariamente en el Fundo Mallkini & Cia S.A. (Figura 1). Esta consistía de un tubo de caucho de 24 cm de largo con un lumen mayor de 4 cm de diámetro en un extremo, y 2 cm de diámetro en el otro extremo dispuesto en forma de orificio excéntrico simulando el cérvix de la alpaca, por el cual se coloca internamente una funda recta y otra cónica, adaptándose al final de ésta un tubo colector graduado. Antes del procedimiento de colecta de semen, a la vagina artificial se le agregó agua a 50 °C que producía una temperatura interna de 38-40 °C, el cual fue cubierto con una frazadilla eléctrica a 37 °C.

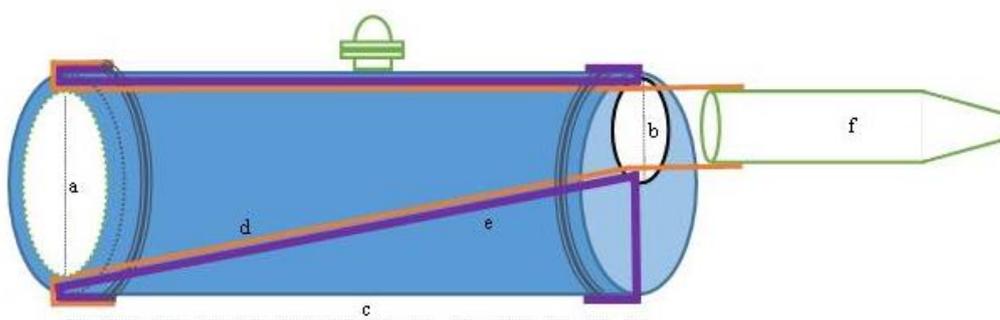


Figura 1. Vagina artificial modificada por Vivanco *et al.* (2010) para colecta de semen: a. Abertura principal del tubo de goma (4 cm de diámetro), b. Abertura del tubo excéntrico (2 cm de diámetro), c. Longitud del tubo de goma (24 cm), d. Funda de látex cónica (color naranja), e. Funda de látex recta (color morado), f. Tubo de recogida de semen.

### 3.4.1.2 Obtención de muestras

Durante la colecta de semen, la hembra y el macho estaban acompañados por otra hembra receptiva al lado (Dávalos y Olazábal 2002) que por lo general adoptaban la posición de recumbencia. La frecuencia de colecta fue de 2 a 3 veces por semana durante la época reproductiva (febrero a marzo).



**Figura 2.** Colecta de semen de alpacas por un operador que utiliza la vagina artificial modificada por Vivanco *et al.* (2010), procedimiento rutinario en el Fundo Mallkini de Michell & Cia. S.A. Véase la disposición de la vagina artificial, las posiciones de la hembra, el macho, y hembras receptoras al lado.

El procedimiento de colecta consistió en desviar el pene con la mano y dirigirlo hacia la vagina artificial (previamente descrito) en posición de recumbencia de la hembra o de monta en el caso del macho, y sostener la vagina artificial por el tiempo de cópula entre 15 a 25 minutos (Figura 2). Seguidamente las muestras obtenidas fueron trasladadas al laboratorio para su procesamiento y evaluación. Las muestras aceptadas para el análisis fueron aquellos eyaculados con motilidad mayor a 50% y concentración mayor a 80 millones/ml como fue sugerido por Niasari-Naslaji *et al.* (2007) en camellos, una especie con similares dificultades en el procesamiento del semen. De los siete machos entrenados solo 5 se acostumbraron a la colecta directa por vagina artificial. El 85% de las muestras aceptadas correspondían a eyaculados recuperados una vez por semana, los eyaculados recuperados dos veces por semana tuvieron un 50% de aceptación, y

los eyaculados recuperados tres veces por semana tuvieron un 33.3% de aceptación.

#### **3.4.1.3 Centrifugación de semen**

Previamente se realizó la preparación del gel PureSperm®80, para ello se retiró 20 ml de PureSperm100® de su propio frasco utilizando una jeringa estéril, a este frasco con 80 ml de PureSperm100® se le agregó 20 ml de PureSperm-dilutor®, el cual fue homogenizado constituyéndose una solución al 80% de gel PureSperm (PureSperm®80), seguidamente fue conservado a una temperatura de 5 °C hasta su utilización. En la preparación y conservación del PureSperm®80 se tuvieron en cuenta todas las recomendaciones del fabricante del producto.

La disposición de los gradientes de centrifugación en tubos cónicos de centrifuga (15 ml), se realizó colocando 0.5 ml del gel PureSperm®80 (previamente preparado y conservado) en la base de un primer tubo, y 0.5 de dilutor Tris en la base de un segundo tubo, utilizando una pipeta con un tip estéril en cada caso. Se utilizó otro tip estéril de pipeta para cargar 1 ml de semen, y cuidadosamente depositar en el primer tubo 0.5 ml de semen encima del gel PureSperm®80, y en el segundo tubo depositar 0.5 ml de semen encima del dilutor Tris. La centrifugación de los gradientes en cada tubo, se llevó a cabo utilizando una centrifuga (Harmonic Universal, PLC124), previo calentado de los tubos reductores a 20 °C.

#### **3.4.1.4 Recuperación de espermatozoides**

Al término de la centrifugación, en el caso del tubo con gradientes de Tris y semen, se procedió al retiro del sobrenadante (Tris y plasma seminal mezclado) utilizando una pipeta con tip esteril, el cual fue vertido en una placa de Petri para determinar la presencia de espermatozoides, quedando en la base del tubo un pellet de espermatozoides. En el caso del tubo con gradientes PureSperm®80 y semen, se retiró el plasma seminal utilizando papel absorbente, seguidamente fue retirado el PureSperm®80 y las impurezas contenidas en el tubo, a través de una pipeta con un tip estéril, dejando que la capa o estrato de espermatozoides caiga

hacia la base del tubo. Antes de realizar la absorción con papel absorbente se realizó la extracción de un tercio del sobrenadante (plasma seminal), el cuál fue vertido a otra placa de Petri para la determinación de la presencia de espermatozoides. Tanto el pellet formado en primer tubo y la capa de espermatozoides formado en el segundo, recibieron una dilución con dilutor Tris en la proporción de 1:4 (semen: dilutor) para realizar las respectivas evaluaciones.

#### **3.4.1.5 Evaluación de parámetros espermáticos**

Todas las mediciones se realizaron de acuerdo a procedimientos válidos, y previamente descritos. Los reactivos utilizados fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

La estimación de la motilidad individual se realizó siguiendo procedimientos sugeridos (Kershaw-Young and Maxwell 2011; WHO 2010; Morton *et al.* 2007; Santiani *et al.* 2005). Brevemente, una gota de 10  $\mu$ l de semen se colocó en una lámina portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos (18  $\times$  18 mm), los cuales se colocaron sobre una platina térmica a 38 °C para observar a 400x en un microscopio óptico (Olimpus CX31, Hamburg, Germany). El conteo de la motilidad se realizó en 200 espermatozoides con tres réplicas, y los valores se expresaron en porcentaje.

La evaluación de la integridad funcional de la membrana, se realizó colocado una gota de solución HOST-cultivada sobre una lámina portaobjetos, el cual fue cubierto con un cubreobjetos para hacer el conteo de espermatozoides positivos a la endosmosis a través de un microscopio óptico con una magnificación de 400x. La solución HOST-cultivada se consiguió mezclando 10  $\mu$ l de semen con 0.1 ml de solución hipo-osmótica (Jeyendran *et al.* 1984) en un tubo, lo cuál fue incubado a una temperatura de 38 °C por 15 min en baño María (Vasquez *et al.* 2012). La solución hipo-osmótica fue preparado mezclando 735 mg de citrato de sodio dihidratado y 1351 mg de D-Fructosa, disuelto en 100 ml de agua bidestilada (WHO 2010), equivalente a 125 mOsm/l.

La integridad acrosomal fue medido a través de la técnica triple tinción sugerido por Kovács y Foote (1992) y adaptada para llamas por Fumuso (2015) y Carretero

*et al.* (2015). Brevemente, sobre un portaobjetos fue colocado 10  $\mu$ l de una muestra seminal y 10  $\mu$ l del colorante Azul tripán, luego homogenizado, extendido y secado al aire. El fijado de la muestra con el colorante Rojo neutro se realizó cubriendo el portaobjetos con este colorante durante 2 min y enjuagado con agua destilada. Seguidamente se realizó el teñido con el colorante Giemsa al 8%, para lo cual se cubrió el portaobjetos con el colorante durante 1.5 h, luego fue sumergido durante 2 min en agua destilada, enjuagado, secado del portaobjetos al aire y observado a 1000x con aceite de inmersión. Los espermatozoides fueron categorizados, como vivos con membranas íntegras y con acrosoma presente (región posacrosomal celeste o azul claro y acrosoma púrpura), vivos con acrosoma dañado o suelto (región posacrosomal celeste o azul claro y acrosoma claro u oscuro), muertos con acrosoma presente (región posacrosomal azul oscuro y acrosoma púrpura) y muertos con acrosoma dañado o suelto (región posacrosomal azul oscuro y acrosoma violeta claro u oscuro).

Asimismo, se determinó la tasa de recuperación de espermatozoides, para lo cual se utilizó la concentración espermática inicial medido en el momento inmediatamente después de la colecta de semen y la concentración espermática final medido inmediatamente después de la centrifugación, utilizando la fórmula siguiente,  $|\text{tasa de recuperación de espermatozoides}| = [(\text{Concentración final} - \text{Concentración inicial}) / \text{Concentración inicial}] \times 100$ . Utilizando el mismo procedimiento fue estimado la tasa de disminución de la motilidad espermática, y de la integridad funcional de la membrana. La estimación de la concentración espermática (número de espermatozoides por unidad de volumen) fue realizado utilizando la cámara o hemocitómetro de Neubauer. Previamente, se preparó una dilución 1:20 de semen y agua; es decir en un tubo que previamente se había colocado 190  $\mu$ l de agua, se depositó 10  $\mu$ l de muestra de semen. De esta dilución se tomó 10  $\mu$ l de muestra para realizar el conteo en la cámara de Neubauer (WHO 2010). La concentración de espermatozoides por ml se obtuvo al multiplicar por el factor  $1 \times 10^6$  la suma del conteo de 5 cuadrados grandes.

### 3.4.1.6 Diseño experimental

Los eyaculados se obtuvieron en forma aleatoria de un grupo de cinco machos reproductores que respondieron favorablemente al entrenamiento de la colecta directa de semen a través de un operador.

Inmediatamente después de una colecta, el eyaculado fue sometido a una evaluación de condiciones de inclusión en el experimento (Niasari-Naslaji *et al.* (2007): motilidad mayor a 50% y concentración mayor a 80 millones/ml). Si el eyaculado fue admitido, esta fue dividido en dos fracciones de 0.5 ml cada uno.

A cada uno de estas fracciones se les aplicó uno de los diferentes tratamientos resultantes de la combinación de 2 factores, fuerza de centrifugación (g)  $\times$  tiempo en tres niveles (492 g  $\times$  15 min, 1968 g  $\times$  10 min y 4448 g  $\times$  7 min o su equivalente 2000, 4000 y 6000 RPM, respectivamente, en 110 mm de radio de rotor) y medio de centrifugación en dos niveles (dilutor Tris, y gel PureSperm®80). De esta manera se procedió con cada uno de los eyaculados hasta completar las muestras necesarias para el experimento. En cada corrida de la centrifuga, solo se consideró la centrifugación de un solo tubo que tenía asignada un tratamiento con su respectivo equilibrante, el otro tubo asignado con diferente tratamiento se hizo tiempo después (15, 10 y 7 min) de terminar la corrida previa.

La evaluación de la motilidad individual, la integridad funcional de la membrana y la concentración espermática se realizó antes y después de centrifugación, con esta información se estimaron las tasas de recuperación de espermatozoides, la tasa de pérdida de motilidad individual y la tasa de pérdida de la integridad funcional de la membrana espermática. En el caso de la integridad acrosomal esta se realizó solo después de la centrifugación debido a su largo periodo de procesamiento y rápida lectura. El análisis de cada parámetro espermático se realizó utilizando 8 réplicas.

Los valores de la recuperación de espermatozoides, pérdidas de motilidad e integridad funcional de membrana fueron transformados a valores angulares (ángulo =  $\arcsen \sqrt{x}$ ) para acercar los datos a la distribución normal.

### 3.4.1.7 Análisis estadístico

Las variables respuestas, recuperación de espermatozoides, pérdida de motilidad espermática y pérdida de integridad funcional de membrana fueron evaluados bajo un diseño completo al azar con arreglo factorial de 3 x 2, cuyo modelo aditivo lineal fue:

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad i = 1, 2, \dots, a \quad j = 1, 2, \dots, b \quad k = 1, 2, \dots, r$$

donde:

- $\gamma_{ijk}$  = Variable observada (recuperación de espermatozoides, pérdida de motilidad, pérdida de integridad funcional de membrana)
- $\mu$  = Media general
- $\alpha_i$  = Efecto del i-esimo nivel del factor fuerza de centrifugación por tiempo (1: 492 g × 15 min, 2: 1968 g × 10 min, y 3: 4448 g × 7 min)
- $\beta_j$  = Efecto del j-esimo nivel del factor medio de centrifugación (1:Tris, y 2:PureSperm®80)
- $(\alpha\beta)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre el i-esimo nivel del factor fuerza de centrifugación por tiempo, y el j-esimo nivel del factor medio de centrifugación.
- $\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental asociado a la ijk-esima unidad experimental

Asimismo, se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significación del 5% para contrastar diferencias entre las combinaciones de medios y fuerzas de centrifugación.

El procesamiento y análisis de datos se realizó utilizando el software estadístico SAS V.9.4 para Windows.

### **3.4.2 Experimento 2: Conservación de semen en medio sólido y líquido a 5 °C.**

#### **3.4.2.1 Preparación de dilutores y gelificante**

El dilutor Tris-Yema de huevo fue preparado usando 3.605 g de Tris, 2.024 g de ácido cítrico dihidratado, 1.488 g de fructosa, 50,000 IU de Penicilina y agua bidestilada csp 100 ml, y 20% v/v de yema de huevo. La preparación fue vertida en una probeta de 100 ml, luego mezclado y conservado bajo refrigeración a 5 °C.

La preparación del gelificante fue realizada agregando 0.5 g de gelatina de 280 °Bloom (Esquisa SAC, Perú) a 10 ml de dilutor Tris (previamente preparada), seguidamente fue calentada en baño María a 37 °C en un tubo de ensayo de 15 ml, lo cual permitió su homogenización completa, luego fue enfriado hasta su gelificación en aproximadamente 30 min, seguidamente fue refrigerado a 5 °C en estado sólido hasta su utilización.

Antes de la utilización del gelificante durante el proceso de gelificación del semen, esta fue calentado en baño María a 37 °C hasta llegar al estado gel (se encontraba en estado sólido), luego enfriado y mantenido a 15 °C hasta el momento de su utilización.

#### **3.4.2.2 Dilución, gelificación y degelificación de espermatozoides**

La preparación de la vagina artificial, la colección de las muestras, el traslado de las muestras al laboratorio, la selección de eyaculados, la centrifugación de semen a  $4448 \times g$  por 5 min utilizando medios como PureSperm®80 y dilutor Tris, y la recuperación de espermatozoides de los respectivos tubos de centrifugación, todos fueron realizados de acuerdo a lo descrito en el experimento 1.

Después de la separación de espermatozoides del plasma seminal y el dilutor o el PureSperm®80, según sea el caso, tanto el tubo que contenía el pellet (tubo A) o aquel semen que fue centrifugado en dilutor Tris, y el tubo que contenía una capa de espermatozoides (tubo B) o aquel que fue centrifugado en PureSperm®80, fueron diluidos en dilutor Tris-Yema de huevo (preparado previamente), y gelificados utilizando el gelificante previamente preparado. La dilución, se realizó agregando a los tubos A y B, dos de las tres partes del volumen total de dilutor

Tris-Yema de huevo estimado para el número de dosis. Estos tubos con semen diluido, en seguida fueron refrigerados hasta alcanzar la temperatura de 15 °C en un tiempo de 60 min. A esta misma temperatura, a cada uno de los tubos A y B que tenían dilutor Tris-Yema de huevo, se le agregó el gelificante previamente calentada y conservado como gel a 15 °C, en la faltante proporción de uno de las tres partes, luego fueron agitados suavemente con movimientos circulares hasta su completa homogenización. Seguidamente, se realizó el respectivo empajillado y sellado con alcohol polivinílico en pajillas de 0.25 ml. El paso de la fase de gelificación al estado sólido se produjo en un tiempo cercano a 35 min de mezclado con el respectivo gelificante. Inmediatamente después fue refrigerado a 5 °C y conservado a esta temperatura durante cinco días. Un tubo C que solo contenía semen directamente colectado (no centrifugado, ni mezclado con gelificante) fue diluido utilizando Tris-Yema de huevo en la proporción de 1:4, el cual en el transcurso de una hora fue descendido a la temperatura de 15 °C, luego se realizó el empajillado y sellado en pajillas de 0.25 ml, seguidamente fue refrigerado a 5° hasta por 5 días, los cuales se utilizaron como control.

La degelificción se realizó calentando la pajilla en baño de agua a 37 °C durante 3 min., y luego se llevaron a diferentes procesos de evaluación de semen, como previamente fueron descritos.

### **3.4.2.3 Diseño experimental**

Un total de 18 eyaculados que provenían aleatoriamente de siete machos reproductores fueron asignados a uno de tres tratamientos. Cada uno de estos tratamientos fueron realizados con 6 réplicas. Un primer tratamiento (Pusp-gelificado) consistió en la centrifugación de las muestras a  $4\ 448 \times g$  por 7 min en medio PureSperm®80, recuperado, diluido, gelificado en gelatina de 280 °Bloom y conservado bajo refrigeración en pajillas de 0.25 ml a 5° C durante cinco días. En el segundo tratamiento (Tris-gelificado), las muestras fueron centrifugados en medio Tris; y conforme el tratamiento uno, fueron sometidos a la misma fuerza de centrifugación por tiempo, y a los mismos procedimientos de gelificación y conservación. Un tercer tratamiento (control), consistió del uso de semen fresco colectado que no fue centrifugado, pero si mezclado con dilutor Tris-Yema de huevo y conservado bajo refrigeración como en los tratamientos anteriores. Cada

uno de estos eyaculados de individuos que habían recibido uno de los tres tratamientos fueron evaluados a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 horas) cada 24 horas. Las variables respuesta de este experimento fueron la motilidad individual y la funcionalidad integral de membrana espermática.

Previo al análisis estadístico, los datos obtenidos como respuesta se transformaron a valores angulares (ángulo = arcoseno  $\sqrt{x}$ ) por encontrarse en porcentajes y para acercar los datos a la distribución normal.

### 3.4.2.4 Análisis estadístico

Las respuestas sobre los parámetros espermáticos, motilidad y funcionalidad integral de la membrana espermática fueron evaluadas bajo un modelo mixto para medidas repetidas con dos factores y su interacción (Littell *et al.* 2006) a través del procedimiento Proc Mixed y la instrucción Repeated implementado en el software estadístico SAS V.9.4

Siendo el modelo aditivo lineal:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + Y_k + (\alpha Y)_{ik} + u_{ij} + e_{ijk}$$

donde:  $Y_{ijk}$  = es la respuesta a la hora  $k$  para el  $j$ -ésimo sujeto en el  $i$ -ésimo tratamiento

$\mu + \alpha_i + Y_k + (\alpha Y)_{ik}$  = son efectos fijos:  $\mu$  = es la media general,  $\alpha_i$  = es el efecto de los tratamientos (Pusp-gelificado, Tris-gelificado y Contro),  $Y_k$  = es el efecto de las horas (0, 24, 48, 72 y 90),  $(\alpha Y)_{ik}$  = es el efecto de la interacción tratamientos  $\times$  horas

$u_{ij}$  = es el efecto aleatorio correspondiente al  $j$ -ésimo sujeto en el  $i$ -ésimo tratamiento

$e_{ijk}$  = es el error experimental aleatorio asociado con las medidas repetidas

Para determinar los tres niveles del tratamiento se ha utilizado comparaciones múltiples (Tukey) con valores p corregidos (Bonferroni).

### **3.4.3 Experimento 3. Capacidad gestacional del semen en estado líquido y sólido.**

#### **3.4.3.1 Animales**

En este experimento, se ha utilizado 36 hembras Huacaya adultas y 7 machos adultos reproductores, todos los animales tenían fertilidad comprobada.

#### **3.4.3.2 Preparación de las muestras de semen**

La colecta de semen, el traslado de las muestras al laboratorio, las evaluaciones previas, la centrifugación del semen en medio PureSperm® a 4448 g × 7 minutos y la separación del semen centrifugado, han sido realizados siguiendo los procedimientos indicados en el experimento 1. En cambio, la preparación del gelificante, el proceso de gelificación de semen, el empajillado y la desgelificación de las muestras empajilladas se realizaron de acuerdo al procedimiento indicado en el experimento 2.

#### **3.4.3.3 Inducción de la ovulación**

Solo las hembras que mostraban posición de copula frente a la presencia de macho fueron seleccionadas para la inducción de la ovulación. Estas hembras seleccionadas recibieron una dosis de 1 ml de análogo de GnRH (0.0084 mg de acetato de buserelina), vía intramuscular. Antes de la aplicación de la dosis hormonal se realizó un examen folicular por ecografía para determinar el tamaño del folículo ovulatorio. Cuando el tamaño del folículo estaba entre 7 mm (Ratto *et al.* 2006, 2011; Bravo *et al.* 1991) a 12 (Ratto *et al.* 2006; Bravo *et al.* 1991) fue considerado apto para inducción de la ovulación.

#### **3.4.3.4 Inseminación artificial de alpacas**

La degelificación de pajillas se realizó en baño María a 37 °C por 3 min. La dosis de inseminación artificial (I.A.) fue  $25 \times 10^6$  espermatozoides en pajillas de 0.25ml. La hora de inseminación fue a las 26-28 horas después de la inducción de

la ovulación. Antes del procedimiento de I.A. se aplicó una dosis de tranquilizante (0.1 mg/KPV de Acepromazina maleato) con el objeto de tranquilizar a los animales.

El lugar del depósito de semen en los tratamientos de inseminación artificial fue el cuerno ipsilateral donde fue detectado la ovulación.

#### **3.4.3.5 Diagnóstico de gestación**

La estimación de la capacidad gestacional de los tratamientos se realizó a los 30 días después de inseminación artificial o empadre controlado de acuerdo con García *et al.* (2017), Ordoñez *et al.* (2013) y Alarcón *et al.* (2012). El diagnóstico de preñez se ha realizado por ultrasonografía utilizando un ecógrafo (SonoTouch10Vet, Germany) equipado con un transductor lineal de 7.5 MHz. La presencia de la vesícula embrionaria en el útero fue un criterio para considerar a un animal como preñada (Alarcón *et al.* 2012).

#### **3.4.3.6 Diseño experimental**

Un total de 36 animales hembras fueron utilizados en tres tratamientos de 12 repeticiones. El tratamiento 1, fue considerado grupo control, donde fue realizado el empadre controlado a 12 hembras con machos de probada fertilidad tomadas al azar del mismo grupo. El tratamiento 2, consistió de la inseminación a 12 hembras con pajillas de semen refrigerado a 5 °C durante 48 horas en medio líquido (diluido en dilutor Tris-Yema de huevo) que en su procesamiento fue centrifugado a  $4448 \times g$  por 7 min y en medio de protección PureSperm®80. En el tratamiento 3, se realizó la inseminación artificial a otras 12 hembras con pajillas de semen refrigerado a 5 °C durante 48 horas en medio sólido (gelificado en gelatina de 280 °Bloom), donde en su procesamiento fue sometido a una fuerza de centrifugación y medio de protección similar al tratamiento 2.

#### **3.4.3.7 Análisis estadístico**

Los resultados del experimento, fueron analizados utilizando una regresión logística binomial para datos cualitativos a través del procedimiento Proc Genmod

(García *et al.* 2017; Alarcón *et al.* 2012) y la sentencia Contrast del software estadístico SAS V.9.4 para Windows.

El modelo general empleado ha sido:

$$p_i = \frac{y_i}{n_i} = \frac{1}{1 + \exp[-(\beta_0 + \beta_1 \chi_i)]} \quad i = 1,2,3$$

donde:

$p_i$  = Proporción entre alpacas preñadas ( $y_i$ ) después de la exposición a diferentes tratamientos ( $n_i$ )

$\chi_i$  = Tratamientos (1: control, 2: I.A. con semen en estado líquido refrigerado, 3: I.A. con semen sólido refrigerado)

$\beta_0$  = Intercept

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 EXPERIMENTO 1: SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES POR CENTRIFUGACIÓN

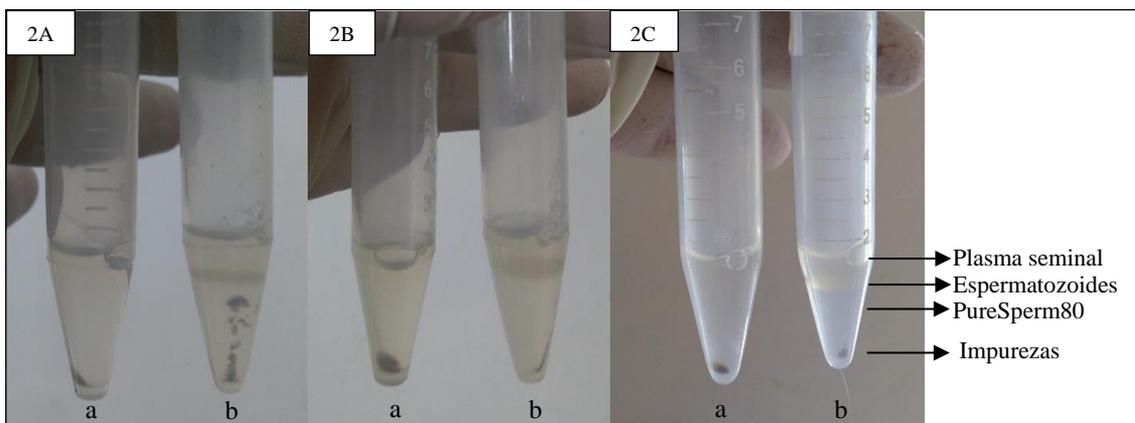
**Disposición de espermatozoides después de la centrifugación.** En la alpaca, especie que produce un eyaculado muy viscoso (Adams *et al.* 2009; Von Baer y Hellemann 1998; Bravo *et al.* 1997a; Fernández-Baca y Calderon 1965), la implementación de métodos prácticos de campo para la inseminación artificial es extremadamente difícil y de bajos resultados (Alarcón *et al.* 2012; Bravo *et al.* 2000b). En un intento por superar los obstáculos creados por la naturaleza viscosa del plasma seminal, se ha investigado la centrifugación a diferentes combinaciones de fuerzas de centrifugación por tiempo en distintos medios de centrifugación como una estrategia para aislar espermatozoides con el menor daño posible. Comparamos un diluyente tradicional (dilutor Tris) contra una solución de gradiente de densidad de una sola capa (PureSperm®80), como medios de centrifugación, donde los eyaculados de alpaca en estos medios se centrifugaron en una de tres combinaciones diferentes de fuerzas de centrifugación por tiempo, los cuales produjeron un pellet de espermatozoides en el fondo del tubo de centrífuga (medio dilutor Tris) o un estrato de espermatozoides (medio PureSperm®80) según sea el caso, como se muestra en la Figura 3 (Panel 2C, letras a y b).

Después de la centrifugación del semen de alpaca en diferentes medios y fuerzas de centrifugación, se observaron diferentes disposiciones de los espermatozoides en los tubos centrifugados. Cuando el semen fue centrifugado en medio dilutor Tris a diferentes fuerzas de centrifugación (Figura 3, a en paneles 2A, 2B y 2C), en el fondo del tubo se encontró un pellet de espermatozoides bien definido junto a la presencia de impurezas, rodeado por la mezcla de plasma seminal y dilutor Tris. En el caso del semen centrifugado

en medio PureSperm®80, se observaron tres estratos con diferente composición dentro del tubo. El medio PureSperm®80 que contenía impurezas estaba ubicada en el estrato inferior, los espermatozoides en el medio, y el plasma seminal en el estrato superior (Figura 3, b en paneles 2A, 2B y 2C).

La baja fuerza de centrifugación del semen ( $492 \times g$  por 15 min) en la solución de gradiente de densidad PureSperm®80 produjo un estrato difuso de espermatozoides, así como ubicaciones de impurezas altamente dispersas (Figura 3, b en panel 2A). Sin embargo, a medida que la fuerza de centrifugación aumentaba, pero el tiempo de centrifugación se reducía llegando a  $4448 \times g$  por 7 min, se formaba un estrato bien definido de espermatozoides con separación total de impurezas (Figura 3, b en panel 2C).

Similar disposición de espermatozoides después de la centrifugación fue encontrado por Morton *et al.* (2008), aunque utilizando baja fuerza de centrifugación por largo tiempo ( $600 \times g$  por 20 min) en medio PureSperm® de dos gradientes de diferente densidad. Es posible, en el caso de baja fuerza de centrifugación (Figura 3, panel 2A, b) en medio PureSperm®80 de una sola capa, la viscosidad del plasma seminal no permita la separación completa de los espermatozoides del semen y consiguientemente, la formación de estratos según diferencias de gradiente, tal como fue sugerido por Ming-Jer y Bongso (1999). En cambio, la utilización de alta fuerza de centrifugación permitió la separación de espermatozoides del plasma seminal y su respectiva estratificación completa (Figura 3, panel 2C, b).



**Figura 3.** Disposición de espermatozoides poscentrifugación en diferentes medios y fuerzas de centrifugación por tiempo. Nótese en los paneles 2A, 2B y 2C la disposición de espermatozoides a  $492 \times g$  por 15 min,  $1968 \times g$  por 10 min, y  $4448 \times g$  por 7 min, respetivamente. Letras minúsculas en cada panel, representan a los medios de centrifugación (a, medio dilutor Tris, y b, medio PureSperm80).

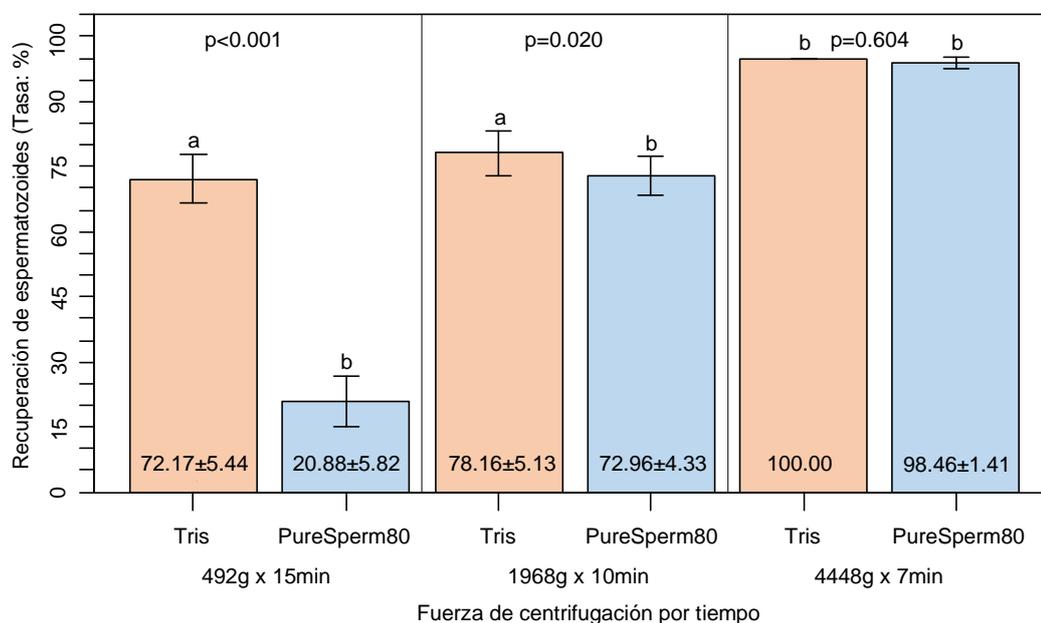
El procedimiento de retiro de espermatozoides después de la centrifugación en medio dilutor Tris, donde los espermatozoides se encontraban en forma de pellet dentro de la mezcla plasma seminal y dilutor Tris, se llevó a cabo fácilmente utilizando una pipeta. Sin embargo, se encontraron dificultades para aislar el estrato de espermatozoides formado después de la centrifugación en una solución de gradiente de densidad PureSperm®80, una dificultad similar en el retiro del semen fue reportado por Morton *et al.* (2008). Frente a este problema, se utilizó papel absorbente estéril, el cuál fue introducido perpendicularmente al tubo hasta tomar contacto con el estrato de plasma seminal. Cuando el papel absorbente estéril absorbió casi todo el plasma seminal del estrato superior del tubo centrifugado, este fue retirado.

Aunque al final de este procedimiento habíamos dejado restos de plasma seminal en la parte superior del estrato de espermatozoides y restos de PureSperm®80 en la parte baja del mismo (no queríamos eliminar los espermatozoides por error), estos remanentes aparentemente no afectaron a los espermatozoides. Contrariamente estaría relacionado con los efectos favorables sobre los espermatozoides producidos por la baja presencia de plasma seminal en el semen de alpaca. Al respecto, Kershaw-Young y Maxwell (2011) observaron que la incubación de espermatozoides en altos porcentajes de plasma seminal producía daño celular, pero en un 10% de plasma seminal mejoró la motilidad de los espermatozoides.

**Recolección de semen por vagina artificial.** En el presente estudio, donde se recolectó semen directamente con una vagina artificial (Figura 1) a través de un operador (Figura 2), los valores iniciales medios de motilidad del esperma (53.6 a 61.6%), integridad funcional de la membrana (65.5 a 72.6%) y concentración de esperma (102.1 a 130.4 millones / ml) se encontraban en el rango de la motilidad (Bravo *et al.* 1997a, 2000b; Alarcón *et al.* 2012; Raymundo *et al.* 2006; Santiani *et al.* 2005), concentración (Bravo *et al.* 1997a; Alarcón *et al.* 2012) e integridad funcional de la membrana plasmática (Pacheco *et al.* 2017; García *et al.* 2017), que habían sido obtenidos utilizando una vagina artificial adosado a un maniquí. Además, en los resultados obtenidos por Vivanco *et al.* (2010) en un trabajo inédito en alpacas, utilizando la misma técnica de colección de semen utilizada en la presente investigación, reveló una motilidad espermática similar ( $57.1 \pm 17.6\%$ ), aunque con una variación en la concentración de espermatozoides ( $39.8 \pm 34.4 \times 10^6$  espermatozoides / ml). Al respecto, no se puede pasar por alto el hecho de que los parámetros espermáticos pueden variar con el tipo de dieta (Juyena *et al.* 2013), la

frecuencia de la recolección de eyaculados (Bravo *et al*, 1997b), el tipo de recolección de semen (Alarcón *et al*. 2012), la presencia de la hembra receptiva durante la copulación (Dávalos y Olazával 2002), entre otros factores.

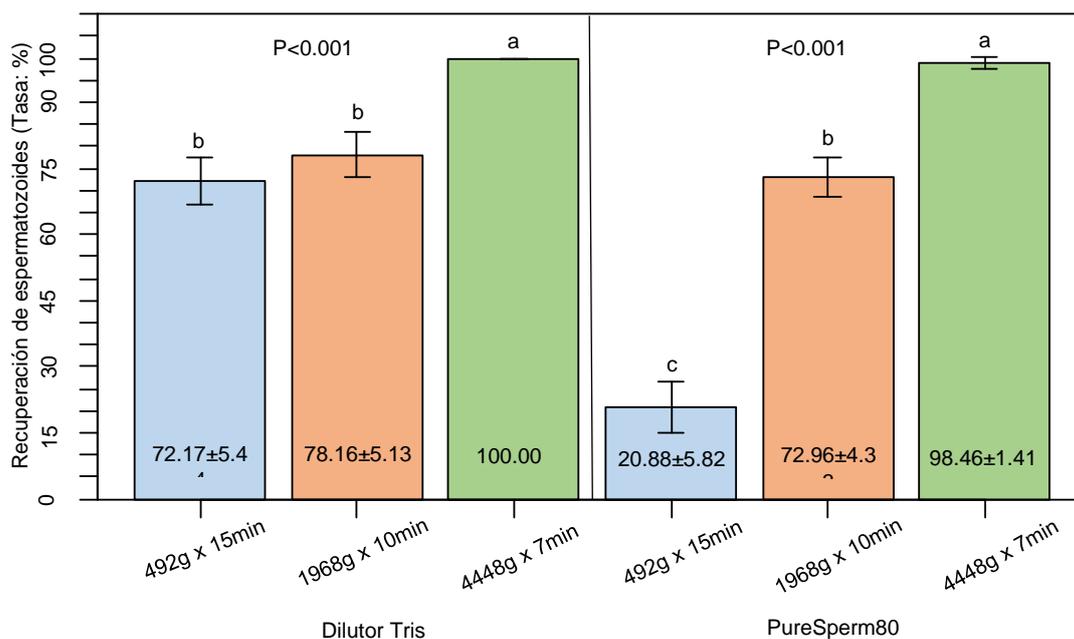
**Recuperación de espermatozoides.** La tasa de recuperación de espermatozoides después de la centrifugación a diferentes fuerzas de centrifugación y en diferentes medios, mejoró conforme aumentaba la fuerza de centrifugación y disminuía el tiempo en ambos medios de centrifugación (Figura 4).



**Figura 4.** Tasa de recuperación espermática segregada por fuerza de centrifugación por tiempo. Los números dentro de cada barra representan tasas medias de recuperación de espermatozoides.

Existen algunos reportes de recuperación de espermatozoides de alpaca utilizando diferentes medios, aunque a bajas fuerzas de centrifugación en menor o mayor tiempo. En este contexto, al utilizar el dilutor Androhep® como medio de centrifugación a 600 × g por 7 min, la tasa de recuperación alcanzó solo 63%, siendo dificultoso recuperar el sobrenadante espermático debido a la no licuefacción del semen (Morton *et al*. 2012). Cuando se utilizó 600 × g durante 20 minutos en una solución de gradiente de densidad (PureSperm®) de doble capa (45%:22.5%), se consiguió una tasa de recuperación de espermatozoides del 70%, acompañada de una baja pérdida de motilidad espermática

(3.6%) (Morton *et al.* 2008). Los valores de recuperación de espermatozoides reportados por Morton *et al.* (2012) están cercanos a los observados en la presente investigación cuando se centrifugó el semen a  $492\text{ g} \times$  por 15 minutos en medio Tris (72.17%), pero fue menor cuando fue centrifugado en PureSperm (20.88%) a la misma fuerza de centrifugación por tiempo. Al respecto Morton *et al.* (2008) no indica la técnica de retiro del estrato de espermatozoides del tubo poscentrifugación.



**Figura 5.** Tasa de recuperación espermática segregada por medio de centrifugación. Los números dentro de cada barra representan las tasas medias de recuperación de espermatozoides.

Cuando se utilizó alta fuerza de centrifugación (Figura 5) como  $4448 \times \text{g}$  por 7 minutos en medio PureSperm®80, se consiguió una tasa de recuperación de espermatozoides del 98% con una baja pérdida de la motilidad de los espermatozoides (3,5%) como se muestra en la Figura 6; por lo que sabemos, este sería el primer informe de un método donde los espermatozoides de alpaca se recuperaron casi completamente de los eyaculados con cambios mínimos en la motilidad y la integridad funcional de la membrana de los espermatozoides (datos descritos a continuación). La centrifugación de semen en altas fuerzas de centrifugación también se ha utilizado en otras especies. En el caso de bovinos, la centrifugación a  $3220 \times \text{g}$  por 5 min ha sido útil para remover los precipitantes en algunas etapas del procesamiento de semen (Weber *et al.* 2006). Sin embargo, cuando Machado *et al.* (2009) aumentó la fuerza de centrifugación a  $5000 \times \text{g}$  por 5 min en medio

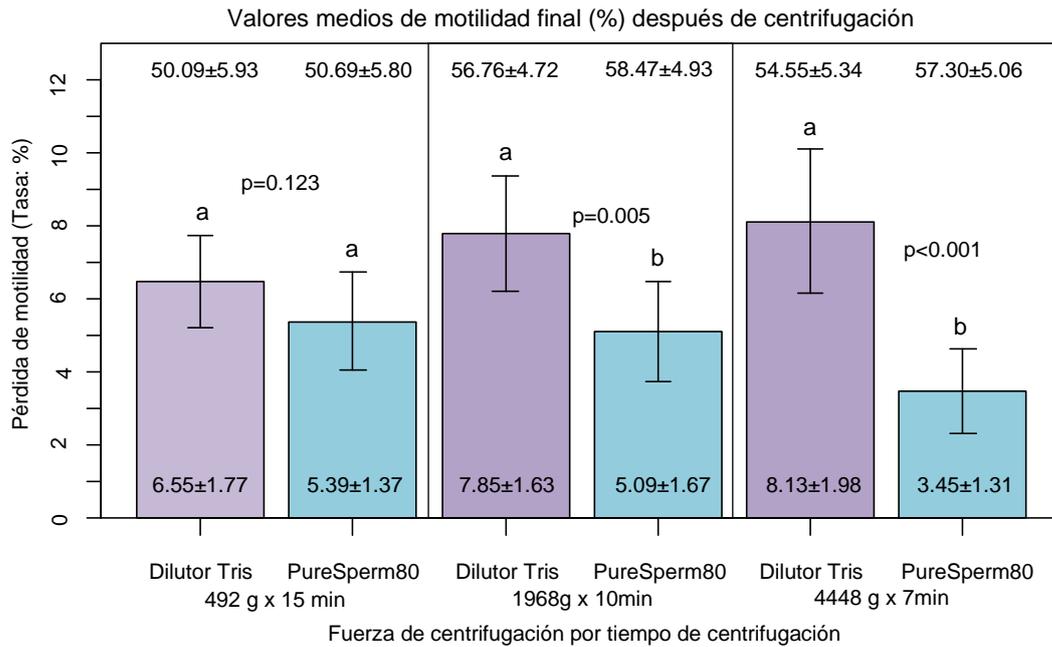
gel, observó que el procedimiento no afectaba la calidad de los espermatozoides, aunque se obtuvo una tasa de recuperación baja (17.0 a 19.2%). Del mismo modo, después de centrifugar semen de bovino en gradiente de Percoll a  $5400 \times g$  por 5 minutos, se consiguió recuperar espermatozoides a una tasa del 49.7% con características espermáticas que conllevaron exitosamente al proceso de fertilización *in vitro* y desarrollo embrionario (Carvalho *et al.* 2010). En un caso extremo, cuando se centrifugó a  $9000 \times g$  por 5 minutos en gradientes mini Percoll, se ha recuperado espermatozoides con una tasa cercana al 50%, aunque con características espermáticas muy variadas (Folchini *et al.* 2012).

Una combinación de fuerza de centrifugación por tiempo de  $4448 \times g$  por 7 minutos, permitió altas tasas de recuperación de espermatozoides del 98.46% y 100% para los eyaculados centrifugados en solución de gradiente de densidad PureSperm®80 y medio dilutor Tris, respectivamente, aunque ambas tasas fueron similares (Figura 4;  $p = 0.604$ ). Agrupados por medio de centrifugación, la tasa de recuperación de espermatozoides aumentó ( $p < 0.001$ ) a medida que la fuerza de centrifugación aumentaba (con una disminución concomitante en el tiempo) en los medios dilutor Tris y PureSperm®80 (Figura 5).

La alta viscosidad del semen de alpaca, los bajos cambios en las características espermáticas después de una alta fuerza de centrifugación por corto tiempo en medios protectores, la posibilidad de aislar espermatozoides con la menor pérdida en la recuperación poscentrifugación y el bajo volumen del eyaculado, motivaron a realizar la centrifugación del semen de alpaca a una alta fuerza de gravedad, pero por corto tiempo utilizando un medio de protección (PureSperm®80).

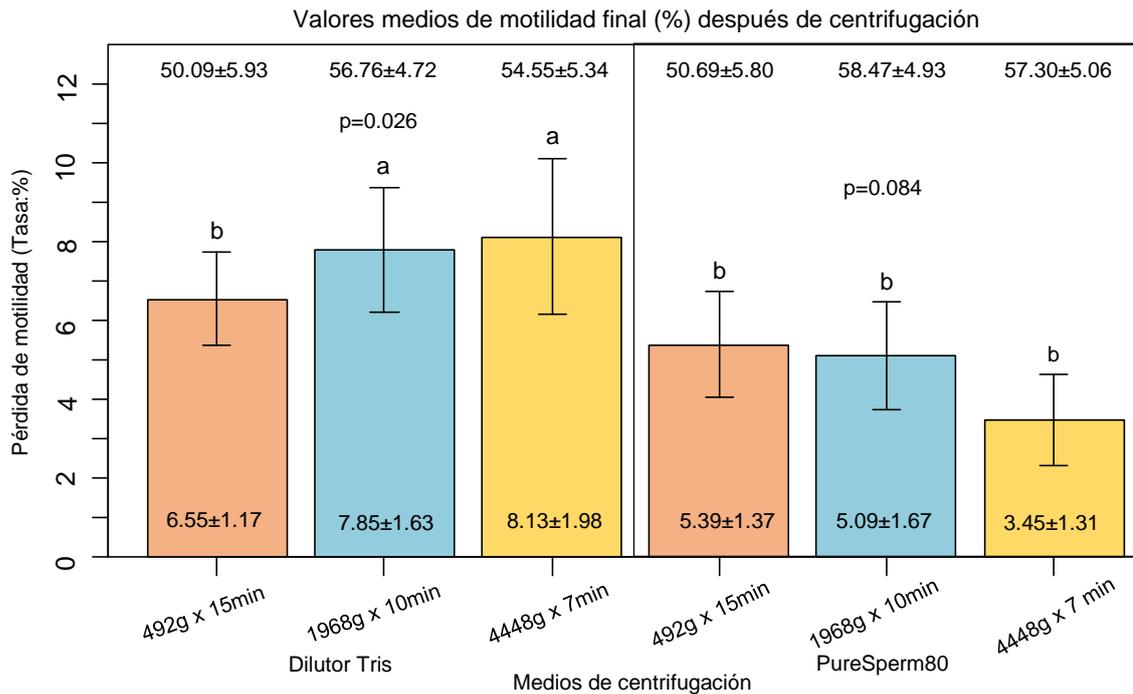
**Motilidad de espermatozoides.** En el análisis de la pérdida de motilidad por medios de centrifugación dentro de fuerzas de centrifugación por tiempo (Figura 6), los eyaculados centrifugados en medio PureSperm®80 mostraron una menor pérdida, tanto a  $1968 \times g$  por 10 min ( $p = 0.005$ ) como a  $4448 \times g$  por 7 min ( $p < 0.001$ ) que los centrifugados en medio dilutor Tris. En cambio, en los eyaculados centrifugados a  $492 \times g$  por 15 min, se observaron similares pérdidas de motilidad en ambos medios de centrifugación ( $p = 0.123$ ). Respecto a la pérdida de motilidad por fuerzas de centrifugación dentro de los medios (Figura 7), cuando el semen fue centrifugado en dilutor Tris a mayor fuerza de centrifugación aunque por menor tiempo cada vez, la pérdida de motilidad aumentaba

(6.55 a 8.13%;  $p=0.026$ ), aunque no considerablemente; sin embargo, cuando se utilizó un medio protector en la centrifugación (PureSperm®80), este produjo una baja pérdida de la motilidad tal como 5.39, 5.09 y 3.45% a  $492 \times g$  por 15 min,  $1968 \times g$  por 10 min y  $4448 \times g$  por 7 min, respectivamente ( $p=0.084$ ).



**Figura 6.** Pérdida de motilidad de espermatozoides por fuerza de centrifugación por tiempo. Números dentro de barras denotan tasas medias de pérdida de motilidad poscentrifugación. Números sobre las barras representan medias de la motilidad poscentrifugación de semen.

La motilidad de los espermatozoides es el parámetro más susceptible a condiciones microambientales dañinas que cualquier otra característica asociada con la viabilidad de los espermatozoides (Monteiro *et al.* 2013; Soler *et al.* 2003). En la alpaca, la motilidad estuvo altamente relacionada en forma positiva ( $r = 0.96$ ) con la viabilidad de los espermatozoides (Santiani *et al.* 2005), y en especies como el equino, la motilidad tenía una correlación muy alta ( $r = 0.98$ ) con la viabilidad espermática (Love *et al.* 2003).



**Figura 7.** Pérdida de motilidad de espermatozoides por medios de centrifugación. Números dentro de barras denotan tasas medias de pérdida de motilidad poscentrifugación. Números sobre las barras representan medias de la motilidad poscentrifugación.

En varias especies, se ha evaluado el efecto de la centrifugación de semen a bajas fuerzas de centrifugación sobre la motilidad espermática utilizando medios con similares propiedades al dilutor Tris. Una disminución de la motilidad de espermatozoides fue observada cuando el semen de jabalí fue centrifugado a  $800 \times g$  por 10 minutos en BTS (Matás *et al.* 2007), y lo mismo se observó cuando el semen del caprino fue centrifugado a  $900 \times g$  por 10 minutos en leche descremada (Salvador *et al.* 2006). Similares efectos adversos sobre la motilidad fueron obtenidos en espermatozoides de llama a  $800 \times g$  durante 8 minutos en medio H-TALP-BSA (Giuliano *et al.* 2010), aunque la exposición del eyaculado a concentraciones de colagenasa pudo haber influido negativamente en este último caso. En otro trabajo, no se observó ningún cambio en la motilidad de espermatozoides de alpaca después de centrifugar a  $600 \times g$  durante 7 minutos en medio Androhep®, pero la tasa de recuperación de espermatozoides solo alcanzó el 63%, y no fue posible extraer el plasma seminal debido a la ausencia de semen licuefactado (Morton *et al.* 2008). En el estudio Kershaw-Young y Maxwell (2011), donde el semen de alpaca fue centrifugado a  $1000 \times g$  durante 10 minutos en PBS, se obtuvo una motilidad

espermática del 56% (aunque no se informó la motilidad inicial del espermatozoide y no se pudo determinar la pérdida de motilidad).

Cuando en la separación de espermatozoides del semen de alpaca se utilizó bajas fuerzas de centrifugación en medio PureSperm®, se observaron cambios mínimos en la motilidad de espermatozoides después de la centrifugación a  $600 \times g$  durante 7 minutos en la alpaca (Morton *et al.* 2008; Morton *et al.* 2012), lo cual es concordante con los resultados de baja fuerza de centrifugación en PureSperm®80 en la presente investigación. En otras especies como el perro, este mismo efecto se obtuvo con la centrifugación en medio PureSperm® a  $300 \times g$  por 20 minutos (Dorado *et al.* 2013). En el caprino, utilizando un medio (gelatina, 280 °Bloom) con propiedades similares al PureSperm®80, la centrifugación a  $900 \times g$  durante 10 minutos también produjo respuestas con bajas pérdidas en la motilidad de los espermatozoides (Salvador *et al.* 2006). Recientes resultados en el camello dromedario (Malo *et al.* 2017; Malo *et al.* 2018), también revelaron que la centrifugación de una sola capa en una solución coloidal mejora la motilidad de espermatozoides tanto en semen fresco como en congelado.

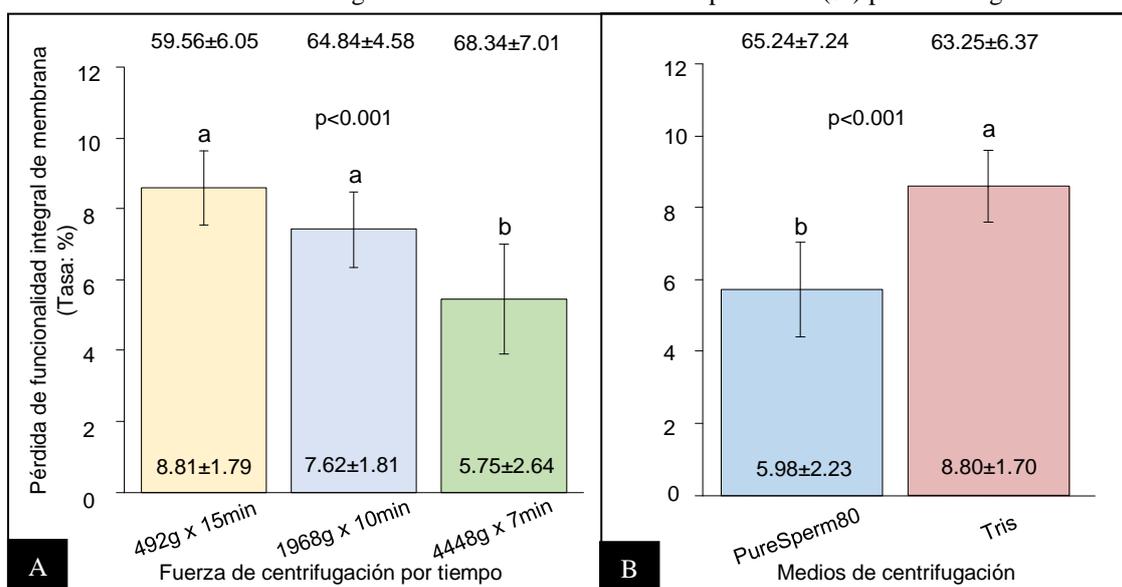
Respecto a la centrifugación de semen de alpacas en diferentes medios a altas fuerzas de centrifugación, la información disponible es muy limitada. Existe una publicación donde los eyaculados de camello se centrifugaron en medio Tris a extrema fuerza de centrifugación ( $18,000 \times g$  durante 15 minutos), como resultado de este proceso, la motilidad de los espermatozoides disminuyó en 63.3% con una tasa de pérdida de 12.7% (El-Bahrawy 2010). En la presente investigación, la centrifugación de eyaculados de alpaca en medio Tris a  $4448 \times g$  por 7 minutos produjo una motilidad de espermatozoides del 54.6% con una tasa de pérdida de menos del 8.2% (Figura 7). La comparación de los resultados de la centrifugación, a  $4448 \times g$  durante 7 minutos, entre el medio dilutor Tris y el medio PureSperm®80 (Figura 6), reveló un efecto protector potencial de la solución de gradiente de densidad PureSperm®80 de una sola capa sobre la motilidad espermática. En otras especies, como los bovinos, la centrifugación a  $3220 \times g$  por 5 min fue utilizado con éxito con el propósito de remover impurezas en algunas etapas del procesamiento de semen (Weber *et al.* 2006). En otros trabajos, cuando se aumentaba la fuerza de centrifugación a  $5,000 \times g$  y disminuía el tiempo a 5 minutos, en la centrifugación de semen de ovinos en medio Percoll y Mini-Percoll (propiedades próximas a PureSperm®), se observó 26.6 a 37.8% de motilidad (Olivares *et al.* 2019). Asimismo, utilizando semen de bovino en gradientes Percoll a  $5000 \times g$  por 5, no se encontró diferencias en la

motilidad con las muestras no centrifugadas (Machado *et al.* 2009). Del mismo modo, al aumentar la fuerza de centrifugación al semen descongelado de bovinos ( $9000 \times g$  por 5 min) en diferentes gradientes de mini Percoll, se consiguió una motilidad progresiva del 58.5%, y reducir la producción de ROS (Folchini *et al.* 2012). En cambio, sin utilizar ningún medio de protección en la centrifugación del semen de humanos (Makler *et al.* 1981), muchos años atrás, se observó que el porcentaje de motilidad disminuía a medida que se aumentaba el tiempo y la fuerza de centrifugación ( $2,350 \times g$  por 20 minutos), además de encontrarse una pérdida de la motilidad hasta en 60%.

**Funcionalidad integral de la membrana espermática.** En esta investigación, los efectos de la centrifugación en diferentes medios y fuerzas de centrifugación por tiempo sobre la funcionalidad de la membrana, tuvo similar efecto que en la motilidad de los espermatozoides. La integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides disminuyó cuando se centrifugaron los eyaculados, siendo afectado por la combinación de fuerzas de centrifugación por tiempo ( $p < 0.001$ ; Figura 8, panel A) y el medio de centrifugación ( $p < 0.001$ ; Figura 8, panel B). La menor pérdida de este parámetro (5.75%) ocurrió cuando fue centrifugado a  $4448 \times g$  por 7 min (Figura 8, panel A). Los eyaculados centrifugados en PureSperm®80 tuvieron una menor pérdida (8.8%) que los eyaculados centrifugados en medio dilutor Tris (5.98%) (Figura 8, panel B). Estos resultados sugieren un efecto protector potencial de PureSperm®80 sobre la membrana plasmática de los espermatozoides cuando los eyaculados se centrifugaron a fuerzas de centrifugación relativamente altas.

Cuando se utilizaron bajas fuerzas de centrifugación y como medio de centrifugación H-TALP-BSA, se obtuvieron efectos adversos sobre la funcionalidad de la membrana plasmática en los espermatozoides de la llama ( $800 \times g$  por 8 min), aunque la exposición del eyaculado a concentraciones de colagenasa pudo haber influido desfavorablemente (Giuliano *et al.* 2010). En cambio, cuando en la centrifugación ( $900 \times g$  durante 10 minutos) del semen de caprino se utilizó un medio con propiedades similares a PureSperm® (gelatina de 280 °Bloom), se obtuvo una baja disminución de la integridad acrosomal (parámetro relacionado a la funcionalidad de la membrana espermática) de los espermatozoides (Salvador *et al.* 2006).

Valores medios finales de integridad funcional de membrana espermática (%) poscentrifugación



**Figura 8.** Tasa de pérdida de la integridad funcionalidad de membrana espermática por fuerza de centrifugación por tiempo (**Panel A**) y por medios de centrifugación (**Panel B**). Números dentro de cada barra representan tasas medias de pérdida de integridad funcional de membrana. Números sobre las barras representan a medios poscentrifugación de semen.

Respecto a la centrifugación utilizando altas fuerzas de centrifugación ( $3220 \times g$  por 5 min), y aún en ausencia de medios de protección, en el semen de bovinos se consiguió remover los precipitantes durante el procesamiento de tecnologías de conservación de semen (Weber *et al.* 2006), los cuales tendrían parámetros espermáticos aceptables. En equinos, al utilizar como medio de centrifugación Equiplus® (propiedades similares al Tris) de  $600$  a  $1,800 \times g$  por 10 min, la integridad acrosómica de los espermatozoides no se modificó entre tratamientos, pero había diferencias con el control (Restrepo-Betancur *et al.* 2016). En cambio, cuando el semen de alpaca fue centrifugado inclusive a  $4448 \times g$  por 7 min, pero en medio PureSperm®80 (Figura 8, panel A), se obtuvieron bajas pérdidas en la integridad funcional de la membrana espermática (5.98%), lo cual se debería al efecto protector del medio PureSperm®80 durante la centrifugación a través de una distribución homogénea de los espermatozoides en la capa formada durante la aplicación de la fuerza de centrifugación. Además, el corto tiempo empleado durante la centrifugación habría hecho posible la baja pérdida de la funcionalidad integral de la membrana espermática, como lo señalan Violeta y Paná (2007) en el caso del perro. De otro modo, en el semen de bovinos, utilizando corto tiempo, pero alta y extrema fuerza de centrifugación ( $9000 \times g$  por 5 min) en gradientes de Percoll, se observó una disminución de la integridad de membrana hasta 22.85%, pero se consiguió reducir el

ROS (Folchini *et al.* 2012). De este modo, como la formación del ROS afecta la calidad de los parámetros espermáticos de humanos después de la centrifugación, lo más importante sería, el corto tiempo más que la fuerza de centrifugación (Shekarriz *et al.* 1995). En la presente investigación, una combinación de alta fuerza de centrifugación ( $4448 \times g$ ) y corto tiempo (7 minutos) habría hecho posible separar casi completamente los espermatozoides del plasma seminal, sin afectar sustancialmente la integridad de la membrana de los espermatozoides.

**Integridad acrosomal.** Durante la realización de esta investigación, no ha sido posible utilizar la prueba de triple tinción de Kovács y Foote (1992) para determinar espermatozoides vivos con acrosomal intacto, adaptada para llamas por Fumuso (2015) y Carretero *et al.* (2015), debido a la alta dificultad para diferenciar las diferentes categorías de espermatozoides señaladas para esta prueba. Es posible, se deba al uso del colorante Giemsa que no tendría la capacidad total de impregnarse al acrosoma del espermatozoide (Morton *et al.* 2008). Se necesita una mayor adaptación de esta técnica para su uso con espermatozoides de alpaca que permita evaluar con precisión el estado acrosomal.

## **4.2 EXPERIMENTO 2: CONSERVACIÓN DE SEMEN EN MEDIO SÓLIDO Y LÍQUIDO A 5 °C**

**Motilidad posgelificación de semen.** En la Tabla 1, se aprecia los efectos de la conservación a 5 °C durante 4 días (96 horas) del semen gelificado en gelatina de 280 °Bloom con previa centrifugación en medio Tris (Tris-gelificado) o PureSperm®80 (Pspe-gelificado) a  $4448 \times g$  por 7 min, así como del semen fresco diluido en Tris-Yema de huevo (control) sobre la motilidad de los espermatozoides. Se observa claramente en la Figura 9, que la disminución de la motilidad de los espermatozoides ocurre más rápidamente en el grupo control; y en la Tabla 1, el porcentaje de la motilidad de los espermatozoides disminuyen de 59.19% en la hora 0 hasta 11.28% a las 96 horas (día 4). En los tratamientos Tris-gelificado y Pspe-gelificado, la diferencia en la disminución de la motilidad es más pequeña (Figura 9) pero los promedios de Pspe-gelificado estuvieron sistemáticamente por encima de los promedios de las muestras del tratamiento Tris-gelificado; asimismo, al final del día 2 o 48 horas, los tratamientos Tris-gelificado y Pspe-

gelificado alcanzaron motilidades de 41.20 y 52.06% respectivamente, a favor de Pspe-gelificado (Tabla 1). En la misma tabla, estas motilidades fueron menores cuando fueron comparadas con las de 24 horas, donde Tris-gelificado y Pspe-gelificado tenían promedios de 47.86 y 54.50% respectivamente ( $p < 0.005$ ).

Es conocido que, en el semen refrigerado en medio líquido, los espermatozoides vivos y muertos tienden a sedimentarse en el fondo (Salvador *et al.* 2006) causando deletéreos cambios (López-Urueña *et al.* 2016) debido a que los productos de la toxicidad metabólica producen fluctuaciones del pH en esta región (Rabbit: Nagy *et al.* 2002; Ram: Paulenz *et al.* 2010), lo cuál sería una explicación de la disminución de la motilidad del tratamiento control (Figura 9).

En la gelificación del semen, se produce la inmovilización de las células espermáticas que conlleva a reducir la demanda metabólica (Lopez-Gatius *et al.* 2005), disminuyendo la motilidad, el cual afecta en la disminución del gasto energético de los espermatozoides (Rabbit: López-Gatius *et al.* 2005; ram: Yaniz *et al.* 2005), que al ser gelificados uniformemente distribuidos (Ram: Paulenz *et al.* 2010; goat: Salvador *et al.* 2006) se posibilita la prevención de la sedimentación espermática (Nagy *et al.* 2002).

Tabla 1. Medias  $\pm$  EE de motilidad (%) espermática de semen de alpaca posgelificación (280 °Bloom) a diferentes horas de conservación por tratamiento.

Horas de conservación	Tratamientos	Motilidad (%)
0	Control	59.19 <sup>a</sup> $\pm$ 2.43
	Tris-gelificado	54.70 <sup>a</sup> $\pm$ 2.41
	Pspe-gelificado	57.30 <sup>a</sup> $\pm$ 2.25
24	Control	44.79 <sup>b</sup> $\pm$ 2.15
	Tris-gelificado	47.86 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.84
	Pspe-gelificado	54.50 <sup>a</sup> $\pm$ 1.88
48	Control	32.67 <sup>c</sup> $\pm$ 1.44
	Tris-gelificado	41.20 <sup>b</sup> $\pm$ 1.80
	Pspe-gelificado	52.06 <sup>a</sup> $\pm$ 1.85
72	Control	19.14 <sup>b</sup> $\pm$ 2.04
	Tris-gelificado	33.87 <sup>a</sup> $\pm$ 1.12
	Pspe-gelificado	40.15 <sup>a</sup> $\pm$ 1.57
96	Control	11.28 <sup>b</sup> $\pm$ 1.70
	Tris-gelificado	27.84 <sup>a</sup> $\pm$ 0.71
	Pspe-gelificado	33.03 <sup>a</sup> $\pm$ 0.92

Superíndices en las filas 0, 24, 48, 72, 96 horas denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ).  
EE: Error estándar

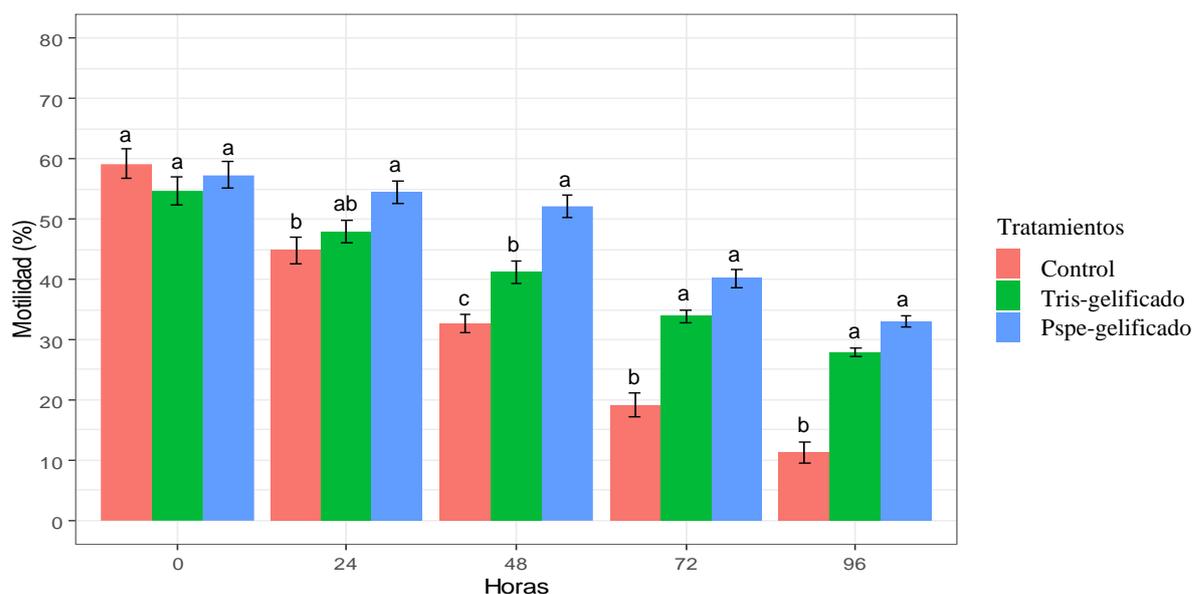


Figura 9. Comparación de los tratamientos Pspe-gelificado, Tris-gelificado y Control sobre la motilidad (%) de espermatozoides gelificados (gelatina de 280° Bloom) de alpaca a diferentes horas de conservación.

Asimismo, la temperatura de refrigeración (5 °C) utilizada para conservar el semen gelificado, habría contribuido con la disminución del metabolismo de los espermatozoides. Al respecto, se ha indicado que las bajas temperaturas producen una disminución del consumo energético, el aumento de ATP, la disminución del ADP, acompañado de la reducción de la motilidad progresiva de los espermatozoides (Hammerstedt y Hay 1980), y que el consumo de ATP se ralentiza más rápidamente que la síntesis (Hammerstedt *et al.* 1990), debido a que en este estado de conservación, el semen es capaz de reducir su tasa metabólica (Teixeira *et al.* 2015; Dziekońska *et al.* 2009).

En este proceso, la acumulación de productos tóxicos del metabolismo, así como de sustancias reactivas de oxígeno (ROS) afectarían detrimentalmente los parámetros espermáticos (Niasari-Naslaji *et al.* 2006) de menor a mayor grado conforme transcurre el tiempo, debido a que la gelificación de semen disminuye, pero no detiene los procesos metabólicos de los espermatozoides.

**Integridad funcional de la membrana posgelificación del semen.** En la Tabla 2, se observa el efecto de la conservación bajo refrigeración (5 °C) del semen gelificado (gelatina de 280 °Bloom) que durante su procesamiento fueron centrifugados en medio Tris (Tris-gelificado) o PureSperm® (Pspe-gelificado), y así como del control, sobre la integridad funcional de membrana de los espermatozoides.

En la Figura 10, se observa la disminución del porcentaje de este parámetro, más rápidamente en el grupo control que en Pspe-gelificado y Tris-gelificado. Entre los tratamientos Pspe-gelificado y Tris-gelificado se encontró significativas diferencias desde las 24 (54.50 y 47.86%) hasta las 96 horas o 4 días (33.03 y 27.84%) respectivamente, a favor de Tris-gelificado.

Asimismo, a las 48 horas o dos días (Tabla 2), se ha encontrado que la integridad funcional de membrana en los tratamientos Pspe-gelificado y Tris-gelificado habían alcanzado 64.90 y 49.84% a las 48 horas de refrigeración a 5 °C, siendo superior Pspe-gelificado. Este parámetro espermático en los tratamientos Pspe-gelificado y Tris-gelificado evaluados a las 48 horas, estuvieron superados por los valores de integridad funcional de membrana obtenidos a las 24 horas (Tabla 2 y Figura 10).

Tabla 2. Medias  $\pm$  EE de integridad funcional de membrana espermática (%) de espermatozoides de alpaca posgelificación (280 °Bloom) a diferentes horas de conservación por tratamiento.

Horas	Tratamientos	Integridad funcional de membrana
0	Control	73.31 <sup>a</sup> $\pm$ 2.90
	Tris-gelificado	68.25 <sup>a</sup> $\pm$ 2.58
	PSp-gelificado	70.58 <sup>a</sup> $\pm$ 2.93
24	Control	51.10 <sup>b</sup> $\pm$ 3.41
	Tris-gelificado	58.31 <sup>ab</sup> $\pm$ 3.52
	PSp-gelificado	68.58 <sup>a</sup> $\pm$ 2.79
48	Control	38.11 <sup>b</sup> $\pm$ 2.34
	Tris-gelificado	49.84 <sup>b</sup> $\pm$ 2.36
	PSp-gelificado	64.90 <sup>a</sup> $\pm$ 1.87
72	Control	22.11 <sup>b</sup> $\pm$ 3.13
	Tris-gelificado	41.37 <sup>a</sup> $\pm$ 2.92
	PSp-gelificado	52.71 <sup>a</sup> $\pm$ 2.25
96	Control	12.93 <sup>b</sup> $\pm$ 2.12
	Tris-gelificado	36.17 <sup>a</sup> $\pm$ 3.28
	PSp-gelificado	41.44 <sup>a</sup> $\pm$ 1.61

Superíndices en las filas 0, 24, 48, 72, 96 horas denotan diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ).

EE: Error estándar

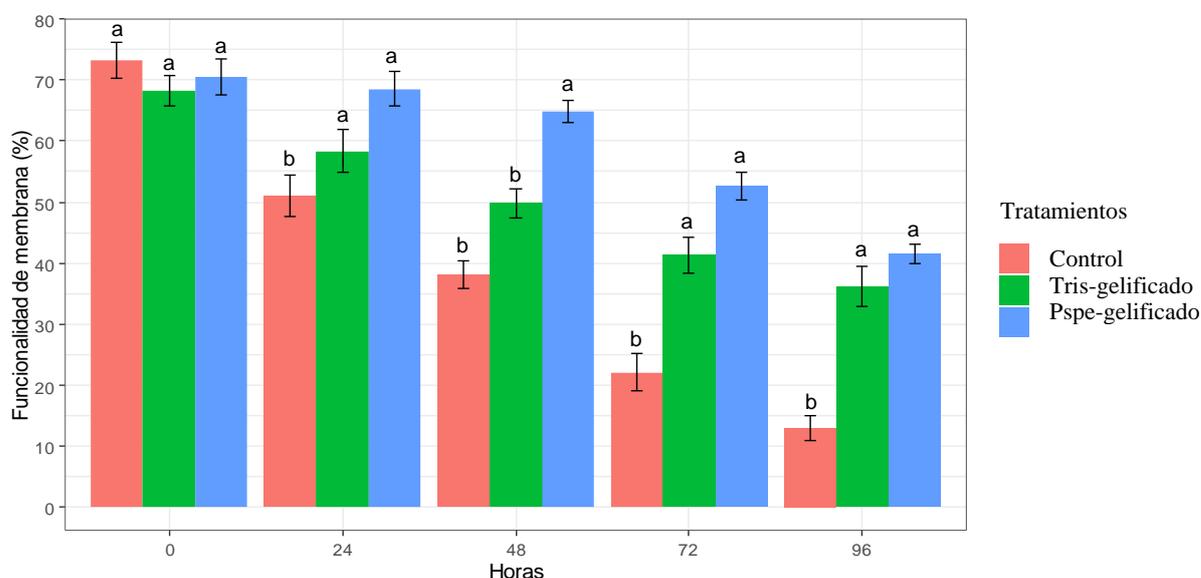


Figura 10. Comparación de los tratamientos Pspe-gelificado, Tris-gelificado y Control sobre la integridad funcional de la membrana espermática de espermatozoides (%) de alpaca a diferentes horas de conservación.

Aunque se ha observado una baja disminución de la funcionalidad de membrana hasta las 48 horas de conservación (Figura 10), en estudios previos en otras especies, no se han encontrado efectos deletereos en la integridad funcional de la membrana cuando fue conservado el semen de cabra en gelatina al 1.5% a 5 °C durante 72 horas (Salvador *et al.* 2005, 2006). En el caso del carnero, la motilidad y la integridad funcional de la membrana plasmática del semen conservado en gelatina al 1.5% fueron capaces de producir fertilización *in vitro* (Yaniz *et al.* 2005). Concordantemente, se ha informado que los espermatozoides conservados en gelatina reducen la presencia de anomalías y el efecto del tiempo de almacenamiento (Sabah y Rahman 2011; Cortell y Viudes de castro 2008). Lo que estaría soportado por Resseguie *et al* (1981), quienes indican que la gelatina, un hidrolizado de colágeno, es una molécula grande que no entraría en el espermatozoide y no causaría daño interno, ni alteraría significativamente la osmolaridad del diluyente, pero causaría deshidratación o plasmólisis.

Sin embargo, la conservación en gelatina por más de 48 horas (dos días), afecta con mayor intensidad la funcionalidad de la membrana espermática, como se ha observado en esta investigación (Figuras 10). Una explicación aproximada a este resultado es que al

encontrarse los espermatozoides en un medio viscoso como la producida por la gelatina (Hirai *et al.* 1997), evitaría la precipitación (Sabah y Rahman 2011), distribuyendo a los espermatozoides uniformemente dentro de la gelatina (Paulenz *et al.* 2010; Salvador *et al.* 2006). Al estar bloqueada el flujo de moléculas a través de la membrana celular por esta acción (Blazek *et al.* 2015), y conjugado con la disminución de temperatura a 5°C que ralentiza la tasa metabólica, el agotamiento de ATP y la producción de especies reactivas de oxígeno, pero no la producción del shock térmico (Gibb y Aitken 2016), producirían serios disturbios en la permeabilidad de la membrana. Consecuentemente, la activación del mecanismo de la homeostasis celular conllevaría a la disrupción en la membrana plasmática seguido de la muerte celular (Blazek *et al.* 2015).

En los tratamientos Tris-gelificado y Psp-gelificado, donde el semen es conservado en gelatina de 280 °Bloom, con previa centrifugación en PureSperm®80 a 4448 × g por 7 minutos (a fin de controlar la viscosidad y retirar un alto porcentaje del plasma seminal), se observa claramente mayor porcentaje de espermatozoides con funcionalidad de la membrana (Tabla 2) que el control (que no recibió centrifugación en PureSperm®80). Al respecto, se ha documentado que el PureSperm® mantiene al menos constante los parámetros espermáticos después de centrifugación (Nicolas *et al.* 2012; Dorado *et al.* 2011), esta ventaja proveería a los espermatozoides mayor tiempo de sobrevivencia.

**Motilidad e integridad funcional de la membrana posgelificación.** Un aspecto relevante observada en esta investigación fue que conforme transcurría el tiempo desde 0 a 96 horas, concomitantemente se producía una permanente disminución de la motilidad y la integridad funcional de la membrana en los tratamientos Pspe-gelificado y Tris-gelificado (Figuras 9 y 10) en condiciones de refrigeración a 5 °C. El tratamiento Pspe-gelificado evaluados a las 48 horas de refrigeración (Figuras 9 y 10) tenía una motilidad e integridad funcional de la membrana por encima del 50%.

Asimismo, se ha observado una lenta disminución en la motilidad espermática antes de las 48 horas e intensa pérdida después de este tiempo, el cual fue similar en la observación de la integridad funcional de membrana (Figuras 9 y 10). Esta relación entre estos parámetros espermáticos sería concordante con las observaciones en otras especies. En el semen congelado del perro esta relación fue reportado en 0.8 (Sanchez *et al.* 2002), 0.73 en el vacuno (Sharma *et al.* 2012), y 0.51 en el caso de la alpaca (Juyena 2011). Se sabe que, estos valores podrían variar con menores niveles de osmolaridad debido a un

excesivo estrés hipoosmótico provocando la lisis celular (Vásquez *et al.* 2012), que no aplica para el caso.

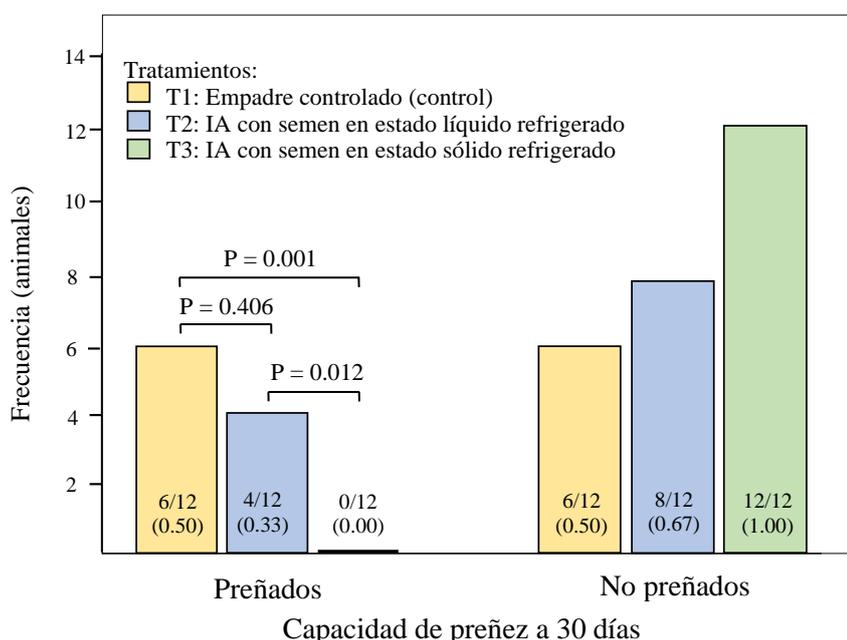
Sin embargo, al menos en la etapa previa a la gelificación, la centrifugación en medio PureSperm®80 habría protegido y prevenido de la formación de ROS (Allamaneni *et al.* 2005), lo cual indicaría que la relación entre la motilidad y la integridad funcionalidad de membrana también se cumple en condiciones de gelificación del semen de la alpaca. Se ha indicado, que existe una estrecha relación entre la membrana plasmática con la motilidad (Ridley 2011), debido a la participación de la membrana espermática como un regulador físico, y su comportamiento como una plataforma dinámica para la localización de diversos componentes que participan en el proceso de motilidad, incluida la generación de fuerza, la adhesión, la señalización y la regulación, que siempre están acompañados de una reestructuración apropiada de la membrana plasmática (Keren 2011).

En el caso de semen fresco y refrigerado, es común la inseminación con semen conservado por tiempos cortos (1-12 horas), pero a mayor tiempo de refrigeración la fertilidad disminuye (Leboeuf *et al.* 2000). Los bajos cambios en los parámetros espermáticos antes de las 48 horas encontrados en esta investigación (Pspe-gelificado y Tris-gelificado), podría impulsar la producción de pajillas de alpacas de alto valor genético, y como indica Sabah y Rahman (2011), trasladar el material genético desde los centros de mejoramiento genético a los lugares de inseminación artificial en la distancia que el tiempo de conservación lo permita. Sin embargo, se reconoce que previamente, es necesario evaluar otras características espermáticas como la capacidad fertilizante del semen gelificado mantenido bajo refrigeración.

### **4.3 EXPERIMENTO 3: CAPACIDAD GESTACIONAL DEL SEMEN EN ESTADO SÓLIDO Y LÍQUIDO**

En el experimento 3 (Figura 11) se observa, la capacidad de preñez diagnosticada a los 30 días de gestación por la implementación de los tratamientos. El tratamiento T2, semen refrigerado a 5 °C en estado líquido en dilutor Tris-Yema de huevo produjo 4 preñeces de 12 (proporción de 0.33), el tratamiento T3 de semen refrigerado a 5 °C en estado sólido o gelificado en gelatina de 280 °Bloom no produjo ninguna preñez, y el tratamiento T1 de empadre controlado (control) utilizado como referencia, produjo preñeces en 6 de 12

casos (proporción de 0.5). En el mismo gráfico se observa que el estar preñado o no preñado estaba relacionado con la aplicación de la inseminación artificial con semen refrigerado en estado líquido o estado sólido ( $p = 0.012$ ). No se ha encontrado asociación entre los tratamientos empadre controlado (T1) y la inseminación artificial con semen refrigerado en estado líquido (T2) con la capacidad de preñez de las alpacas ( $p = 0.406$ ), siendo que ambos tratamientos produjeron similar resultado. En cambio, la gestación a 30 días estaba relacionado ( $p=0.001$ ) con hacer uso el empadre controlado (T1: proporción de 0.50) o utilizar I.A. con semen en estado sólido (T3: 0 casos de gestación).



**Figura 11.** Capacidad de preñez a 30 días de gestación del semen conservado a 5 °C hasta 48 horas en estado sólido (gelificado en gelatina 280 °Bloom) y estado líquido (diluido en Tris-Yema de huevo). n= 12.

La inseminación artificial de alpacas con semen refrigerado a 5 °C por 48 horas en medio líquido (T2) fue capaz de fecundar y mantener preñadas hasta los 30 días en 4 de 12 hembras diagnosticadas por ultrasonografía, pero no podemos afirmar lo mismo del semen refrigerado en estado sólido o gelificado en gelatina de 280 °Bloom (T3).

La capacidad de preñez encontrada por inseminación artificial con semen refrigerado en estado líquido, pero no en estado sólido, indicaría que la centrifugación del semen a 4448 × g por 7 min, usando PureSperm®80 como medio de protección, no habría afectado

negativamente en la capacidad de lograr preñez. Concordante con ello, Ng *et al.* (1990) al aplicar microcentrifugación a una fuerza de centrifugación por tiempo de  $3352 \times g$  por 5 min al semen humano consiguió un mínimo efecto negativo en la habilidad de los espermatozoides para fusionarse con la membrana plasmática del ovocito de hamsters; adicionalmente indican, que la penetración de los espermatozoides a través de la zona pelúcida aunque mínimamente, podría afectar negativamente la fertilización *in vitro* de ratones, ya que se observó una disminución del 3% de daño sobre los espermatozoides sometidos a alta fuerza de centrifugación.

En la presente investigación, se ha utilizado el diagnóstico de preñez de alpacas a los 30 días, de acuerdo con varios investigadores que han evaluado la inseminación en alpacas (García *et al.* 2017; Ordoñez *et al.* 2013; Alarcón *et al.* 2012), debido a que en esta especie existe una alta pérdida embrionaria que puede alcanzar hasta el 50% entre los primeros 30 días de gestación (Fernández-Baca *et al.* 1970), aspecto que al no considerarse podría afectar el diagnóstico de gestación.

Similar al resultado producido en la capacidad de preñez por inseminación con semen en estado líquido (T2), se ha obtenido con la gestación producida con empadre controlado (T1) ( $p = 0.406$ ). Estos resultados estarían cercanos a los resultados de inseminación artificial en la alpaca conseguida con semen fresco (48.4%: García *et al.* 2017; 55%: Alarcón *et al.* 2012; 28%: Apaza *et al.* 2001) y semen refrigerado (31.7%: García *et al.* 2017) en los últimos años. Aquí, se presenta una prueba de que PureSperm®80, además de ser un medio para separar espermatozoides del plasma seminal a  $4448 \times g$  por 7 minutos con fines de procesamiento, es capaz de conservar los parámetros espermáticos del semen de alpaca directamente relacionados con la preñez.

La capacidad de lograr preñez a los 30 días después de la inseminación artificial (Figura 11), muestra que la proporción de hembras preñadas que fueron inseminadas con semen conservado en estado líquido (0.33) alcanzó una similar proporción (0.32) al reportado por García *et al.* (2017).

Con fines de facilitar un mejor manejo de la viscosidad de semen en los tratamientos T2 y T3, previamente estos fueron centrifugados a  $4448 \times g$  por 7 minutos, lo que permitió aislar la alta proporción de plasma seminal del semen. De esta manera, la preñez obtenida con T2 pero no con T3, indicaría que los espermatozoides en ausencia parcial de plasma

seminal habrían mostrado capacidad de fecundar, en los animales diagnosticados como preñadas. Al respecto, se sabe que durante la eyaculación se produce la mezcla de espermatozoides y plasma seminal (Nasrin y Stelletta 2012), la centrifugación de semen en gel PureSperm®80 produce estratos de espermatozoides y plasma seminal (Brahem *et al.* 2011), y el retiro parcial del plasma seminal como en los tratamientos T2 y T3, habría hecho posible que los espermatozoides se encuentren en contacto con los componentes benéficos del plasma seminal que participan en la fecundación (Gwathmey *et al.* 2006; Souza *et al.* 2008).

En otras especies, el semen conservado en gelatina a 15 °C ha mostrado tener capacidad fertilizante *in vitro* en la oveja (Yaniz *et al.* 2005). En condiciones *in vivo*, bajo inseminación artificial con semen conservado en gelatina y refrigerado se han conseguido preñeces en la gallina (Resseguie *et al.* 1981), en el conejo (López-Gatius *et al.* 2005; Echegaray-Torres *et al.* 2004), la cabra (Salvador *et al.* 2006) y la oveja (Paulenz *et al.* 2010). Diferente a los logros en estas especies, y bajo las condiciones de esta investigación, como la previa centrifugación del semen de alpaca a  $4448 \times g$  por 7 minutos, se ha encontrado nula gestación con el tratamiento T3 (inseminación artificial con semen en estado sólido). Sin embargo, no estamos aún en condiciones de afirmar, que el semen de alpaca conservada en medio sólido o gelatina no tenga capacidad de lograr preñeces. Al parecer los resultados se deberían a una inadecuada proporción de gelatina utilizada, ya que se sabe que la capacidad de gelificación de la gelatina depende de su concentración (Hsu y Jamieson 1993), de modo que, una alta concentración de gelatina produciría una película más gruesa que envuelva al espermatozoide impidiendo la adhesión y fusión del ovulo-espermatozoides; y a un desconocido proceso de transporte del semen gelificado en el útero de la alpaca.

Se sabe que la suplementación de gelatina al semen con fines de gelificación distribuye uniformemente los espermatozoides minimizando los efectos del cambio de pH y de los productos tóxicos (Paulenz *et al.* 2010; Cortell y Viudes de Castro 2008), reduciéndose el metabolismo por inmovilización de los espermatozoides durante la gelificación (López-Gatius *et al.* 2005) y por la conservación a una baja (5 °C) temperatura (Teixeira *et al.* 2015; Dziekońska *et al.* 2009, Hammerstedt *et al.* 1990); sin embargo, después de la degelificación de los espermatozoides, estos continúan envueltos en una película de gelatina más allá de las 48 horas, y a la reanudación completa del proceso metabólico en condiciones anaerobias, según Echegaray-Torres *et al.* (2004), se habría facilitado la

formación de ácido láctico y la acidificación produciendo la muerte de espermatozoides. Además, la conocida baja capacidad de preñez mostrada con la inseminación artificial en los camélidos sudamericanos respecto al empadre controlado, sería otro factor que también haya sumado a los resultados. Estas conjeturas advierten la necesidad de esclarecer con más investigaciones.

Las limitantes de esta experimentación han sido, el bajo volumen de semen que oscilaba entre 0.5 a 1.3 ml que permitía producir entre 3 a 5 dosis por animal, y el corto tiempo de conservación (48 horas) del semen gelificado.

## V. CONCLUSIONES

- 5.1 La centrifugación de eyaculados de alpaca a  $4448 \times g$  durante 7 minutos en una solución de gradiente de densidad PureSperm®80 proporcionó una tasa extremadamente alta de recuperación de espermatozoides después de la centrifugación con una pérdida mínima de la motilidad y la integridad funcional de la membrana plasmática.
- 5.2 Tanto la motilidad y la integridad funcional de la membrana del semen refrigerado a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  en medio líquido y sólido (gelificado a  $280^{\circ}$  Bloom), se conservaron con valores cercanos al 50% hasta 48 horas, pero en las siguientes horas disminuyeron rápidamente.
- 5.3 El semen refrigerado a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, previamente centrifugado a  $4448 \times g$  durante 7 minutos en PureSperm®80, produjo preñeces a los 30 días de gestación cuando se utilizó I.A. con semen en estado líquido, más no con el semen estado sólido (gelificado a  $280^{\circ}$  Bloom), siendo ambos superados por la proporción de preñeces obtenidas por empadre controlado.

## VI. RECOMENDACIONES

- 6.1. La centrifugación en gel a  $4448 \times g$  durante 7 minutos, brinda un fuerte estímulo para una posible adopción rutinaria en el procesamiento del semen de alpaca con fines de inseminación artificial y otras biotecnologías de reproducción asistida.
- 6.2. Es necesario realizar pruebas utilizando otras concentraciones y tipos de gelatina para evaluar el comportamiento del semen gelificado tanto *in vitro* como dentro del útero de la alpaca, que conlleven a la posibilidad de conservar el semen por mayor tiempo.
- 6.3. Ensayar nuevas formas de transporte de semen desde los centros de producción hacia las fincas de criadores, y verificar el comportamiento intrauterino del semen líquido y gelificado posinseminación artificial de alpacas.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Aziz, A.; Saadeldin, I.M.; Alanazi, M.B.; Ba-Awadh, H.; Alowaimer, A.N. 2018. Effects of adding egg yolks of different avian species to Tris glycerol extender on the post-thawing quality of buck semen. *Animal Reproduction Science* 195: 345-354.
- Adam, C.L.; Moir, C.E.; Shiach, P. 1989. Plasma progesterone concentrations in pregnant and non-pregnant llamas. *Lama glama, Vet. Rec.* 125, 618–620.
- Adams, G.P.; Ratto, M.H. 2001. Reproductive Biotechnology in South American Camelids. *Revista de Investigaciones Veterinarias, Perú.*
- Adams, G.P.; Ratto, M.H.; Collins, C.W.; Bergfelt, D.R. 2009. Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology* 71:166–175.
- Adams, G.P.; Sumar, J.; Ginther, O.J. 1990. Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas *Lama glama*. *J. Reprod. Fertil.* 90, 535–545.
- Adams, G.P.; Ratto, M.H.; Huanca, W.; Singh, J. 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction* 73: 452–457
- Alarcón, V.; García, W.; Bravo, P.W. 2012. Artificial insemination of alpacas with semen collected by vaginal aspiration and by artificial vagina. *Rev Inv Vet Perú* 2012; 23(1): 58-64
- Alexei Santiani; Shirley Evangelista; Martha Valdivia; Jennie Risopatrón; Raúl Sánchez. 2013. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 79.: 842–846
- Allamaneni, SSR.; Agarwal, A.; Rama, S.; Ranganathan, P.; Sharma, R.K. 2005. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. *Asian J Androl* 7 (1): 86–92
- Aller, J.F.; Rebuffi, G.E.; Cancino, A.K.; Alberio, R.H. 2003. Influence of cryopreservation on the motility, viability and fertility of llama spermatozoa (*Lama glama*). *Arch Zootec.*, 52:15–23

- Althouse, G.C.; Lu, K.G. 2005. Bacteriospermia in extended porcine semen. *Theriogenology* 63: 573–584.
- Antonini, M.; González, M.; Valbonesi, A. 2004. Relationship between age and postnatal skin follicular development in three types of South American domestic camelids. *Livestock Production Science* 90: 241–246.
- Apaza, N.; Sapana, R.; Huanca, T.; Huanca, W. 2001. Inseminación artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. *Rev. Invest. Vet. Peru. Suppl* 1: 435-438.
- Arando, A.; Gonzalez, A.; Delgado, J.V.; Arrebola, F.A.; Perez-Marín, C.C. 2017. Storage temperature and sucrose concentrations affect ram sperm quality after vitrification. *Animal Reproduction Science* 181: 175-185
- Aurich, C.; Spergser, J. 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion 407 spermatozoa. *Theriogenology* 67:912-918.
- Ball, L. 1986. Electroejaculation. In: Klemm WR (ed). *Applied Electronics for Veterinary Medicine and Animal Physiology*. Pp 39.5- 441.
- Banda, J.; Evangelista, S.; Ruiz, L.; Sandoval, R.; Rodriguez, C.; Valdivia, M.; Santiani A. 2010. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 21(2): 145-153
- Beccaglia, M.; Anastasi, P.; Chigioni, S.; Luvoni, G.C. 2009. TRIS-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (Suppl 2), 345–349.
- Bhargava, P.M. Four new unusual proteins from bovine seminal plasma. *Biochem. Soc. Trans.* 1981, 9:540–543
- Blazek, A.D.; Paleo, B.J.; Weisleder, N. 2015. Plasma membrane repair: A central process for maintaining cellular homeostasis. *Physiology* 30: 438 – 448.
- Bourke, D.A.; Kyle, C.E.; Mcevoy, T.G.; Young, P.; Adam CL. 1995. Recipient synchronization and embryo transfer in South American camelids. *Theriogenology* 43, 171, Abstr.
- Brahem, S.; Mehdi, M.; Elghezal, H.; Saad, A. 2011. Semen processing by density gradient centrifugation is useful in selecting sperm with higher double-strand DNA integrity. *Andrología* 43(3):196-202.

- Brandon, C.I.; Heusner, G.L.; Caudle, A.B.; Fayrer-Hosken, R.A. 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52: 863-873
- Bravo, P.W.; Stabenfeldt, G.H.; Lasley, B. L.; Fowler, M.E. 1991. The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated south american camelid. *Biology of Reproduction* 45, 553-559.
- Bravo, P.W.; Flores, U.; Garnica, J.; Ordoñez, C. 1997a. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*. 47(3):619-626.
- Bravo, P.W.; Flores, U.; Ordoñez, C. 1997b. Effect of Repeated Collection on Semen Characteristics of Alpacas. *Biol. Reprod.*, 57(3):520-524.
- Bravo, P.W.; Skidmore, J.A.; Zhao, XX. 2000b. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim. Reprod. Sci.*, 62:173–193.
- Bravo, PW.; Callo, M.; Garnica, J. 2000a. The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *J. Small Rum Res.*, 38:91–5.
- Brown, B.W. 2000. A review on reproduction in South American Camelids. *Animal Reproduction Science* 58: 169–195.
- Buendía, P.; Soler, C.; Paolicchi, F.; Gago, G.; Urquieta, B.; Pérez-Sánchez, F.; Bustos-Obregón, E. 2002. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the sperm-class analyzer computer-assisted system. *Theriogenology* 1;57(4):1207-18.
- Canorio, N.; Paredes, F.; Valdivia, M. 2015. Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú.*, 26(3): 434-443.
- Canorio, N.; Valdivia, M. 2007. Criopreservación de espermatozoides Epididimarios de alpacas *vicugna pacos*. I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos. Huancavelica.
- Carretero, M.I.; Fumuso, F.G.; Neilda, D.M.; Giuliano, S.M.; Cetica, P.; Miragaya, M.H. 2015. Evaluation of the acrosomal status in *Lama glama* sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Anim Reprod Sci.* 160:1-11
- Carter, P.D.; Hamilton, P.A.; Duffy, J.H. 1990. Electroejaculation in goats. *Australian Veterinary Journal* 67: 91-93

- Carvajal, G.; Cuello, C.; Ruiz, M.; Vazquez, J.M.; Martinez, E.A.; Roca, J. 2004. Effects of Centrifugation Before Freezing on Boar Sperm Cryosurvival. *Journal of Andrology*, 25(3).
- Carvalho, J.O.; Sartori, R.; Machado, G.M.; Mourão, G.B.; Dode, MAN. 2010. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. *Theriogenology* 74: 1521–1530
- Carver, D.A.; Ball, B.A. 2002. Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of the lipase on stallion spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology* 58:1587-1595
- Chen, B.; Yuen, Z.; Pan, G. Semen induced ovulation in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *J. Reprod. Fertil.* 1985, 74: 335-339. Abstrac.
- Copa, S.; Gonzáles, V.; Maceda, E. 2003. Técnica de bulbouretrectomia en lamas machos. III Congreso Mundial sobre Camelidos. Libro de Resúmenes. Potosí, Bolivia.
- Cortell, C.; Viudes De Castro, M.P. 2008. Effect of gelatin addition to freezing extender on rabbit semen parameters and reproductive performance. 9th World Rabbit Congress - June 10 - 13, 2008. Verona - Italy.
- Dávalos, R.; Olazábal, J. 2002. Evaluación de dos formas de colección de Semen en alpacas. *Rev Inv Vet Perú.*, 13(2):98-99.
- Deen, A; Vyas, S.; Sahani, M.S. Problems of artificial insemination in dromedarius camel-failure of ovulation and entrapment of spermatozoa in gelatinous camel semen. *Veterinarski Arhiv* 2005, 75(4): 293-301
- Deza, H. 2004. Conservación de espermatozoides obtenidos a través del conducto deferente en alpacas (*Lama pacos*) y llama (*Lama glama*) y su posterior viabilidad. Tesis de Médico Veterinario y Zootecnista. Puno: Univ Nacional del Altiplano. 71p.
- Dorado, J.; Alcaráz, L.; Duarte, N.; Portero, J.M.; Acha, D.; Demyda, S.; Muñoz-Serrano, A.; Hidalgo M. 2011. Centrifugation on PureSperm® density-gradient improved quality of spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* 76: 381 – 385
- Dorado, J.; Alcaraz, L.; Gálvez, M.J.; Acha, D.; Ortiz, I.; Urbano, M.; Hidalgo, M. 2013. Single-layer centrifugation through PureSperm® 80 selects improved quality spermatozoa from frozen-thawed dog semen. *Animal Reproduction Science* 140: 232–240

- Dziekońska, A.; Fraser, L.; Strzeżek, J. 2009. Effect of different storage temperatures on the metabolic activity of spermatozoa following liquid storage of boar semen. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 18: 638 – 649.
- Echegaray-Torres, J.L.; Olvera-Carmona, J.Á.; Salcedo-Baca, R.; Mendoza-Álvarez, B. 2004. Quality and fertility of preserved rabbit semen at 15 °C, in gelatin supplemented extender. *Proceedings - 8th World Rabbit Congress – September 7-10, 2004 – Puebla, Mexico*
- Einspanier, R.; Einspanier, A.; Wempe, F.; Scheit, K. H. 1991. Characterization of a new bioactive protein from bovine seminal fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:1006–1010
- El-Bahrawy, K.A. 2010. Effect of seminal plasma centrifugation for viscosity elimination on cryopreservation of dromedary camel semen. *Nature and Science*, 8(9): 196-201
- Evangelista-Vargas D; Evangelista-Vargas S; Valdivia M; Santiani A. 2016. Assessment of spermatozoa in fertile alpaca (*Vicugna pacos*) males: Study of sperm head morphometry using a nonautomated digital method and sperm morphology based on strict criteria. *Reprod Dom Anim* 2016; 1–7
- Fernández-Baca S; Novoa C; Sumar J. 1970. Embryonic mortality in the alpaca. *Biol. Reprod.* 3: 243-251
- Fernández-Baca, S.; Calderon, W. 1965. Métodos de colección de semen de la alpaca. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru*, 18,19,20: 13-17.
- Folchini NP; Leivas FG; Santos FW; Schwengber EB; Martin DM; Spiazzi CC; Brum DS. 2012. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 36(4): 239-244.
- Fumuso, F.G.; Carretero, M.I.; Neild, D.; Miragaya, M.; Giuliano, S.M. 2015. Evaluación de la viabilidad y el estado acrosomal de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Resultados preliminares. *Primer Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal*, 2015. Buenos Aires, Argentina. P:1
- García, W.; Alarcón, V.; Bravo, PW. 2017. Artificial insemination of alpacas with refrigerated semen and the inclusion of two types of egg yolk. *Rev Inv Vet Perú* 28(2): 337-344
- Garnica, J.; Achata, R.; Bravo, P.W. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci* 32: 85-90.

- Gasset, M.; Magdaleno, L.; Calvete, J.J. 2000. Biophysical Study of the Perturbation of Model Membrane Structure Caused by Seminal Plasma Protein PDC-109. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 374, 2: 241–247
- Gentry, A.; Clutton-Brock, J.; Groves, C.P. 2004. The naming of wild animal species and their domestic derivatives. *Journal Archaeological Science* 31: 645–651.
- Ghoneima, I.M.; Waheeda, M.M.; Al-Hofofib, A.N.; Fayeze, M.M.; Al-Eknaha, M.M.; Al-Busadah, K.A., Al-Humame, N.A. 2014. Evaluation of the microbial quality of fresh ejaculates of camel (*Camelus dromedarius*) semen. *Animal Reproduction Science* 149: 218–223
- Gibb, Z.; Aitken, R.J. 2016. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *BioMed Research International* ID 9380609, 8 pages
- Giuliano, J.; Carretero, M.; Gambarotta, M.; Neild, D.; Trasorras, V.; Pinto, M.; Miragaya, M. 2010. Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science* 118: 98-102
- Giuliano, S.; Director, A.; Gambarotta, M.; Trasorras, V.; Miragaya M. 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science* 104:359–369
- Giuliano, S.M.; Chaves, M.G.; Trasorras, V.L.; Gambarotta, M.; Neil, D.; Director, A.; Pinto, M.; Miragaya, M.H. 2012. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Animal Reproduction Science* 131: 204–210
- Gomes-Alves, S.; Alvarez, M.; Nicolas, M.; Martínez-Rodríguez, C.; Borragán, S.; Chamorro, C.A; Anel, L.; De Paz, P. 2014. Salvaging urospermic ejaculates from brown bear (*Ursus arctos*). *Anim Reprod Sci.*, 150(3/4):148–157.
- Gómez-Quispe, O.E.; Pérez, M.G.; Ojeda-Gutierrez, Y.G. 2016. Survival to freezing of sperm collected by vas deferens from *Vicugna pacos* with Tempol antioxidant addition. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 11:377–382.
- González, V.; Copa, S.; Ochoa, R. 2003. Efecto de la bulbourectomía y periodicidad de colección en las características macro y microscópicas del eyaculado en llamas de tres edades. III Congreso Mundial sobre Camélidos. Libro de Resúmenes. Potosí, Bolivia.
- Guimarães, A.C.G.; Leivas, F.G.; Santos, F.W.; Schwengber, E.B.; Giotto, A.B.; Machado, C.I.U.; Goncalves, C.G.M.; Folchini, N.P.; Brum, D.S. 2014. Reduction

of centrifugation force in discontinuous percollgradients increases in vitro fertilization rates without reducing bovine sperm recovery. *Animal Reproduction Science* 146: 103–110.

- Gwathmey, T.M.; Ignatz, G.G.; Mueller, J.L.; Manjunath, P.; Suarez, S.S. Bovine Seminal Plasma Proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa Share Functional Roles in Storing Sperm in the Oviduct. *Biology of Reproduction* 2006,75: 501–507
- Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K.; Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology* 11(1):73 – 88.
- Hammerstedt, R.H.; Hay, S.R. 1980. Effect of incubation temperature on motility and cAMP content of bovine sperm. *Arch Biochem Biophys* 199:427-437.
- Hanani, Z.A.; Roos, Y.H.; Kerry, J.P. 2014. Use and application of gelatin as potential biodegradable packaging materials for food products. *International Journal of Biological Macromolecules* 71: 94–102
- Harrison, R.A. 1974. The detection of hexokinase, glucosephosphate isomerase and phosphoglucomutase activities in polyacrylamide gels after electrophoresis: a novel method using immobilized glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Anal Biochem* 61, 500-507
- Harshan, H.M.; Singh, L.P.; Arangasamy, A.; Ansari, M.R.; Kumar, S.2006. Effect of buffalo seminal plasma heparin binding protein (HBP) on freezability and in vitro fertility of buffalo cauda spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 93: 124–133.
- Hayaishi O, Matsumura H, Urade Y. Prostaglandin D. 1993. Synthase is the key enzyme in the promotion of physiological sleep. *J Lipid Mediators* 6:429-431.
- Herrid, M.; Billah, M.; Skidmore, J.A. 2017. Successful pregnancies from vitrified embryos in the dromedary camel: Avoidance of a possible toxic effect of sucrose on embryos. *Animal Reproduction Science*, 187: 116-123
- Hirai, M.; Cerbito, W.A., Wijayagunawardane, M.P.B., Braun, J., Leidl, W., Ohosaki, K., Matsuzawa, T., Miyazawa, K., Sato, K.. 1997. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology* 47:1463 – 1478.
- Hollinshead, F.K.; Evans, G.; Evans, K.M.; Catt, S.L.; Maxwell, W.M.C.; O'brien, J.K. 2004. Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen–thawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*. 127:557–568.

- Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 32–22.
- Hsu, S.; Jamieson, A.M. 1993. Viscoelastic behavior at the thermal sol–gel transition of gelatin. *Polymer*, 34, 2602–2608
- Iñiguez, L.C.; Alem, R. 1996. Role of camelids as means of transportation and exchange in the Andean region of Bolivia. *World Animal Review* 86: 12–21
- Jasko, D.J.; Bedford, S.J.; Cook, N.L.; Mumford, E.L.; Squires, E.L.; Pickett, B.W. 1993. Effect of antibiotics 402 on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 40:885-893.
- Jayasankar, V; Subramoniam, T. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1999, 236:253–259.
- Jecht, E.; Poon, C.H. 1975. Preparation of sperm-free seminal plasma from human semen. *Fertility and Sterility* 26(1): 1-5
- Jeyendran RS et al. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70:219-228.
- Jobim, M.I.M.; Oberst, E.R.; Salbego, C.G.; Souza, D.O.; Wald, V.B; Tramontina, F.; Mattos, R.C. 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology* 15, 61(2-3):255-66.
- Jobima, M.I.M.; Oberst, E.R.; Salbego, C.G.; Wald, V.B.; Horn, A.P.; Mattos, R.C.; BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology* 2005, 63: 2053–2062
- Juyena, N. 2011. Protein Profiles and Biochemical Characteristics of semen: influence on frozen thawed spermatozoal quality in rams (*Ovis aries*) and alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis doctoral. Italia. Università degli Studi di Padova. 182 pp.
- Juyena, N.S.; Vencato, J.; Pasini, G.; Vazzana, I.; Stelletta, C. 2013. Alpaca semen quality in relation to different diets. *Reprod Fertil Dev.*, 25(4):683-90.
- Kadwell, M.; Fernandez, M.; Stanley, H.F.; Baldi, R.; Wheeler, J.C.; Rosadio, R.; Bruford, M.W. 2001. Genetic analysis reveals the wild ancestors of llama and alpaca. *Proceedings of the Royal Society London B* 268: 2575–2584
- Kauffman, A.S.; Rissman, E.F. 2006. Neuroendocrine control of mating- induced ovulation. In: Neill, J.D. (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, pp. 2283–2326.

- Keren, K. 2011. Cell motility: the integrating role of the plasma membrane. *Eur Biophys J.* 40:1013 – 1027.
- Kershaw, C.M.; Evans, G; Rodney, R; Maxwell, W.M.C. 2017. Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm function and improve post-thaw motility rates. *Reprod Fertil Dev.* 29(6):1107-1114.
- Kershaw-Young, C.M.; Maxwell, W.M. 2011. The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology.* 76(7):1197-1206.
- Kershaw-Young, C.M.; Maxwell, W.M.C. 2012. Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reprod Dom Anim* 47 (Suppl. 4), 369–375.
- Kgtska, L.; Ryfiska, B.; Smorgg, Z. 1996. Effect of seminal plasma on the in vitro fertilizability of bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 44: 23-31
- Killian, G.; Gerena, R.; Chapman, D.;Cao, Y.A 1996. Fertility-associated protein in bull seminal plasma is Prostaglandin D2 Synthase. *Prostaglandins* 51:296.
- Kim, J-S.; Soucek, J.; Matousek, J.; Raines, R.T. Catalytic activity of bovine seminal ribonuclease is essential for its immunosuppressive and other biological activities. *Biochem. J.* 1995, 308: 547–550.
- Kovács, A.; Foote, R.H. 1992. Viability and Acrosome Staining of Bull, Boar and Rabbit Spermatozoa. *Biotech Histochem.* 67(3):119-24.
- Leahy, T.; Gadella, B.M. 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* 142: 759–778.
- Leboeuf, B.; Restall, B.; Salamon, S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci.* 62: 113 – 141.
- Littell, R.C.; Milliken, G.A.; Stroup, W.W.; Wolfinger, R.D.; Schabenberger, O. 2006. *SAS for Mixed Models. Second editions.* SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- López-Gatius, F.; Sances, G.; Sancho, M.; Yaniz, J.; Santolaria, P.; Gutierrez, R.; Nuñez, M.; Nuñez, J.; Soler, C. 2005. Effect of solid storage at 15°C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology*, 64, 252 – 260
- López-Urueña, E.; Anel-López, L.; Borragan, S.; Ortega Ferrusola, C.; Manrique, P.; De Paz, P.; Anel, L.; Alvarez, M. 2016. The use of gelatine in long- term storage (up to 48 hr) at 5°C preserves the pre- freezing and post- thawing quality of brown bear sperm. *Reprod Domest Anim.* 51(5):700 – 7.
- Love, C.C.; Thompson, J.A.; Brinsko, S.P.; Rigby, S.L.; Blanchard, T.L.; Lowry, V.K.; Varnerb, D.D. 2003. Relationship between stallion sperm motility and viability as

- detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry. *Theriogenology* 60:1127–38.
- Maceda, E.; Copa, S.; Vino. 2003. Efecto de tres dilutores para la congelación del eyaculado de llama (lama glama) bulbouretrectomizado. III Congreso Mundial sobre Camelidos. Libro de Resúmenes. Potosí, Bolivia.
- Machado, G.M.; Carvalho, J.O.; Siqueira Filho, E.; Caixeta, E.S.; Franco, M.M.; Rumpf, R.; Dode, M.A.N. 2009. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology* 71:1289–1297
- Makler, A.; Deutch, M.; Vilensky, A.; Palti, Y. 1981. Factors affecting sperm motility: VIII. Velocity and survival of human spermatozoa as related to temperatures above zero. *Int. J. Androl.* 4, 559–569.
- Malo, C.; Crichton, E.G.; Morrell, J.M.; Pukazhenthil, B.S.; Johannisson, A.; Splan, R.; Skidmore, J.A. 2018. Colloid centrifugation of fresh semen improves post-thaw quality of cryopreserved dromedary camel spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 192: 28–34.
- Malo, C.; Crichton, E.G.; Skidmore, J.A. 2017. Optimization of the cryopreservation of dromedary camel semen: Cryoprotectants and their concentration and equilibration times. *Cryobiology* 74, 141-147.
- Manjunath, P.; Nauc, V.; Bergeron, A.; Menard, M. 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol. Reprod.* 67: 1250-1258.
- Marín JC; Zapata B; González BA; Bonacic C; Wheeler JC; Casey C; Bruford MW; Palma E; Poulin E; Alliende A; Spotorno AE. 2007. Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular. *Revista Chilena Historia Natural* 80: 121–140.
- Matás, C.; Decuadro, G.; Martínez-Miró, S.; Gadea, J. 2007. Evaluation of a cushioned method for centrifugation and processing for freezing boar semen. *Theriogenology*. 67(5): 1087-1091.
- Maxwell, W.M.C.; Parrilla, I.; Caballero, I.; Garcia, E.; Martinez, E.A.; Vasquez, J.M.; Rath, D. 2007. Retained functional integrity of bull spermatozoa after double freezing and thawing using PureSperm density gradient centrifugation. *Reprod Dom Anm.*, 42(5):489-494.

- Miller, D.J.; Winer, M.A.; Ax, R.L. Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol. Reprod.* 1990, 42: 899–915.
- Ming-Jer, C.H.; Bongso, A. 1999. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Human Reproduction* 14(3): 759–764
- Monteiro, G.A.; Guasti, P.N.; Hartwig, F.P.; Dellaqua, J.A.J.Á.; Alvarenga, M.A.; Papa, F.O. 2013. Cooling of ejaculated and epididymal stallion sperm. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 65(3):681-686.
- Morrell, J.M.; Dalin, A.M.; Rodriguez-Martinez, H. 2009. Comparison of density gradient and single layer centrifugation of stallion spermatozoa: yield, motility and survival. *Equine Vet. J.*, 41:53–58.
- Morton, K.M.; Bathgate, R.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. 2007. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of Citrate- Tris- and Lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod. fertil. dev.* 19: 792–796.
- Morton, K.M.; Gibb, Z.; Leahy, T.; Maxwell, W.M.C. 2012. Effect of enzyme treatment and mechanical removal of alpaca (*Vicugna pacos*) seminal plasma on sperm functional integrity. *Journal of Camelid Science* 5:62-81
- Morton, K.M.; Thomson, P.C.; Bailey, K.; Evans, G.; Maxwell, W.M.C. 2010. Quality Parameters for Alpaca (*Vicugna pacos*) Semen are Affected by Semen Collection Procedure. *Reprod Dom Anim* 45, 637–643
- Morton, K.M.; Vaughan, J.L.; Maxwell, W.M.C. 2008. The Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 08/05, Project No. US-138A. Australia. PP:83-91
- Mosaferi, S.; Niasari-Naslaji, A.; Abarghani, A.; Gharahdaghi, A.A.; Gerami, A. Biophysical and biochemical characteristics of bactrian camel semen collected by artificial vagina. 2005. *Theriogenology* 63: 92–101
- Nagy, S.; Sinkovics, G.; Kovacs, A. 2002. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin- supplemented extender. *Animal Reproduction Science*, 70, 283–286.
- Nasrin, J.; Stelletta, C. 2012. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J Androl* 33(4):536–551

- Ng, S.C.; Bongso, T.A.; Sathananthan, H.; Tok, V.C.N; Ratnam, S.S. 1990. Microcentrifugation of human spermatozoa: its effect on fertilization of hamster oocytes after micro-insemination spermatozoal transfer. *Human Reproduction* 5(2):209-211
- Niasari-Naslaji, A.; Mosaferi, S.; Bahmani, N.; Abarghani, A.; Gharahdaghi, A.A.; Gerami, A. 2006. Effect of lactose extender with different levels of osmolality and pH on the viability of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) spermatozoa. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 7(4):14 – 22
- Niasari-Naslaji, A.; Mosaferi, S.; Bahmani, N.; Gerami, A.; Gharahdaghi, A.A.; Abarghani, A.; Ghanbari, A. 2007. Semen cryopreservation in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) using SHOTOR diluent: effects of cooling rates and glycerol concentrations. *Theriogenology* 68: 618-625.
- Nicolas M; Alvarez M; Borragán S; Martinez-Pastor F; Chamorro CA; Alvarez-Rodriguez M; De Paz P; Anel L. 2012. Evaluation of the qualitative and quantitative effectiveness of three media of centrifugation (Maxifreeze, Cushion Fluid Equine, and PureSperm 100) in preparation of fresh or frozen-thawed brown bear spermatozoa. *Theriogenology*, 77(6):1119 – 1128
- Nohalez, A.; Martinez, C.A.; Parrilla, I.; Maside, C.; Roca, J.; Gil, M.A.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E.A.; Cuello, C. 2018. Eventual re-vitrification or storage in liquid nitrogen vapor does not jeopardize the practical handling and transport of vitrified pig embryos. *Theriogenology*.113: 229-236
- Olivares, C.C.S.; Souza-Fabjanm J.M.G.; Fonseca, J.F.; Saraiva, H.F.R.A.; Côrtes, L.R.; Alfradique, V.A.P.; Balaro, M.F.A.; Oliveira, R.V.; Brandão, F.Z. 2019. Mini-percoll gradient may be used for frozen–thawed sperm selection in sheep. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 71(2):455-463 0
- Ordoñez, C.; Cucho, H.; Ampuero, E.; Antezana, W.; Cayo, S. 2013. Artificial insemination with fresh, cooled and thawed alpaca semen collected with electroejaculation. *Spermova*. 3(1): 65– 66
- Pacheco, J.I.; Mamani, R.H.; Velez, V.M. 2017. Effect of seminal plasma on hipoosmotic swelling test in fresh alpaca spermatozoa. *MOJ Biol Med*. 2(4):0059.
- Pan, G.; Z. Chen; X. Liu; D. Li; Q. Xie; F. Ling; L. 2001. Fang. Isolation and purification of the ovulation-inducing factor from seminal plasma in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology* 55: 1863-1879.

- Paolicchi, F.; Urquieta, B.; Del Valle, L.; Bustos-Obrego, E. 1999. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Animal Reproduction Science* 54:203–210
- Paricahua, E. 2001. Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú
- Paulenz, H.; Adnoy, T.; Fossen, O.H.; Soderquist, L. 2010. Effect on field fertility of addition of gelatine, different dilution rates and storage times of cooled ram semen after vaginal insemination. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 706–710.
- Pellicer-Rubio, M.; Magallon, T.; Combarous, Y. 1997. Deterioration of goat sperm in viability in milk extender is due to bulbourethral 60 kilodalton glycoprotein with triglyceride lipasa activity. *Biol Reprod* 57:1023-31
- Pérez, M.G.; Quintano, J.; Perez, U.H. 2014. Sperm survival in cooling a 5 °C recovered the vas deferens of alpaca in three extenders with two membrane protector. *Spermova*. 4(2):153–158.
- Pérez-Marín, C.C.; Requena, F.D.; Arando, A.; Ortiz-Villalón, S.; Requena, F.; Agüera, E.I. 2018. Effect of trehalose- and sucrose-based extenders on equine sperm quality after vitrification: Preliminary results. *Cryobiology* 80: 62-69
- Pesch, S.; Bergmann, M.; Bostedt, H. 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology* 66: 307–313.
- Piehl, L.; Cisale, H.; Torres, N.; Capani, F.; Sterin-Speziale, N.; Hager, A. 2006. Biochemical characterization and membrane fluidity of membranous vesicles isolated from boar seminal plasma. *Animal Reproduction Science* 92: 401-410.
- Quan, G.B.; Wu, G.Q.; Wang, Y.J.; Li, D.J.; Ma, Y.; Hong, Q.H. 2016. Effects of the Tris, Tes, or skim milk-based extender on in vitro parameters of ram spermatozoa during liquid storage. *Small Ruminant Research* 134: 14–21
- Quintano, J. 2002. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú
- Quispe, E.C.; Rodríguez, T.C.; Iñiguez, L.R.; Mueller, J.P. 2009. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information*. 45, 1–14.

- Ratto, M.; Huanca, W.; Singh, J.; Adams, G.P. 2006. Comparison of the effect of natural mating, LH, and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Animal Reproduction Science* 91: 299–306
- Ratto, M.H.; Singh, J.; Huanca, W.; Adams, G.P. 2003. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology* 60, 1645–1656.
- Raymundo, F.; Huanca, W.; Huanca, T.; Huerta, S.; Cordero, A. 2006. Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. *Rev Inv Vet Perú.*, 17(2):125-130.
- Resseguie, W.D.; Hughes, B.L.; Jones, J.E.; Thurston, R.J. 1981. An Evaluation of Gelatin as a Diluent Component for Storage of Chicken Semen. *Poultry Science* 60:469-476.
- Restrepo-Betancur, G.; Cantero-Nanclares, J.M.; Montoya-Paez, J.D. 2016. Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 14 (1): 119 - 125
- Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* 145:1012–1022
- Sabah, A.H.A. Rahman. 2011. Effect of gelatin addition to extender on semen quality of rabbit. *Al- Mustansiriya J. Sci.* 22 (2): 7 – 12.
- Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62: 77–111
- Salvador, I.; Silvestre, M.; Yániz, J.; Viudes-De-Castro, M.; Bernacer, J.; Gómez, E.A. 2005. Effect of solid storage at 5°C on sperm motility of goat semen by addition of gelatin. *Reproduction in Domestic Animals*, 40, 381
- Salvador, I.; Yániz, J.; Viudes-De-Castro, M.P.; Gómez, E.A.; Silvestre, M.A. 2006. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5° C. *Theriogenology*. 66: 974–981.
- Sanchez A; Rubilar J; Gatica R. 2002. Evaluation of fresh and frozen canine semen by the hypoosmotic swelling test. *Arch. med. vet.* 34(1)
- Sánchez, R.; Risopatrón, J.; Schulz, M.; Villegas, J.; Isachenko, V.; Kreinberg, R.; Isachenko, E. 2011. Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function. *Andrologia* 43(4):233-241.
- San-Martin, M.; Copaira, M.; Zuniga, J.; Rodriguez, R.; Bustinza, G.; Acosta, L. 1968. Aspects of reproduction in the alpaca. *J. Reprod. Fertil.* 16 (3), 395–399.

- Santiani, A. 2012. Uso de dos Análogos de Superóxido Dismutasa para prevenir la desestabilización espermática prematura durante la criopreservación y vitrificación en espermatozoides de alpaca. Tesis de doctorado, UNMSM. Lima, Perú.
- Santiani, A.; Evangelista, S.; Valdivia, M.; Risopatrón, J.; Sánchez R. 2013. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 79: 842–846
- Santiani, A.; Huanca, W.; Sapaná, R.; Huanca, T.; Sepulveda, N.; Sanchez, R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl.*, 7(3):303–309.
- Santiani, A.; Rodríguez, J.; Evangelista, S.; Valdivia, M. 2010. PP-18. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Reproductive BioMedicine Online* 20, Suppl 2: S56-S57
- Shahiduzzaman, A.K.; Linde-Forsberg, C. 2007. Induced immotility during long-term storage at +5 °C does not prolong survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 68, 920–933.
- Sharma, S.; Singh, M.; Kapoor, S.; Jasial, S. 2012. Inter relationship between some routine semen evaluation parameters in Jersey X local hill cattle crossbred bulls. *Open Vet J.* 2(1): 26–31.
- Shaw, J.; Jones, G. 2003. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 9(6):583-605.
- Shekarriz, M.; Dewire, D.M.; Thomas, Jr. A.J.; Agarwal, A. 1995. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species, *Eur Urol.* 28 (1):31-35
- Silva P, Gadella B. 2006. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65: 958-978.
- Soler, A.J.; Perez-Guzmsoler, A.J.; Perez-Guzman, M.D.; Garde, J.J. 2003. Storage of red deer epididymis for four days at 5°C: effects on sperm motility, viability, and morphological integrity. *Journal of Experimental Zoology.* 295:188-199.
- Soler, C.; Sancho, M.; García-Molina, A.; Núñez, J.; Parráquez, V.H.; Contell, J.; Bustos-Obregón, E. 2014. Llama and alpaca comparative sperm head morphometric analysis. *Journal of Camelid Science* 7: 48–58
- Souza, C.; Moura, A.; Monaco, E.; Killian, G. 2008. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and

- after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science* 105:72–89.
- Sumar, J.; Leyva, C. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). Memorias del IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Punta Arenas. Chile.
- Sweadner, K.J.; Goldin, S.M. 1980. Active transport of sodium and potassium ions: mechanism, function and regulation. *N. Engl. J. Med.* 302, 777–783
- Taketsuru, H.; Kaneko, T. 2018. Tolerance to vitrification of rat embryos at various developmental stages. *Cryobiology*, Volume 84: 1-3
- Tanco, V.M.; Ratto, M.H.; Lazzarotto, M; Adams, G.P. 2007. Dose response to ovulation-inducing factor (OIF) in llamas. *Abstracts / Theriogenology* 68: 492–518
- Teixeira, S.M.P.; Chaveiro, A.Y.; Moreira, D.A.; Silva, F. 2015. The effects of three extenders on refrigerated boar semen. *S. Afr. j. anim. sci.* 45(1):82 – 88.
- Terreros, M.; Huanca, W.; Arriaga, I.; Ampuero, A. 2015. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Rev Inv Vet Perú*; 26(3): 420-426
- Thys, M.; Vandaele, L.; Morrell, J.; Mestach, J.; Van Soom, A.; Hoogewijs, M.; Rodriguez-Martinez, H. 2009. In vitro fertilizing capacity of frozen-thawed bull spermatozoa selected by single-layer (Glycidoxypopyl trimethoxysilane) silane - coated silica colloidal centrifugation. *Reproduction in Domestic Animals* 44, 390-394.
- Troedsson, M.H.T; Desvouses, A.; Alghamdi, A.S.; Dahms, B.; Dow, C.A.; Hayna, J.; Valesco, R; Collahan, P.T.; Macpherson, M.L.; Pozor, M; Buhi, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science* 2005, 89: 171–186.
- Vadnais, M.L.; Kirkwood, R.N.; Tempelman, R.J.; Sprecher, D.J.; Chou, K. 2005. Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Animal Reproduction Science* 87: 121–132
- Vásquez, J.; Florentini, E.; Valdivia, M. 2012. Hypoosmotic swelling test in Alpaca (*Vicugna pacos*) epididymal spermatozoa. *Reprod Dom Anim.* 2012; 47:e83 – 87
- Vaughan, J.; Galloway, D.; Hopkins, D. 2003. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation, Pub. No. 03/104, Kingston, Australia, pp. 74–77.

- Velásquez, C., Novoa, C. 1999. Superovulación con PMSG aplicada en fase folicular y fase luteal en alpacas. *Rev Inv Vet Perú*, 10(1): 39-47
- Vera, T.; Alberio, R.; Hozbor, F.; Sanchez, E.; Aguillar, D.; Aller, J. 2007. Efecto del agregado de plasma seminal posdescongelación sobre la viabilidad de espermatozoides caprinos. *Revista Argentina de Producción Animal Vol 27 Supl. 1*
- Villanueva, J.C.; Huanca, W.F.; Hilari, F.; Uchuari, M.; Rodríguez, F.; Huanca, W. 2018. Efecto de la estación sobre las características seminales de alpacas (*Vicugna pacos*) criadas a nivel del mar. *Rev Inv Vet Perú* 29(2): 559-564
- Violeta I; Pana R. 2007. The influence of different centrifugation regimes on dog spermatozoa. *Bulletin USAMV-CN*, 64:1-2.
- Vishwanath, R.; Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science* 62: 23–53.
- Vivanco, H.W.; Ayala, J.E.; Huaman, E.; Leon, S.; Ponce, D. 2010. Mejoramiento de la evaluación espermática mediante la innovación en el diseño de la colección seminal y el control de efectos fijos y aleatorios en alpacas Huacaya del Centro Munay Paqocha. Informe Técnico. Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA). Contrato N°-228-2008-CONCYTEC-P. Lima, Perú. PP:26.
- Von Baer, A.; Hellemann, C. 1998. Semen variables in llama. *Arch Med Vet* 30(2): 171–176
- Wani, N.A.; Billah, M.; Skidmore, J.A. 2008. Studies on liquefaction and storage of ejaculated dromedary camel semen. *Anim. Reprod. Sci.* 109(1-4): 309–318
- Weber, W.; Rimann, M.; Schafroth, T.; Witschi, U.; Fussenegger, M. 2006. Design of high-throughput-compatible protocols for microencapsulation, cryopreservation and release of bovine spermatozoa. *Journal of Biotechnology* 123: 155–163.
- WHO, 2010. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Fifth Edition. p. 272
- Woessner, J.F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB J.* 1991,5:2145–2154
- Wuliji, T.; Davis, G.H.; Dodds, K.G.; Turner, P.R.; Andrews, R.N.; Bruce, G.D. 2000. Production performance, repeatability and heritability estimates for live weight, fleece weight and fiber characteristics of alpacas in New Zealand. *Small Ruminant Research* 37: 189–201.

- Yaniz, J.; Marti, J.I.; Silvestre, M.A.; Folch, J.; Santolaria, P.; Alabart, J.L.; Lopez-Gatius, F. 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, 64, 1844 – 1851.
- Zahn, F.S.; Papa, F.O.; Melo, C.M. 2006. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: Are they correlated to semen freezability?. *Animal Reproduction Science* 94: 64-66.
- Zini, A.; De Lamirande, E.; Gagnon, C. 1993. Reactive oxygen species in semen seminal of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 16, 183-188.

## **ANEXOS**

## ANEXOS PARA RECUPERACIÓN, MOTILIDAD E INTEGRIDAD FUNCIONAL DE MEMBRANA DE ESPERMATOZOIDES DESPUÉS DE CENTRIFUGACIÓN

### ANÁLISIS DE VARIANZA PARA RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES

#### **Anexo 1.** Análisis de varianza del modelo para recuperación de espermatozoides

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	33106.7465	6621.3493	359.56	<.0001
Error	42	773.4311	18.4150		
Total	47	33880.1776			

Coefficiente de variación = 5.811436

#### **Anexo 2.** Análisis de varianza para variables fuerza de centrifugación por tiempo, medios e interacción

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Fuerza de centrifugación por tiempo	2	22470.2955	11235.1478	610.11	<.0001
Medio	1	4425.7922	4425.7926	240.34	<.0001
Interacción	2	6210.6587	3105.3294	168.63	<.0001

#### **Anexo 3.** Interacción: efecto dividido por fuerza de centrifugación por tiempo para recuperación de espermatozoides

Fuerza de centrifugación por tiempo	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
492g × 15 min	1	10523	10523	571.44	<.0001
1968g × 10 min	1	108.2640	108.2640	5.88	0.0197
4448g × 07 min	1	5.0176	5.0176	0.27	0.6044

#### **Anexo 4.** Interacción: efecto dividido por medios para recuperación de espermatozoides

Medios de centrifugación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
PureSperm80	2	25248	12624	685.53	<.0001
Tris	2	3432.6678	1716.3339	93.20	<.0001

## ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PÉRDIDA DE MOTILIDAD

### Anexo 5. Análisis de varianza del modelo para pérdida de motilidad

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	127.2180	25.4436	11.72	<.0001
Error	42	91.1462	2.1701		
Total	47	218.3642			

Coefficiente de variación = 24.2484

### Anexo 6. Análisis de varianza para las variables de pérdida de motilidad

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Fuerza de centrifugación por tiempo	2	3.9703	1.9852	0.91	0.4084
Medio	1	98.4700	98.4700	45.37	<.0001
Interacción	2	24.7776	12.3888	5.71	0.0064

### Anexo 7. Interacción: efecto dividido por fuerza de centrifugación por tiempo para pérdida de motilidad

Fuerza de centrifugación por tiempo	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
492g × 15 min	1	5.382400	5.382400	2.48	0.123
1968g × 10 min	1	30.442806	30.442806	14.03	0.005
4448g × 07 min	1	87.422500	87.422500	40.28	<.001

### Anexo 8. Interacción: efecto dividido por medios para pérdida de motilidad

Medios de centrifugación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tris	2	17.3175	8.6587	3.99	0.0259
PureSperm80	2	11.4305	5.7152	2.63	0.0837

**ANÁLISIS DE VARIANZA PARA PÉRDIDA DE INTEGRIDAD FUNCIONAL DE LA MEMBRANA**

**Anexo 9.** Análisis de varianza del modelo para integridad funcional de la membrana espermática

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	5	183.5079	36.7016	16.30	<.0001
Error	42	94.5623	2.2515		
Total	47	278.0701			

**Anexo 10.** Análisis de varianza para las variables de integridad funcional de membrana espermática

Fuente de variación	Grados de libertad	Tipo III SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Fuerza de centrifugación por tiempo	2	76.18978	38.0949	16.92	<.0001
Medio	1	95.2158	95.2158	42.29	<.0001
Interacción	2	12.1023	6.0512	2.69	0.0797

**ANEXOS PARA MOTILIDAD E INTEGRIDAD FUNCIONAL DE MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE DESPUÉS DE GELIFICADO A DIFERENTES HORAS**

**Anexo 11.** Procedimiento mixed. Información del modelo para motilidad

Información del modelo	
Conjunto de datos	WORK.MOTIGELIF
Variable dependiente	motilasin
Estructura de covarianza	Simetría compuestas
Efecto de asunto	eyaculad(tratamie)
Método de estimación	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Between-Within

**Anexo 12.** Procedimiento mixed. Estadísticos de ajuste para motilidad

Estadísticos de ajuste	
Verosimilitud -2 Res Log	-240.1
AIC (Smaller is Better)	-236.1
AICC (Smaller is Better)	-236.0
BIC (Smaller is Better)	-234.3

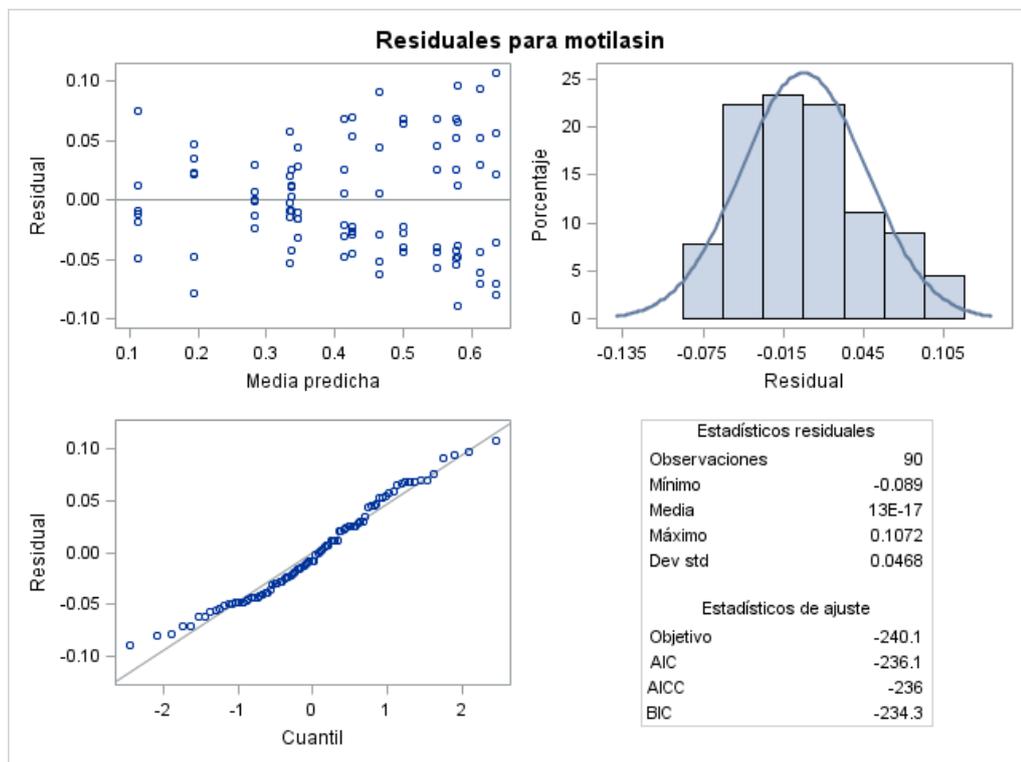
**Anexo 13.** Procedimiento mixed. Test para efectos fijos para motilidad

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
tratamie	2	15	19.65	<.0001
horas	4	60	350.70	<.0001
tratamie*horas	8	60	19.10	<.0001

Anexo 14. Procedimiento mixed. Diferencias de medias de mínimos cuadrados para motilidad

Efecto	tratamie	horas	_tratamie	_horas	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t	Ajuste	Adj P
tratamie	1		2		-0.07869	0.02387	15	-3.30	0.0049	Bonferroni	0.0147
tratamie	1		3		-0.1496	0.02387	15	-6.27	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie	2		3		-0.07090	0.02387	15	-2.97	0.0095	Bonferroni	0.0286
horas		0		24	0.09494	0.01109	60	8.56	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		0		48	0.1734	0.01109	60	15.64	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		0		72	0.2916	0.01109	60	26.30	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		0		96	0.3649	0.01109	60	32.92	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		24		48	0.07850	0.01109	60	7.08	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		24		72	0.1967	0.01109	60	17.74	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		24		96	0.2700	0.01109	60	24.35	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		48		72	0.1182	0.01109	60	10.66	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		48		96	0.1915	0.01109	60	17.27	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		72		96	0.07332	0.01109	60	6.61	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	1	0	2	0	0.05495	0.02941	60	1.87	0.0666	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	1	0	3	0	0.02361	0.02941	60	0.80	0.4253	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	2	0	3	0	-0.03134	0.02941	60	-1.07	0.2908	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	1	24	2	24	-0.03444	0.02941	60	-1.17	0.2462	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	1	24	3	24	-0.1120	0.02941	60	-3.81	0.0003	Bonferroni	0.0348
tratamie*horas	2	24	3	24	-0.07756	0.02941	60	-2.64	0.0106	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	1	48	2	24	-0.1666	0.02941	60	-5.66	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	1	48	3	48	-0.2153	0.02941	60	-7.32	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	2	48	3	48	-0.1232	0.02941	60	-4.19	<.0001	Bonferroni	0.0098
tratamie*horas	1	72	2	72	-0.1529	0.02941	60	-5.20	<.0001	Bonferroni	0.0003
tratamie*horas	1	72	3	72	-0.2207	0.02941	60	-7.50	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	2	72	3	72	-0.06780	0.02941	60	-2.31	0.0246	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	1	96	2	96	-0.1690	0.02941	60	-5.75	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	1	96	3	96	-0.2236	0.02941	60	-7.60	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	2	96	3	96	-0.05462	0.02941	60	-1.86	0.0682	Bonferroni	1.0000

**Anexo 15.** Procedimiento mixed. Diagnóstico de residuos (Post Hoc) para motilidad



**Anexo 16.** Procedimiento mixed. Información del modelo para integridad funcional de membrana del espermatozoide

Información del modelo	
Conjunto de datos	WORK.FUNCGELIF
Variable dependiente	funcmasin
Estructura de covarianza	Simetría compuestas
Efecto de asunto	eyaculad(tratamie)
Método de estimación	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Between-Within

**Anexo 17.** Procedimiento mixed. Estadísticos de ajuste para integridad funcional de membrana del espermatozoide

Estadísticos de ajuste	
Verosimilitud -2 Res Log	-165.1
AIC (Smaller is Better)	-161.1
AICC (Smaller is Better)	-161.0
BIC (Smaller is Better)	-159.4

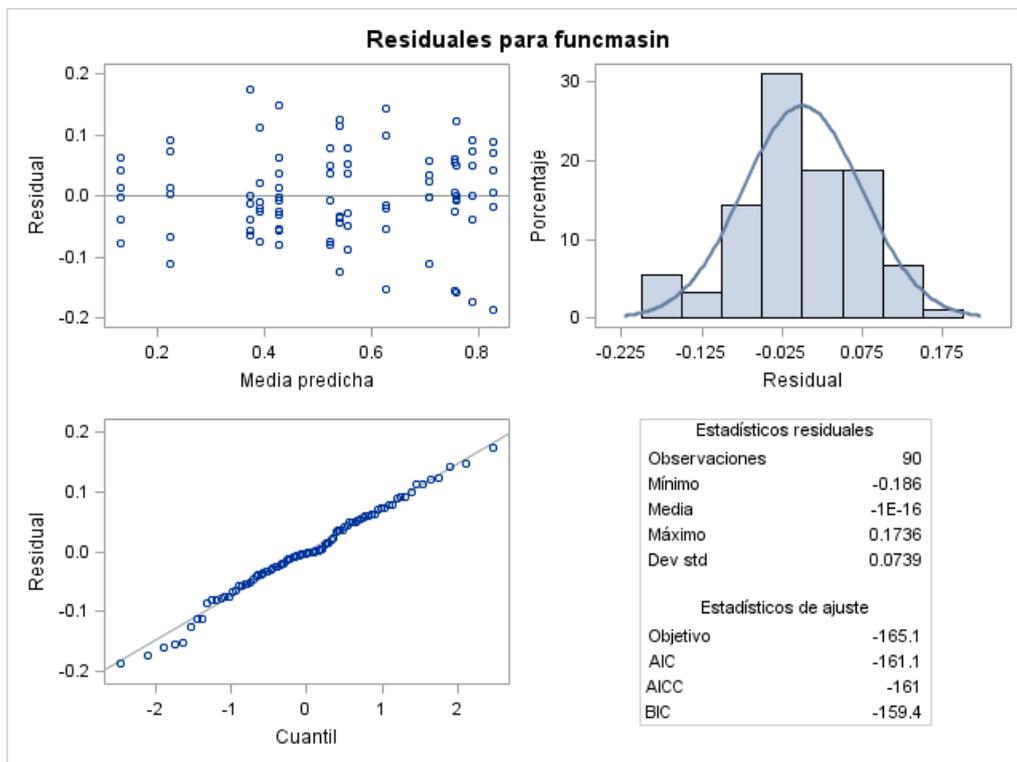
**Anexo 18.** Procedimiento mixed. Test para efectos fijos para integridad funcional de membrana del espermatozoide

Tests de tipo 3 de efectos fijos				
Efecto	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	2	15	19.19	<.0001
Horas	4	60	207.87	<.0001
Tratamiento*Horas	8	60	13.66	<.0001

**Anexo 19.** Procedimiento mixed. Diferencias de medias de mínimos cuadrados para integridad funcional de membrana del espermatozoide

Diferencias de medias de mínimos cuadrados											
Efecto	tratamie	Horas	_tratamie	_horas	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t	Ajuste	Adj P
tratamie	1		2		-0.1182	0.03640	15	-3.25	0.0054	Bonferroni	0.0162
tratamie	1		3		-0.2254	0.03640	15	-6.19	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie	2		3		-0.1072	0.03640	15	-2.95	0.0100	Bonferroni	0.0301
horas		0		24	0.1482	0.01864	60	7.95	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		0		48	0.2488	0.01864	60	13.35	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		0		72	0.3870	0.01864	60	20.76	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		0		96	0.4799	0.01864	60	25.75	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		24		48	0.1006	0.01864	60	5.40	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		24		72	0.2387	0.01864	60	12.81	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		24		96	0.3316	0.01864	60	17.79	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		48		72	0.1381	0.01864	60	7.41	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		48		96	0.2310	0.01864	60	12.40	<.0001	Bonferroni	<.0001
horas		72		96	0.09290	0.01864	60	4.98	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	1	0	2	0	0.07332	0.04646	60	1.58	0.1198	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	1	0	3	0	0.03964	0.04646	60	0.85	0.3969	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	2	0	3	0	-0.03368	0.04646	60	-0.72	0.4713	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	1	24	2	24	-0.08720	0.04646	60	-1.88	0.0654	Bonferroni	1.0000
tratamie*horas	1	24	3	24	-0.2202	0.04646	60	-4.74	<.0001	Bonferroni	0.0014
tratamie*horas	2	24	3	24	-0.1330	0.04646	60	-2.86	0.0058	Bonferroni	0.6061
tratamie*horas	1	48	2	48	-0.1310	0.04646	60	-2.82	0.0065	Bonferroni	0.6814
tratamie*horas	1	48	3	48	-0.3158	0.04646	60	-6.80	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	2	48	3	48	-0.1847	0.04646	60	-3.98	0.0002	Bonferroni	0.0201
tratamie*horas	1	72	2	72	-0.2043	0.04646	60	-4.40	<.0001	Bonferroni	0.0048
tratamie*horas	1	72	3	72	-0.3328	0.04646	60	-7.16	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	2	72	3	72	-0.1285	0.04646	60	-2.77	0.0075	Bonferroni	0.7911
tratamie*horas	1	96	2	96	-0.2417	0.04646	60	-5.20	<.0001	Bonferroni	0.0003
tratamie*horas	1	96	3	96	-0.2978	0.04646	60	-6.41	<.0001	Bonferroni	<.0001
tratamie*horas	2	96	3	96	-0.05612	0.04646	60	-1.21	0.2319	Bonferroni	1.0000

**Anexo 20.** Procedimiento mixed. Diagnóstico de residuos (Post Hoc) para integridad funcional de membrana del espermatozoide



**ANEXOS PARA CAPACIDAD DE PREÑEZ DE ALPACA A 30 DIAS  
POSINSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

**Anexo 21.** Análisis de estimadores de parámetros de máxima verosimilitud de regresión logística binomial para datos cualitativos

Parámetro	DF	Estimador	Error estándar	% de límites de confianza 95 de ratio de verosimilitud		Chi-cuadrado de Wald	Pr > ChiSq
Intercepto	1	-0.0000	0.5774	-0.0000	-0.0000	0.00	1.0000
Tratamiento T3	1	-26.7924	189801.1	-26.7924	-26.7924	0.00	0.9999
Tratamiento T2	1	-0.6931	0.8416	-0.6931	-0.6931	0.68	0.4102
Tratamiento T1	0	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	.	.
Escala	0	1.0000	0.0000	1.0000	1.0000		

**Anexo 22.** Estadísticos para análisis de regresión logística binomial y contrastes

**Estadísticos LR para análisis tipo 1**

Fuente	Desviación	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq
Intercepto	10.6288			
Tratamiento	0.0000	2	10.63	0.0049

**Resultados del contraste**

Contraste	DF	Chi-cuadrado	Pr > ChiSq	Tipo
<b>T3 vs. T2</b>	1	6.35	0.0117	LR
<b>T3 vs. T1</b>	1	10.36	0.0013	LR
<b>T2 vs. T1</b>	1	0.69	0.4064	LR

**Anexo 23.** Parámetros espermáticos (tasas) poscentrifugación a diferentes fuerzas de centrifugación por tiempo, medios de centrifugación e interacción.

Parámetros espermáticos (tasas)	P-valor		
	Fuerza de centrifugación por tiempo†	Medio de centrifugación‡	Interacción
Recuperación de espermatozoides	<0.001	<0.001	<0.001
Pérdida de motilidad	<0.318	<0.001	<0.005
Pérdida de funcionalidad de membrana	<0.002	<0.001	<0.165

† Fuerza de centrifugación por tiempo: 492 × g por 15 min, 1968 × g por 10 min, y 4448 × g por 7 min.

‡ Medios usados para centrifugación de eyaculados: dilutor Tris y PureSperm®80