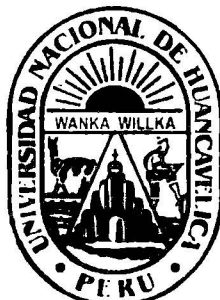


UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCABELICA

(Creada por Ley N° 25265)



**FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE ZOOTECNIA**

TESIS

**EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE
CRIOPRESERVACIÓN EN LA VIABILIDAD DE
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE
ALPACA (*Vicugna pacos*)**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

BIOTECNOLOGIA REPRODUCTIVA

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO ZOOTECNISTA**

PRESENTADO POR:

**Bach. CAYLLAHUA PEÑA, Néllida Jessie
Bach. QUISPE CANDIOTTI, Yanet**

Asesor:

Dr. RUIZ BEJAR, Jaime Antonio

**HUANCABELICA - PERÚ
2013**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCÁVELICA

FACULTAD DE CIENCIAS DE INGENIERÍA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el Auditorium de la Facultad de Ciencias de Ingeniería, a los 30 días del mes de mayo del año 2013, a horas 3:00 p.m, se reunieron los miembros del Jurado Calificador conformado por los siguientes: **Ing. Yola Victoria RAMOS ESPINOZA (PRESIDENTA)**, **Ing. Marino ARTICA FÉLIX (SECRETARIO)**, **M.Sc. Rufino PAUCAR CHANCA (VOCAL)**. designados con la Resolución de Consejo de Facultad N° 003-2012-FCI-COyG-UNH, de fecha 22 de octubre del 2012, y ratificados con la Resolución de Decano N°165-2013-FCI-UNH de fecha 30 de mayo del 2013 a fin de proceder con la evaluación y calificación de la sustentación del informe final de tesis titulado: "EVALUACIÓN DE TRES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACIÓN EN LA VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMARIOS DE ALPACA (*Vicugna pacos*)", presentada por las Bachilleres **Néllida Jessie Cayllahua Peña y Yanet Quispe Candiotti**, para optar el **Título Profesional de Ingeniero Zootecnista**; en presencia del **Dr. Jaime Antonio RUIZ BEJAR**, Asesor del presente trabajo de tesis. Finalizado la evaluación a horas 4:10 p.m., se invitó al público presente y a las sustentantes abandonar el recinto. Luego de una amplia deliberación por parte de los Jurados, se llegó al siguiente resultado:

Néllida Jessie CAYLLAHUA PEÑA

APROBADO



POR... Mayoría

DESAPROBADO



Yanet QUISPE CANDIOTTI

APROBADO



POR... Mayoría

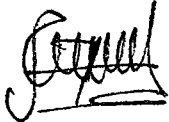
DESAPROBADO



En conformidad a lo actuado firmamos a continuación:



Presidente



Vocal



Secretario



Vº Bº Decano

A Dios y a mi familia por su
incansable apoyo.

Yanet.

A Dios, a mis padres, esposo
Hugo, hijos y hermanos quienes
son el motivo de mi superación y
me apoyaron incondicionalmente
en mi carrera profesional.

Jessie.

AGRADECIMIENTOS

- Al Dr. Jaime Antonio Ruiz Bejar, asesor de la tesis, por su orientación oportuna durante la ejecución del proyecto y redacción del informe final.
- A Jose Luis Mendoza Mallma compañero de la E.A.P. de Zootecnia, por su apoyo en la parte experimental del proyecto de tesis.
- A nuestros catedráticos de la E.A.P. de Zootecnia por sus enseñanzas en vuestra formación profesional.
- A nuestros padres por su apoyo incondicional en lo moral y económico.

Las Tesistas.

ÍNDICE

CARÁTULA	1
DEDICATORIAS	2
AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE	4
RESUMEN	11
CAPÍTULO I: PROBLEMA	13
1.1 Planteamiento del problema	13
1.2 Formulación del problema.	14
1.3 Hipótesis	14
1.4 Variable	15
1.5 Objetivos	16
1.6 Justificación	16
CAPITULO II: MARCO TEORICO Y COMCEPTUAL	18
2.1 Antecedentes	18
2.2 Bases teóricas de la investigación	26
2.1.1. Factores que influyen en la producción de espermatozoides	26
2.1.2. Factores que afectan al espermatozoide durante el proceso de Criopreservación	27
2.1.3. Alteraciones de los espermatozoides durante el proceso de Criopreservación	32
2.1.4. Efecto de la criopreservación sobre el espermatozoide	33
2.1.5. Criopreservación de espermatozoides de cola de epididimo	34
2.1.6. Crioprotectores	34
2.1.7. Refrigeración	37

2.1.8. Congelamiento de semen	37
2.1.9. Vitricación	39
CAPITULO III: METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION	40
3.1. Ámbito de estudio	40
3.2. Tipo de investigación	40
3.3. Nivel de investigación	40
3.4. Método de la investigación	41
3.5. Diseño de la investigación	41
3.6. Población, muestra y muestreo	41
3.7. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	43
3.8. Procedimiento de recolección de datos	50
3.9. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	50
3.10. Ámbito de estudio	51
CAPITULO IV: MATERIALES Y METODOS	52
4.1. Materiales y métodos de laboratorio	52
4.2. Reactivos	53
4.3. Crioprotectores	54
4.4. Equipos	54
4.5. Otros	55
4.6. Materiales de escritorio	55
4.7. Equipos de escritorio	56
RESULTADOS	57
DISCUSIONES	63

CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	66
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	67
ANEXOS	77

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	Pág
Cuadro N° 1: Evaluación seminal empleando dos técnicas de Colección Vagina Artificial y electro eyaculación)	20
Cuadro N° 2: Principales características de semen de alpaca	26
Cuadro N° 3: El SP- TALP stock.	46
Cuadro N° 4: SP- TALP (suplementado).	46
Cuadro N° 5: Procedimiento ANOVA para Motilidad Variable Dependiente	57
Cuadro N° 6: Comparaciones de medias con la Prueba de Tukey	57
Cuadro N° 7: Comparaciones entre tratamientos con la Prueba de Tukey	57
Cuadro N° 8: Procedimiento ANOVA para Concentración	58
Cuadro N° 9: Comparaciones de medias con la Prueba de Tukey:	58
Cuadro N° 10: Comparaciones entre tratamientos con la Prueba de Tukey	58
Cuadro N° 11: Procedimiento ANOVA para Vivos:	59
Cuadro N° 12: Comparaciones de medias con la Prueba de Tukey:	59
Cuadro N° 13: Comparaciones entre tratamientos con la Prueba de Tukey	59



INDICE DE GRÁFICOS

GRAFICO	Pág
Gráfico N° 1 : Porcentaje de Motilidad espermática según protocolos de criopreservación en alpacas	60
Gráfico N°2 : Concentración espermática según protocolos de criopreservación de alpacas en millones.	61
Gráfico N°3 : Porcentaje de vivos según protocolos de criopreservación en alpacas	62

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍAS	Pág
• Fotografía N° 01: Materiales utilizados en la investigación	85
• Fotografía N° 02: Materiales utilizados en la investigación	85
• Fotografía N° 03: Momento de identificación de animales y colección de testículos	86
• Fotografía N° 04: Alpaca de 4 dientes	86
• Fotografía N° 05: Alpaca de 4 dientes	87
• Fotografía N° 06: Extracción de testículos de alpaca	87
• Fotografía N° 07: Extracción de testículos de alpaca	88
• Fotografía N° 08: Separación de la membrana testicular	88
• Fotografía N° 09: Limpieza de la cola del epidídimo	89
• Fotografía N° 10: Trituración de epidídimo en medio de dilución	89
• Fotografía N° 11: Muestras con tinción de Eosina, previamente identificadas	90
• Fotografía N° 12: Evaluación de las muestras en el microscopio	90
• Fotografía N° 13: Preparación de la cámara de Neubauer para realizar el conteo de espermatozoides	91
• Fotografía N° 14: Evaluación de muestra de alpaca de boca llena. 40X.	91
• Fotografía N° 15: Proceso de congelación de espermatozoide de alpaca	92
• Fotografía N° 16: Enpajillado de espermatozoide d alpacas para congelación.	92
• Fotografía N° 17: Sellado con alcohol polivinílico para congelación de espermatozoide de alpaca.	93
• Fotografía N° 18: Exposición de pajillas de espermatozoide de alpaca al nitrógeno líquido.	93

• Fotografía N° 19: Preparación de muestras para vitrificación.	94
• Fotografía N° 20: centrifugado de muestra.	94
• Fotografía N° 21: Extracción de muestra de centrifugado.	95
• Fotografía N° 22: Muestra en medio de vitrificación.	95
• Fotografía N° 23: Estabilización de muestra con medio de vitrificación en Incubadora a 37°C.	96
• Fotografía N° 24: Preparación del nitrógeno líquido para vitrificación.	96
• Fotografía N° 25: Lanzado de alícuotas de muestra en superficie expuesta a nitrógeno líquido.	97
• Fotografía N° 26: vitrificación.	97
• Fotografía N° 27: Descongelación de alícuotas vitrificadas en medio Sp–Talp Stock a 37° c.	98
• Fotografía N° 28: Extracción de muestra para evaluación de muestra.	98
• Fotografía N° 29: Evaluación de muestras post congelación. 40X.	99
• Fotografía N° 30: Evaluación de muestras post congelación. 40X.	99
• Fotografía N° 31: Evaluación de muestras post vitrificación. 40X.	100
• Fotografía N° 32: Evaluación de muestras post vitrificación. 40X.	100

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio Central ubicado en la Universidad Nacional de Huancavelica de la Ciudad Universitaria de Paturpampa, del distrito de Huancavelica, provincia y departamento de Huancavelica, a una altitud aproximada de 3670 m.s.n.m. El objetivo del presente estudio fue determinar cuál de los tres protocolos de criopreservación permite obtener mayor cantidad de espermatozoides epididimarios en alpacas viables post- congelamiento, los criopreservantes utilizados fueron glicerol un 99.5% de pureza (tratamiento 2), etilenglicol un 99% de pureza (tratamiento 3) y andromed (tratamiento 1) y testigo, para lo cual se utilizaron muestras mayores a 75 % de motilidad, se emplearon 12 pares de testículos por tratamiento, para la extracción de espermatozoides epididimarios se uso el método de trituración del epidídimo. Para identificación de la edad de los animales se utilizó la técnica de dentición. Y para la determinación de motilidad se utilizó el andromed como dilutor en el caso del tratamiento 1 y fresco (testigo), en el caso de los otros dos tratamientos se utilizó como dilutor SP-TALP (tratamiento 2 y 3) respectivamente, la concentración se determinó mediante un conteo de espermios en la cámara de Neubauer, mientras que para la determinación de vivos y muertos se utilizó la tinción de Eosina en microscopio óptico a 40X. Para la evaluación de la motilidad se tomó los siguientes rangos: muy buena (> 95%), buena (80- 95%), regular(70-80%), mala (60-70%), nula o muy mala(<60%). En nuestro caso la motilidad promedio es de 83 % en caso del testigo, obtenidas de la cola del epidídimo con el dilutor Andromed. Así mismo se evaluó la motilidad

post congelamiento (congelación tradicional) obteniendo un promedio que es 73% siendo este el porcentaje más alto que se obtuvo en el trabajo de investigación, en la evaluación del tratamiento 2 (vitrificación con glicerol), se obtuvo un promedio de 22% en motilidad, así mismo en el tratamiento 3 (vitrificación con etilenglicol) no hubo motilidad.

Los resultados que se obtuvieron en las concentraciones del tratamiento 1 fue de 28 millones, en el tratamiento 2 se obtuvo 44 millones, en el tratamiento 3 se obtuvo 24 millones mientras que en testigo se obtuvo 36 millones de espermios. Los resultados obtenidos en vivos en el tratamiento 1 fue de 30 %, en el tratamiento 2 se obtuvo 2%, en el tratamiento 3 no se encontró espermios vivos mientras que en fresco se obtuvo 66% de espermios vivos. Concluyendo se encontró diferencia estadística altamente significativa entre los 3 tratamientos ($P < 0.01$).

PALABRAS CLAVE: Alpaca, semen, criopreservación, glicerol y etilenglicol, congelación tradicional, andromed.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La crianza de alpaca constituye una actividad económica de gran importancia para un vasto sector de la población alto andina principalmente Bolivia y Perú y en menor grado Argentina, Chile y Ecuador. En la región Huancavelica existen más de 225,000 alpacas (**MINAG 2006**), las que constituyen alrededor del 7% de la población total nacional y de las cuales el 90% es de raza Huacaya (**Quispe y col, 2008**). Estos rebaños se caracterizan por carecer de sistemas de crianza adecuados y con escasos criterios de mejoramiento genético (**Quispe y col, 2008**).

Dentro de las tecnologías reproductivas, la inseminación artificial con semen congelado ha sido una potente herramienta para el mejoramiento genético en vacunos y ovinos (**Ruiz y col, 2009**). Las características especiales que presentan los camélidos sudamericanos en cuanto a su reproducción los hacen especies suigeneris (**Pacheco, 2008**).

Escasos trabajos de inseminación animal han sido publicados hasta el presente en camélidos sudamericanos, debido quizás a la falta de una metodología fiable de recolección de semen y a las características seminales de alta viscosidad, baja motilidad, baja concentración espermática **Fowler (1989)** y la falta de conocimiento sobre el uso de dilutores **Bustinza (2001)**.

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

Estudios posteriores reportaron tasas inferiores de motilidad post congelamiento tales como las mencionadas por **Vaughan y col (2003)** que obtuvo porcentajes de 17.4%; **Santiani y col (2005)**, reportó la obtención de motilidades que iban desde 4 a 20%.

Por otro lado la vitrificación es una tecnología que ha superado a la congelación tradicional en la criopreservación de ovocitos, mejorando las tasas de supervivencia post congelamiento y desarrollo embrionario en muchas especies domésticas **Albarracín (2005)**. Asimismo se ha logrado la vitrificación exitosa de ovocitos en caprinos **Begin y col (2003)**, porcinos **Somfai y col (2007)**, ovinos **Zhang y col (2009)** y alpacas **Ruiz y col (2011)**. También existen reportes de la vitrificación exitosa de espermatozoides de perro (**Kim y col 2012**) y de bagre con resultados

que requiere mayor estudio para mejorar los índices de viabilidad y motilidad post congelamiento (Cuevas y col 2011).

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Cuál de los tres protocolos de criopreservación permitirá obtener mayor cantidad de espermatozoides epididimarios viables en alpacas post congelamiento?

1.3. HIPÓTESIS

Ho: Ninguno de los tres protocolos de criopreservación permiten obtener cantidades de espermatozoides epididimarios viables en alpacas post congelamiento

Ha: Por lo menos uno de los tres protocolos de criopreservación permiten obtener cantidades de espermatozoides epididimarios viables en alpacas post congelamiento.

1.4. IDENTIFICACION DE VARIABLES

Variable independiente

- Tres protocolos de vitrificación

Variable dependiente

- Motilidad de espermatozoides epididimarios. expuestos a congelación.
- Concentración de espermatozoides epididimarios. expuestos a congelación.
- Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, expuestos a congelación.

1.5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar cuál de los tres protocolos de criopreservación permite obtener mayor cantidad de espermatozoides epididimarios de alpacas viables post-congelamiento.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Evaluar la motilidad epididimarios vivos post-congelación.
- Evaluar la concentración de espermatozoides epididimarios vivos post-congelación.
- Evaluar el porcentaje de espermatozoides epididimarios vivos post-congelación.

1.5. JUSTIFICACION

La Alpaca (*Vicugna pacos*); Linnaeus (1758) y Gentry y col. (2004), es una de las especies de camélidos sudamericanos más importantes, debido al valor económico que representa la producción de la fibra para las comunidades alto andinas. Es así que, urge aplicar programas de mejoramiento genético para incrementar la calidad y cantidad de fibra y así atender a un mercado nacional e internacional cada vez más exigente.

La criopreservación de germoplasma (gametos y embriones) es una herramienta que permite hacer extensivo y conservar el material genético de animales valiosos

dentro de los programas de mejoramiento genético. En el caso de espermatozoides, existe todavía un gran reto debido a las características del semen, ya que presenta alta viscosidad y esto dificulta el manejo, dilución y congelación e incluso su evaluación.

Sin embargo, una alternativa es trabajar con espermatozoides libres de plasma seminal (cola de epidídimo y conducto deferente) porque carece de las dificultades anteriores para su procesamiento y evaluación. Asimismo, los espermatozoides de epidídimo pueden emplearse en estudios de capacitación espermática y fertilización *in vitro*.

La mayoría de trabajos de vitrificación han sido realizados en otras especies, por lo que es necesaria mayor investigación sobre todo en alpacas en donde hasta la fecha no se ha realizado estudios de vitrificación de espermatozoides epididimarios. Si en este trabajo se logra obtener espermatozoides viables post congelamiento, sin duda será un gran aporte. La técnica de obtención de espermatozoides de epidídimo es utilizada muchas veces en especies domesticas equino, vacuno, ovino y también en muchas especies silvestres con el fin conservar o extender su material genético. En Alpacas, los testículos pueden ser recuperados del camal o luego de muerte accidental, accidentes muy graves, etc. La recuperación de espermatozoides de epidídimo de alpacas de gran valor genético, muertos en forma imprevista, minimiza la pérdida genética en caso que se trataran de animales de excelente calidad.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Enríquez (1994) al evaluar semen colectado a diferentes tiempos con vagina artificial en alpacas en la Universidad Nacional del Altiplano en Puno, obtuvo los resultados volumen 0.6 ml, motilidad 14%, concentración 65 millones/ml.

Pérez y col (2006), realizaron el trabajo de congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol con el objetivo de determinar la sobrevivencia de los espermatozoides de alpacas y llamas exentos de secreción de las glándulas anexas a la congelación. Los espermatozoides fueron colectados por desviación de los conductos deferentes, evaluados, envasados en pajillas de 0.25 ml, se procedió a congelar en vapores de nitrógeno líquido, la descongelación se realizó en baño María a 37 °C por 30 segundos. La motilidad progresiva a la post-descongelación se evaluó adecuando la salida del microscopio a la pantalla de un televisor, los resultados obtenidos fueron: el volumen de 0.263 y 0.418 ml para

alpacas y llamas. La concentración fue 25.53 y 40.49 millones de espermatozoides/ml para alpacas y llamas. La morfología de los espermatozoides normales fue: 61.72 % para alpacas y 59.16 para llamas sin diferencia, anormalidades primarias 7.03 % y 15.99% con diferencia y anormalidades secundarias 31.25% y 24.85% similares, en alpacas y llamas respectivamente. La motilidad progresiva inicial (dilución) fue 74.3%, 77.7% y 68.6% en alpacas y 63.0%, 66.9% y 59.1% en llamas con diferencia, a la descongelación varió el índice de recuperación del 18.0% al 43.0% dependiendo del nivel de yema de huevo. En conclusión, los espermatozoides exentos de la secreción de la próstata y glándulas bulbo uretrales soportan la congelación.

Valores que se obtuvieron en un trabajo realizado por **Giuliano y col (2008)**, en la cual se utilizaron 92 eyaculados de llama, comparando dos métodos de extracción de semen (Vagina artificial y electro eyaculación) con una diferencia significativa.

Cuadro N° 1: Evaluación seminal empleando dos técnicas de colección (vagina artificial y electro eyaculación)

VARIABLE	TÉCNICA DE COLECCIÓN	
	Vagina artificial	Electro eyaculación
Volumen (ml)	2.45 +/- 1.62	2.78 +/- 1.50
Concentración espermática (10 ⁶ /ml)	72.79 +/- 68.96	50.28 +/- 73.13
Motilidad espermática (%)	27.02 +/- 25.44	26.88 +/- 28.66
Vivos (%)	59.23 +/- 12.96	65.21 +/- 13.42

Fuente: Giuliano y col. (2008)

Kim y col (2012), mencionan que desarrollaron un método rápido de congelación de semen canino, sin el equilibrio de refrigeración mediante agentes crioprotectores (CPAs) y congelación en nitrógeno líquido de vapor en una pajilla de 0,5 ml a través de la modificación de la vitrificación. Eyaculados de ocho perros Beagle se congelaron con diferentes CPA (sin crioprotectores, 5% de glicerol, 5% de etilenglicol y 10% de etilenglicol) y tiempos de congelación (hundimiento directo en nitrógeno líquido o congelación por 1, 2, 3, o 10 min en vapores de nitrógeno líquido antes de sumergirse en nitrógeno líquido).

Se evaluó en espermatozoides descongelados la motilidad, viabilidad, morfología normal del plasma seminal e integridad acrosoma-membrana. El tratamiento con glicerol al 5% dio lugar a los espermatozoides de mejor integridad en motilidad, la integridad de la membrana plasmática y la membrana acrosómica ($P < 0,05$). La congelación en vapor de nitrógeno líquido mostró una mejor motilidad de espermatozoides, viabilidad y la integridad de la membrana plasmática ($P < 0,05$), la congelación durante 2 minutos en el vapor de nitrógeno líquido aumento la membrana del acrosoma en comparación con la integridad del hundimiento directo en nitrógeno líquido ($P < 0,05$).

El hundimiento directo en nitrógeno líquido no mostro espermatozoides móviles. Sin embargo, la congelación durante más de 2 minutos en el vapor de NL2 aumento las anomalías totales en comparación aquellas que fueron sumergidas en NL2 ($P < 0,05$). En conclusión, el uso de glicerol al 5% y la congelación de vapor de NL2 eran

esenciales para la rápida congelación de semen canino, sin el equilibrio de enfriamiento. En particular, manteniendo durante 2 min en vapor de NL2 fue suficiente para producir una rápida congelación exitosa. Este método de congelación rápida es simple y efectivo en el esperma canino y sería de gran ayuda para ofrecer información para la vitrificación de grandes cantidades de semen canino.

Cuevas y col (2011), describe La producción de bagre de río con semen congelado con el rápido equilibrio de enfriamiento, la posibilidad de utilizar la vitrificación de espermatozoides de peces para conservar las muestras obtenidas en campo y ofrece una alternativa a la criopreservación convencional, aunque no se ha estudiado de forma sistemática para criopreservar espermatozoides de las especies acuáticas. El objetivo general del proyecto fue desarrollar protocolos simplificados que podrían integrarse en un enfoque estandarizado para la vitrificación de germoplasma de especies acuáticas.

Los objetivos del presente estudio en el bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) eran los siguientes:

(1) evaluar la toxicidad aguda del 5%, 10%, 20% y 30% de metanol, N, N-dimetil acetamida, dimetil sulfoxido, 1,2 -propanodiol, y el etilenglicol,(2) evaluar una serie de dispositivos de uso común para la criopreservación de espermatozoides y la vitrificación en mamíferos,(3) comparar la vitrificación con y sin crioprotectores,(4) evaluar la integridad de la membrana después de la descongelación de

espermatozoides vitrificados en diferentes soluciones de crioprotectores, y (5) evaluar la capacidad de los espermatozoides para fertilizar los óvulos vitrificados.

Las concentraciones de crioprotectores superiores al 20% resultaron ser tóxicos para los espermatozoides. El metanol y el etilenglicol fueron los menos tóxicos a una concentración de 20% con un tiempo de exposición de menos de 5 min. Se evaluó un método descrito para el esperma humano, en bucles y pajillas estándar con y sin crioprotectores sumergidos en nitrógeno líquido. El crioprotector libre de vitrificación mediante bucles no dio la fertilización (evaluada por neurulación), y las tasas de fertilización observadas en dos ensayos que utilizaron la pajilla estándar de corte fueron de baja (~ 2%).

En general, los valores de fertilización para experimentos de vitrificación fueron bajos y el uso de bajas concentraciones de crioprotectores, la fertilización fueron inferiores (<10%) a diferencia del uso de soluciones de vitrificación con altas concentraciones de crioprotectores (tan alta como 25%). La más alta obtenida fue de neurulación a partir de una mezcla de tres crioprotectores (20% de metanol + 10% de etilenglicol + 10% propanodiol) con una adición de un solo paso. Esto se reflejó en los datos de citometría de flujo de la cual la mayor integridad de la membrana mediante bucles fue de 20% de metanol + 10% de etilenglicol + 10% de propanodiol (~ 50%).

Se presenta el primer éxito de vitrificación de espermatozoides en pescado y la producción de crías de los espermatozoides vitrificados en el bagre de canal. Aunque

los valores de fertilización eran bajas, en la actualidad esta técnica, sin embargo podría ser utilizada para reconstituir las líneas (especialmente en los peces de acuario pequeñas), pero requeriría la mejora y ampliación de escala antes de ser útil como un método de producción de peces tales como el pez gato.

Ruiz y col (2011) evaluó la viabilidad post congelamiento de ovocitos de alpaca vitrificados luego de la maduración *in vitro*. Los ovocitos fueron recuperados de ovarios obtenidos en el camal Municipal de Huancavelica, Perú, madurados *in vitro* por 24-25 h en una cámara modular con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ en medio TCM-199 suplementado con Piruvato de Na, HEPES, sulfato de gentamicina, FSH, estradiol 17 y suero fetal bovino. Los ovocitos fueron separados de las células de la granulosa con hialuronidasa al 0.1% y distribuidos en tres tratamientos: T1 (n=107), ovocitos expuestos a las solución es crioprotectoras y vitrificados; T2 (n=121), ovocitos expuestos a las soluciones crioprotectoras no vitrificados (control de toxicidad de los crioprotectantes); T3 (n=232), grupo control de ovocitos no expuestos a las soluciones vitrificantes.

Los ovocitos fueron vitrificados en micro - gotas sobre un papel de aluminio flotando en nitrógeno líquido, utilizando una solución de equilibrio con 4% de etilenglicol y una solución de vitrificación con 35% de etilenglicol, 5% de polivinil pirrolidona y 0.4 M de trehalosa. Las micro - gotas vitrificadas se almacenaron en nitrógeno líquido y fueron descongeladas 1-4h después. Todos los ovocitos fueron cultivados en SOF-HEPES con 5M de ion omicina de Ca por 4 min a temperatura ambiente y luego cultivada por

3 h en 6-DMAP a 38.5 °C en una atmósfera húmeda con 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂.

Luego se cultivaron por 8 días en medio SOF-IVC. Se encontró 58.4, 68.7 y 97.3% de ovocitos morfológicamente normales para T1, T2 y T3, respectivamente. Las tasas de segmentación fueron de 39.9, 49.5 y 62.3%, y las tasas de blastocistos fueron de 0, 0 y 9.2% para T1, T2 y T3, respectivamente. Los resultados demuestran que los ovocitos de alpaca pueden ser vitrificados con el método de superficie sólida y que son viables morfológicamente y fisiológicamente post congelamiento.

Ruiz y col (2010), evaluaron el efecto de la vitrificación en la viabilidad de ovocitos activados químicamente para la producción de embriones partenogénéticos bovinos. Los ovocitos de bovinos aspirados de ovarios obtenidos en el matadero fueron madurados *in vitro* por 20-22 horas y se distribuyeron en los siguientes grupos. I (n=76): ovocitos vitrificados/descongelados, II (n=119): ovocitos expuestos a crioprotectores sin vitrificación y III (n=142): ovocitos control.

Los ovocitos fueron vitrificados en micro - gotas sobre un papel de aluminio pre enfriado flotando en nitrógeno líquido, utilizando una solución de equilibrio con 4% de etilenglicol y una solución de vitrificación con 35% de etilenglicol 5% de polivinil pirrolidona y 0,4 M de trehalosa. Las micro-gotas vitrificadas fueron almacenadas en nitrógeno líquido – y fueron descongeladas 1-3 días después del almacenamiento.

Los tres grupos de ovocitos se activaron partenogénicamente por exposición de 4 minutos a 5 μ M de ionomicina de Ca a temperatura ambiente seguido de una incubación por 5 horas en 6-dimetilaminopurina a 38,5 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂. Los embriones se cultivaron en medio SOF durante 8-9 días. Las tasas de ovocitos sobrevivientes fueron 55,1% y 93,7% para ovocitos vitrificados/descongelados. Las tasas de segmentación de 55,3%, 72,3% y 74,6%, y de desarrollo hasta blastocistos fueron 7,1%, 17,4% y 21,7% respectivamente.

Estos resultados demuestran que la técnica de vitrificación ha quedado establecida y permite la producción de embriones partenogénéticos de bovinos.

2.1. BASES TEÓRICAS

Enriquez (1994) al evaluar semen colectado a diferentes tiempos con vagina artificial en alpacas en la Universidad Nacional del Altiplano en Puno, obtuvo los resultados volumen 0.6 ml, motilidad 14%, concentración 65 millones/ml.

Cuadro N° 2: principales características de semen de alpaca

VARIABLE	PROMEDIO	RANGO
Volumen (ml)	1.9	0.8 – 3.1
Concentración (N°/ml)	147.500	82 500 – 250 000
Concentración total	89 000 000	61 875 000 -750 000 000
Motilidad (%)	85	69.0 – 91.1
Espermatozoides vivos (%)	69.6	58.0 – 83.1

FUENTE: (Bravo y col 1997)

2.1.1. Factores que influyen en la producción de espermatozoides.

a. Sanidad

El semen está constituido por una mezcla de espermatozoides producidos en los testículos y de líquido seminal generado por las glándulas anexas. Sin embargo, la producción de espermatozoides puede variar por factores inherentes al animal como: edad, raza, y externos al mismo como: Estación reproductiva, nutrición, estado sanitario, etc. **Daza (1997)**.

2.1.2 Factores que afectan al espermatozoide durante el proceso de criopreservación

Para obtener buenos resultados de supervivencia espermática y fertilidad de los espermatozoides es necesario comprender a qué tipo de estrés se ven sometidos los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación así como la manera en que las células responden a las agresiones físico-químicas y medioambientales **Stornelli y col (2005)**.

a) Cambios de volumen

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la célula es colocada dentro de un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol. Más tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada.

Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrolitos en las soluciones intra y extra celulares. La forma en que ocurren estas modificaciones determinan la mayor o menor capacidad de la célula para soportar el daño a la que se ve sometida. El cambio de volumen es solo uno de los factores de estrés a los que la célula se ve sometida durante el proceso de criopreservación **Leivo y Dradey (1999)**.

b) Shock de frío

Es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen entre 30 °C y 0 °C induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperatura debe ser realizado cuidadosamente **Watson (1981)**. Este fenómeno es conocido como shock de frío y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie.

El estrés de la membrana puede continuar por debajo de 0 °C sin que el cambio de fase sea completo, sin embargo es bien conocido que los cambios de fase ocurren, en su mayoría, entre los 5 °C y 15 °C **Dobrins y col (1993)**.

En un estudio sobre la función de permeabilidad de la membrana del espermatozoide al criopreservar semen de verraco, se ha demostrado la

importancia de la composición lipídica del medio ambiente donde se encuentra la membrana plasmática durante el enfriamiento, esto relaciona al componente lipídico en la participación del paso de moléculas en la membrana e interviene en el mecanismo del daño celular **Pettit y Bhur (1998)**.

El agregado de preparaciones lipídicas purificadas a los espermatozoides reduce significativamente el shock de frío y el daño producido por la congelación – descongelación **Graham y col (1987)**, por lo que usualmente se incluye yema de huevo en la preparación de los diluyentes debido a que los fosfolípidos y las lipoproteínas de baja densidad poseen un efecto protector contra el shock del frío **Quinn y col (1980)**.

c) El crioprotector y el estrés celular

El crioprotector permite mantener una mayor proporción de agua líquida intracelular a bajas temperaturas y en consecuencia una menor concentración de electrolitos posibilitando la supervivencia celular durante el proceso de criopreservación. Sin embargo, estos compuestos y los diluyentes producen un estrés transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides **Stornelli y col (2005)**.

La magnitud de este hecho está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores. El crioprotector de elección

es comúnmente el glicerol, el cual produce una alteración osmótica. A la vez se ha observado que la hiper-osmolaridad producida por este compuesto posee un efecto estimulador para la reacción del acrosoma **Aitken y col (1983)**.

Además del glicerol existen otros compuestos que poseen propiedades crioprotectoras como por ejemplo el etilenglicol, propilenglicol, dimetil sulfóxido o metanol **Navarro y col (2004)**.

d) Estrés osmótico

El estrés, inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada **Watson (1988)**. Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se integran y el agua pura se cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y la presión osmótica de la solución restante depende de la temperatura, velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada **Stornelli y col (2005)**.

Por tal sentido la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevivencia, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido. Sin embargo la tasa de

enfriamiento debe ser suficientemente lenta como para permitir la salida de agua, y prevenir la formación de cristales de hielo intracelular, lo cual es letal para la célula **Holt y North (1991)**.

Así también refieren que el porcentaje de células que sobrevive a un proceso de congelación está determinado por la sensibilidad al estrés osmótico durante la adición y remoción de crioprotectores durante el enfriamiento y el recalentamiento **Stornelli y col (2005)**. Las células espermáticas poseen mayor permeabilidad al agua que otros tipos celulares **Noiles y col (1993)**.

Si bien puede haber diferencias entre especies en la sensibilidad del espermatozoide a la criopreservación, el eyaculado es heterogéneo habiendo una resistencia variable al estrés osmótico entre las células espermáticas **Katkov y col (1998)**.

Los signos de estrés manifestado por los espermatozoides luego de la descongelación no se relacionan solo con el estrés osmótico sufrido en el descongelado sino también con el estrés sufrido durante el congelado **Holt y North (1991)**. Es por eso que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación.

Si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta. **Mazur (1984)** hizo un cálculo empírico acerca del congelamiento de las células espermáticas estimando un rango de 15 a 60 °C/minuto como la velocidad óptima de congelación que permite mayor probabilidad de obtener una mejor tasa de sobrevivencia celular.

2.1.3. Alteraciones de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación.

Uno de los efectos comprobados producidos durante el proceso de criopreservación es la disminución de la motilidad del espermatozoide **Hafez (2002) y Stornelli y col (2005)**.

En tanto que una pequeña parte de la población celular exhibe un movimiento progresivo vigoroso, la mayoría de las células muestran variables grados de alteración de la motilidad post congelado en comparación con la motilidad del semen fresco. Este hecho puede estar íntimamente relacionado con la pobre capacidad fecundante del semen congelado. En un estudio con semen criopreservado realizado en humanos se encontró que tanto la motilidad progresiva como el vigor del movimiento celular eran factores relacionados estrechamente con la fertilidad **Kelly y col (1997)**.

Si bien, estudios de fertilización *in vitro* han demostrado que los espermatozoides criopreservados son capaces de fertilizar, solo algunos acceden al proceso pero muchos otros están estructuralmente afectados y son incapaces de fertilizar **Ellinton y col (1999)**.

2.1.4. Efecto de la criopreservación sobre el espermatozoide.

Una vez que los crioprotectores ingresan al citoplasma a favor del gradiente de concentración, el fluido intracelular puede ser enfriado a temperaturas entre -5 y -15, sin que ocurra la formación de cristales de hielo, debido a que estas sustancias disminuyen el punto de congelación por medio de la interacción entre las moléculas de agua, a estos rangos de temperatura los cristales de hielo comienzan a formarse en el medio externo. Cuando las temperaturas descienden por debajo de estos rangos, se inicia la formación de cristales de hielo intracelular **Vincent y col (1998)**.

La temperatura a la cual deben ser incorporados los crioprotectores a la solución de semen y el tiempo de exposición celular, dependen del grado perjudicial del crioprotector principalmente en volúmenes excesivos y de su velocidad de difusión a través de la membrana plasmática. Esta difusión puede verse afectada por el descenso de la temperatura, ya que durante este proceso la membrana celular aumenta la proporción de colesterol con el propósito de lograr mayor estabilidad mecánica; sin

embargo, este aumento del colesterol también disminuye la permeabilidad de la membrana a pequeñas moléculas, pudiendo afectar la penetración del crioprotector en la célula de una manera efectiva **Spinel (2002)**.

2.1.5. Criopreservación de espermatozoides de cola de epidídimo

La utilización de espermatozoides de la cola del epidídimo obtenidos post mortem ha mostrado ser una buena alternativa para obtener crías una vez muertos los donadores. **Kikuchi y col (1998)**, **Ikeda y col (2002)** demostraron que los testículos post mortem de verraco refrigerados a 4°C de 1 a 2 días poseen espermatozoides con capacidad fecundante al ser utilizados en pruebas *in vitro*. Similares resultados reportan, **Martins y col (2007)** en embriones bovinos *in vitro*, utilizando espermatozoides de la cola del epidídimo criopreservados en tris-yema-glicerol.

Santiago-Moreno y col (2006) criopreservar espermatozoides de epidídimo de ibises (*Capra pyrenaica*) con diluyente TCG (Tris ácido glucosa) conteniendo 6% de yema vs a 12%, y reportaron mayor viabilidad espermática con el primero.

Morton y col (2007) evaluaron el efecto de diferentes dilutores de citrato, lactosa, y tris para criopreservar espermatozoides de epidídimo de Alpaca. Reportando mejores resultados utilizando dilutor citrato y congelando con método de pellets.

2.1.6. Crioprotectores

Los crioprotectores son sustancias de alta solubilidad, y tóxicos a altas concentraciones, por lo que deben tener bajo peso molecular para entrar fácil y rápidamente a la célula y obtener el máximo efecto protector. Además un buen crioprotector debe inhibir la acción enzimática, disminuyendo, e inclusive eliminando la actividad de radicales libres responsables de lisis celular, antes, durante y después de la congelación y descongelación **Palma (2001)**.

a) Toxicidad de los crioprotectores

Varios aditivos son incluidos en la solución a ser utilizada en la criopreservación. Para la congelación, la concentración de los crioprotectores penetrantes no debe ser superior a 1 ó 2 M, debido a que en estas concentraciones la toxicidad es relativamente baja, de esta forma pueden ser equilibrados en una solución por 10-20 minutos a temperatura ambiente.

Sin embargo, en vitrificación, el uso de soluciones permeables en altas concentraciones evita la formación de hielo intracelular, pudiendo llegar a usarse en concentraciones de 8 M, con la desventaja que esta solución puede ser tóxica para las células, si el tiempo de permanencia en la solución excede ciertos límites.

En un estudio realizado por **Kasai y col (1979)**, al comparar la toxicidad de cinco agentes penetrables en mórulas de ratón, el etilenglicol resultó ser el menos tóxico, seguido del glicerol y el dimetil sulfóxido; similares resultados se obtuvieron en blastocistos de bovino **Tachikawa y col (1993)**.

Por otro lado los sacáridos como la sacarosa, glucosa, trehalosa, xilosa, etc, son incorporados en pequeñas cantidades en las soluciones de deshidratación y vitrificación intracelular, los cuales reducen las cantidades del crioprotector, ayudando a reducir los efectos tóxicos hacia el embrión **Kasai y col (1990)**. Según **Kasai y col (1992)**, las soluciones con macromoléculas son sustancias no penetrantes, de menor efecto tóxico para la criopreservación de embriones, los cuales han sido incluidos en altas concentraciones debido a que reducen la concentración de los agentes penetrables requeridos para la vitrificación.

La eficiencia de un crioprotector está relacionada a su capacidad de penetración a la célula, la cual se encuentra íntimamente ligada a la etapa de equilibrio antes de la congelación a la que es sometido. La permeabilidad es una característica de la membrana que se asocia cuando éste es expuesto a un medio de congelación. Inicialmente la célula se contrae por la pérdida de agua, debido a dos causas: la

primera a una hiperosmoticidad de la solución extracelular, y la segunda, debido a que la célula es mucho más permeable al agua que al crioprotector **Schneider y Mazur (1984) y Leivo y col (1992)**.

2.1.7 Refrigeración

El enfriamiento debe ser lento, este proceso suele realizarse protegiéndose con un recipiente en una camisa de agua para amortiguar el shock térmico **Hafez (2002)**.

El enfriamiento se realiza a razón de 2°C cada 3 minutos y permanece a 5°C durante 45 a 60 minutos antes de proceder al agregado del diluyente B que contiene el crioprotector **Cueto y col (2003)**.

Similarmente **Angulo y col (1999)**, sometieron el semen de carnero en un recipiente de 22°C e introdujeron a refrigeración a 0°C durante 2 horas, tiempo suficiente que paulatinamente alcanza 5°C, afirma que no sufre choque térmico con este procedimiento. Del mismo modo **Medrano y col (2004)**, refrigeraron de pajillas con semen de caprino hasta 5 °C por dos horas. El procedimiento no tiene diferencia entre pajuelas, pellets u otro, en cuanto a refrigeración.

2.1.8. Congelamiento del semen

Olivares y Urdaneta, (1985) precisaron, que posterior al periodo de equilibrio con el crioprotector debe procederse a pre-congelar las pajuelas de semen, en vapores de nitrógeno a -120°C por 10 minutos y luego introducir a -196°C .

Para realizar el congelamiento de semen de carnero **Angulo y col (1999)** sometieron a 4.5 cm sobre el nivel superior del nitrógeno durante 10 minutos.

Hafez (2002) menciona que en caso de las pajillas suelen congelarse en vapores de nitrógeno y almacenados a -196°C , a menudo las ampollitas se congelan a razón de $3^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ hasta -15 y este descende hasta llegar a -150°C , es ahí entonces donde se depositan a -196°C . Para el método de píldoras se colocan gotas en un volumen aproximado de 0.1 ml, en huecos de forma hemisférica hechos en bloques de hielo seco (-78°C), este procedimiento muestra buena supervivencia al descongelado.

En otra investigación con semen de caprino se demostró que es posible el congelamiento en vapores de nitrógeno en pajillas o en pastillas (pellets) en hielo seco en volúmenes de 0.2 ml por un tiempo

de 1 a 2 minutos, por cualquiera de estos métodos se conservan en termo de nitrógeno líquido (**Cueto y col 2003**).

2.1.9. **La vitrificación** se define como la transición de las soluciones acuosas de un estado líquido a un estado vítreo sólido sin la formación de cristales, es decir, que debido al rápido descenso de temperatura, la “viscosidad” de la muestra aumenta hasta un punto en que las moléculas se inmovilizan. De esta forma, se encuentra en un estado sólido aunque su estructura molecular sea la de un líquido extremadamente viscoso (estado vítreo) **Critser y col. (1997)**.

Este aumento extremo de la viscosidad requiere velocidades de enfriamiento muy rápidas (superiores a 2500 °C/min.) o elevadas concentraciones de crioprotectores (de 5 a 7 M) **Shaw y col (2000) y Vajta (2000)**.

La vitrificación, descrita inicialmente en embriones por **Rall y Fahy. (1985)**, corresponde a una técnica de congelación ultra rápida basada en el contacto entre la solución de vitrificación que contiene los agentes crioprotectores y espermatozoides con el nitrógeno líquido. La definición física de la vitrificación es la solidificación de una solución a baja temperatura sin que ésta llegue a cristalizar debido a un enorme incremento de la viscosidad **Fahy (1986)**,

manteniendo así la distribución molecular e iónica que existía antes de la congelación Fahy y col (1984)

CAPITULO III

METODOLOGIA DE LA INVESTIGACION

3.1. AMBITO DE ESTUDIO

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio Central ubicado en la Universidad Nacional de Huancavelica de la Ciudad Universitaria de Paturpampa, ubicado en el distrito de Huancavelica, provincia y departamento de Huancavelica, a una altitud aproximada de 3670 m.s.n.m. Se ubica a 74° 98' longitud oeste y 12° 78' latitud sur. El clima es frío siendo la temperatura media anual varía entre 5-8°C y una precipitación pluvial anual de 829.6mm. El laboratorio está equipado con microscopios, centrifuga, baño maría, tanque criogénico, refrigeradora, platina caliente y sistema de calefacción.

3.2. TIPO DE INVESTIGACION:

Aplicada

3.3. NIVEL DE INVESTIGACION

Experimental

3.4. METODO DE INVESTIGACION

Los principales métodos que se utilizaron en la investigación fueron: análisis, síntesis, deducción, inducción.

3.5 DISEÑO DE INVESTIGACION

Se utilizó un diseño completamente al azar (DBCA),

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Es el efecto de los tres protocolos de criopreservación en espermatozoides epididimarios de alpaca

μ = Efecto de la media general

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento (protocolos)

B_j = Efecto del Bloque (edad)

E_{ij} = Error experimental

3.6. POBLACION, MUESTRA, MUESTREO

Población y Muestra:

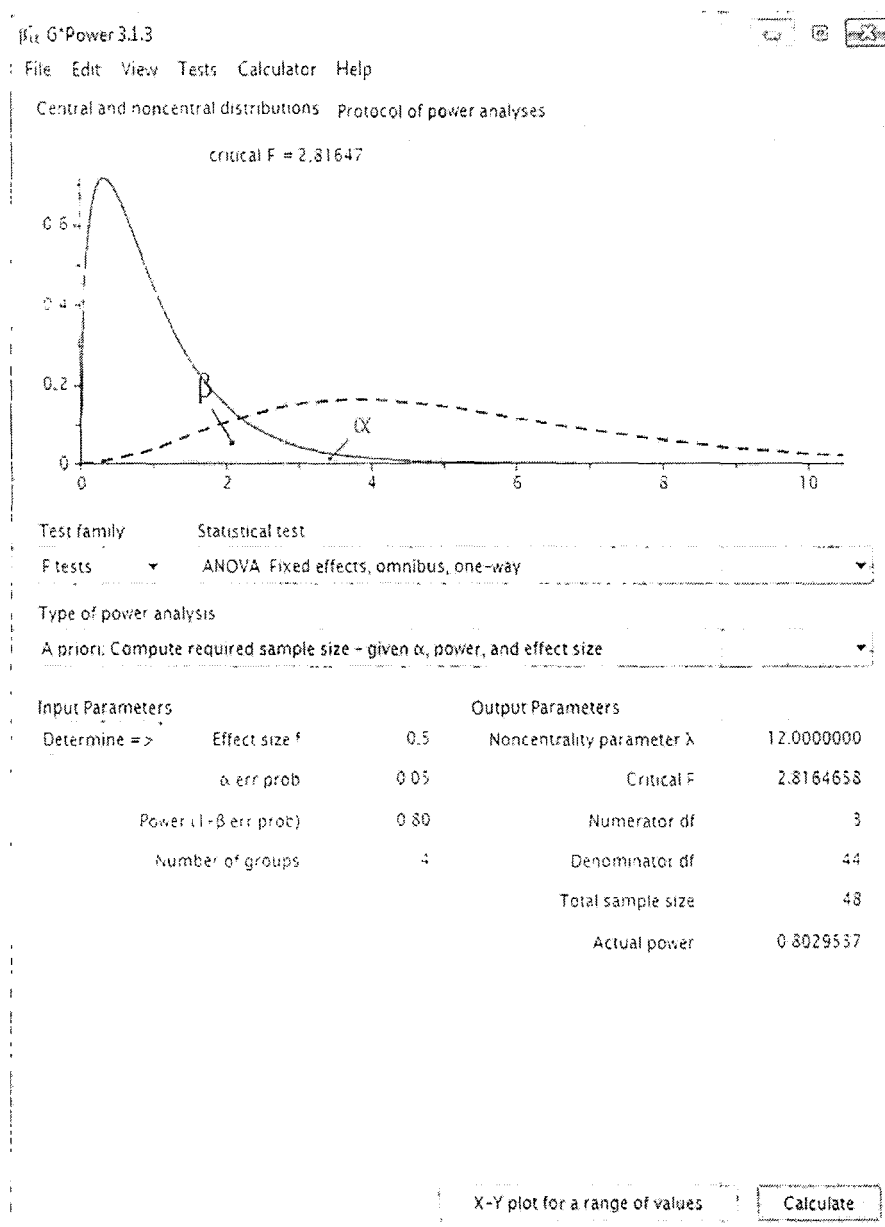
Para el cálculo del tamaño muestral se utilizó el programa informático G-Power (Erdfelder y col 2010), para lo cual se consideró:

Una diferencia mínima a detectar de 0.5.

Una probabilidad de cometer el error Tipo I (α) de 0.05

Un poder ($1-\beta$) de 0.80;

Tal como se observa en la siguiente figura:



Por lo tanto el tamaño de muestra a utilizarse en el presente estudio es de: 48 testículos en total (12 por cada tratamiento).

3.7 TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

Obtención de Muestras

Se obtuvo 48 testículos de alpacas adultas de 2 a 4 dientes, las mismas que fueron recolectados en el Camal Municipal de Huancavelica.

Los testículos se recolectaron intactos, con escroto, y se procuró recobrar conjuntamente con ellos sus vasos deferentes, cuyos extremos se ligó.

Cada par perteneciente a un animal se guardó en una bolsa plástica con el fin de poder distinguir entre individuos; los testículos fueron mantenidos con temperatura entre 20 a 25 °C.

Obtención de testículos y recuperación

Los testículos fueron transportados al Laboratorio de Investigación Central de la Universidad Nacional de Huancavelica en un recipiente isotérmico. El tiempo transcurrido entre el sacrificio de los animales y la llegada al laboratorio fue 2 horas.

La recuperación de espermatozoides de la cola del epidídimo se realizó a través de:

a) Método de desmenuzamiento de la cola del epidídimo

La cola del epidídimo se disectó limpiamente separándola de la túnica serosa y los vasos sanguíneos adyacentes. Una vez aislada, se colocó en una placa petri, luego con una jeringa de 1ml se le inyectó el dilutor, y se cortó completamente la cola del epidídimo en rebanadas delgadas. Los cortes de epidídimo fueron aplastados y enjuagados en el dilutor, retirando

paulatinamente todos los cortes del epididimo y dejando un líquido blanquecino en la placa petri. Los espermatozoides recuperados se depositaron en tubos Falcon,

Análisis de la muestra

La evaluación de las muestras obtenidas fueron analizadas microscópicamente. Para la evaluación microscópica se consideró las variables de motilidad, concentración, porcentaje de vivos y muertos.

Porcentaje de motilidad

Se evaluó colocando 10ul de muestra de espermatozoides en un portaobjeto, seco y atemperado a 37°C y cubierto con una lámina cubre objeto. Las muestras fueron colocadas en el microscopio (40X) para observar movimiento espermático. Para la calificación de la motilidad se tuvo en cuenta los siguientes rangos Muy Buena (>95%), Buena (80-95%), Regular (70-80%), Mala (60-70%), Nula o Muy Mala (< 60%) **Aréncibia (2009), Rosario (2009)**

Concentración

La evaluación de espermatozoides (mm^3) fue a través de la cámara de Neubauer, se colocó un 1 ml de la muestra en un tubo de ensayo diluida con suero fisiológico, se colocó una gota de muestra sobre la cámara de Neubauer e inmediatamente lo cubrimos con la lámina cubre objetos.

Dejamos que la muestra se distribuya por capilaridad, Se aplicara la formula siguiente:

$$\text{Número de células/cuadro C1 (25 cuadros C2) = número de células/0.1 mm}^3 \times 10^4 = \text{número de células/ml}$$

Vivos / totales

El porcentaje de espermatozoides vivos se basa en el principio de que los espermatozoides muertos dejan ingresar a los colorantes como la eosina. El proceso se inició colocando 10ul de muestra, 10ul de eosina en un portaobjeto limpio. Con el extremo de una segunda lámina, se homogenizo primero la gota de la muestra espermática con la de la Eosina. La mezcla final se dispersó realizando un frotis a lo largo de un tercer porta objeto.

Todas las láminas fueron atemperadas a 37°C. Se dejó secar y luego se observó a microscopio a 40X, diferenciándose cabezas de espermatozoides claros o teñidos de rosado. Se examinó un total de 500 espermatozoides y determinando la cantidad de espermatozoides claros y teñidos.

Los espermatozoides vivos presentarán la cabeza clara, mientras que los espermatozoides muertos dejarán ingresar colorante como la Eosina y aparecerán coloreados.

PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVACION:

PREPARACIÓN DEL DILUTOR.

- A. Para la preparación del dilutor A se mezclaron los siguientes agentes Andromed, agua destilada en relación 1:4.Utilizado para congelación tradicional.
- B. Para la preparación del dilutor B se usaron los siguientes agentes: SP- TALP (stock – suplementado) y Glicerol. Este dilutor se utilizó para la criopreservación 2 y 3.

Cuadro N° 3: El SP- TALP stock en (mM):

NaCl 100	292.2
KCl 3,1	11.55
NaHCo 3.25	105
NaH ₂ PO ₄ 0,3	1.8
Lactato de sodio 21.6	184
CaCl ₂ x 2 H ₂ O 2	14.7
Mg Cl ₂ x 6 H ₂ O 0.4	4.05
HEPES 10	119

Fuente. Elaboracion propia.

Cuadro N° 4: SP- TALP (suplementado) en mM:

Piruvato de Sodio 1.0 mM	10 ul.
Gentamicina	10 ul.
BSA FV (8022)	600 mgr.

Fuente: Elaboración propia

Y los crioprotectores: Glicerol al 10% y glucosa 0.018 mgr. El sp-Talp se usó un 72 ul.

C. El dilutor C tienen los siguientes componentes:

SP- TALP (stock – suplementado) y además contiene como crioprotector al Etilenglicol (10 ul) más glucosa (0.018 mgr) por muestra ya expuesta al dilutor. Este se utilizó para el protocolo de criopreservación con etilenglicol.

Preparación de la eosina

Esta preparación contiene los siguientes componentes:

Eosina (0.05 ul.) y cloruro de sodio (0.990 ul).

PROTOCOLO 1:

Congelación tradicional.

Las muestras colectadas se procedió a enfriar hasta llegar a una temperatura de 5°C por un periodo aproximado de 10 minutos (periodo de estabilización), seguidamente las muestras fueron aspiradas dentro de las pajillas de inseminación previamente identificadas y selladas con alcohol polivinílico, luego las pajillas fueron expuestas a vapores de nitrógeno a -120°C en 5 minutos (pre-congelación) en relación de un minuto por grado centígrado, se dejó las pajillas por un periodo de 10 minutos en suspensión a vapores de nitrógeno líquido y se procedió después al lanzamiento de las mismas al nitrógeno líquido a -196°C (congelación).

Post congelamiento

La descongelación se realizó en baño maría a 37°C por espacio de 30 segundos, el porcentaje de motilidad progresiva por pajilla fueron evaluadas colocando una pequeña muestra sobre una lámina porta objeto caliente a 37°C y colocando un cubre objeto de 18 x 18 mm la cuales fueron observadas en el microscopio; de igual manera se evaluó la viabilidad espermática por pajilla que fueron sometidas por la técnica de coloración de eosina.

PROTOCOLO 2:

Vitrificación con glicerol

Los espermios de alpaca se expusieron a 10ul de medio de equilibrio consistente SP-TALP suplementado con piruvato de sodio 1.0 mM 10 ul/10ml, gentamicina 10ul/10ml y de suero fetal bovino (BSA) 600 mgr/10ml posteriormente centrifugado y expuesto por 8 minutos en placa petri una temperatura de 37° C. Luego, los espermatozoides fueron introducidos en una solución de vitrificación consistente de Glicerol (G) al 99.5%, 10 ul/muestra, glucosa 0.018 mgr/muestra y 72 ul de SP TALP stock por 4 minutos a una temperatura de 37°C. Posteriormente, 15µl de esta suspensión se dejó caer sobre una superficie plana de vidrio (placa petri) pre-enfriado flotando en nitrógeno líquido utilizando una micro-pipeta.

Si fuera el caso se puede usar criobiales pre enfriados en nitrógeno líquido y se procede a almacenarlas en nitrógeno líquido durante el tiempo que se requiera el uso.

Post congelación

Para la evaluación seminal las micro-gota vitrificados fueron transferidas hacia un tubo falcon de 10 ml que contiene SP-TALP suplementado pre-calentado a 37°C, para su

PROTOCOLO 3:

Vitrificación con etilenglicol

Los espermios de alpaca se expusieron a 10ul de medio de equilibrio consistente SP-TALP suplementado con piruvato de sodio 1.0 mM 10 ul/10ml, gentamicina 10ul/10ml y de suero fetal bovino (BSA) 600 mgr/10ml posteriormente centrifugado y expuesto por 8 minutos en placa petri en una temperatura de 37° C. Luego, los espermatozoides fueron introducidos en una solución de vitrificación consistente de Etilenglicol (EG) al 10 ul/muestra, glucosa 0.018 mgr/muestra y 72 ul de SP TALP stock por 4 minutos a una temperatura de 37°C. Posteriormente, 15 µl de esta suspensión se dejó caer sobre una superficie plana de vidrio (placa Petri) pre-enfriado flotando en nitrógeno líquido utilizando una micro-pipeta. Si fuera el caso usaran criobiales pre enfriados en nitrógeno líquido y se

procede a almacenarlas en nitrógeno líquido durante el tiempo que se requiera el uso.

Post congelación

Para la evaluación seminal el micro-gota vitrificado fueron transferidas hacia un tubo falcón de 10 ml de plástico pre-calentado a 37°C, para la evaluación.

3.8. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS

Se identificó los animales según edad, se obtuvo las muestras, se recolecto los espermatozoides epididimarios posteriormente se evaluó el porcentaje de motilidad, concentración, porcentaje de vivos y muertos a las 2 horas después de la llegada al laboratorio central de la Universidad Nacional de Huancavelica, se realizó la evaluación en fresco, la evaluación de muestra sometidas a congelación y por último se evaluará los espermatozoides vitrificados. Estos espermatozoides fueron inmediatamente almacenados junto con el grupo de espermatozoides control no congelados ni vitrificados.

3.9. TECNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS

El procesamiento de datos se realizó con el Software SAS y Excel, se aplicó un DBCA, comparación de medias con la prueba de Tukey. Y a su vez la Estadística descriptiva. Los resultados se expresan mediante cuadros e histogramas en escala de porcentaje.

3.10. ÁMBITO DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el Laboratorio Central de la Universidad Nacional de Huancavelica ubicado en el Campus Universitario de Paturpampa, los testículos recuperados de alpacas fueron recuperados en el Camal Municipal de Huancavelica y fueron trasladados al laboratorio para ser sometidas a evaluación.

CAPITULO IV

RECURSOS MATERIALES

4.1. Materiales de laboratorio

1. Termos de capacidad de 2 litros.
2. Cámara de Neubauer.
3. Jeringas descartables de 1, 5 y 10 ml.
4. Puntillas para micropipeta de 0,5 - 10 μ l
5. Puntillas para micropipeta de 20 – 100 μ l
6. Puntillas para micropipeta de 100 – 1000 μ l
7. Placa para maduración 1008
8. Placa petri
9. Cubre objetos de 0.8 x 0.8 cm.
10. Porta objetos de 3.5 x 1.0 cm.
11. Viales criogénicos
12. Aguja de 18 g
13. Aguja de 21 g
14. Jeringas de 10 ml

15. Papel toalla
16. Gradilla.
17. Algodón.
18. Guardapolvo
19. Guantes quirúrgicos descartables.
20. Mascarillas
21. Gorras
22. Micropipeta de 20 100 ul
23. Tubo Falcón graduado 15ml
24. Tubo Falcón graduado 50ml
25. Beaker
26. Pinza.
27. Caja térmica de tecnopor.
28. Esponjas pequeñas.
29. Papel aluminio
30. Estuche de disección.
31. Bolsas de polietileno 4x3
32. Pajillas 0.5 ml
33. Eppendorf

4.2. REACTIVOS O MATERIAL QUÍMICO.

Dilutor:

- Agua Milli Q

- Andromed
- Glucosa
- NaCl
- KCl
- NaHCO₃
- NaH₂PO₄
- Lactato de Na
- CaCl₂(2H₂O)
- Hepes
- Rojo fenol
- Piruvato de Na
- Gentamicina
- Suero fetal bovino

4.3. Crioprotectores:

- Glicerol 99.5% pureza.
- Etilenglicol 99.0% pureza.

4.4. Equipos.

- Microscopio
- Termómetro industrial de -50 a 150 °C.
- Balanza de precisión
- Tanque de nitrógeno de 18 litros,

- Refrigeradora.
- Incubadora.
- Centrifuga
- Cámara de rayos UV.
- Plato térmico.
- Bortex.
- Baño maria.

4.5. Otros:

- Alcohol polivinílico
- Desinfectante.
- Nitrógeno líquido.
- Agua destilada
- Suero fisiológico
- Colorante eosina

4.6. Materiales de escritorio

- Libreta de campo
- CDRW de 700 MB
- Fólder manila
- Cinta adhesiva maskingtype
- Sobre manila
- Rotulador.

- Lapiceros
- Papel Bond A4 (80 gr.)
- Papel Bond A4 (60 gr.)
- USB
- Anillados
- Plumón grueso indeleble
- Plumón delgado indeleble

4.7. Equipos de escritorio

- Computadora e impresora
- Cámara fotográfica digital

RESULTADOS

Cuadro N° 5: Procedimiento ANOVA para motilidad

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr >F
Modelo	4	59161.91667	14790.47917	Infin	<.0001
Error	43	0.00000	0.00000		
Total correcto	47	59161.91667			

Interpretación:

Existen diferencias significativas ($P < 0.0001$) entre tratamientos respecto a la motilidad de espermatozoides epididimarios de alpacas Huacaya.

Cuadro N° 6: Comparaciones de medias con la prueba de Tukey

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	43
Error de cuadrado medio	0
Valor crítico del rango estudentizado	3.77938
Diferencia significativa mínima	0

Cuadro N° 7: Comparaciones entre tratamientos con la prueba de Tukey

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Tratamiento
A	83.33	12	4 fresco
B	73.25	12	1 Cong.Tradicio
C	21.58	12	2 Vitri. Glicerol
D	0.00	12	3 Vitri.Etilenglicol

Interpretación:

Existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos, en el tratamiento 4 (fresco) se obtuvo el mayor porcentaje de motilidad, seguido del tratamiento 1 (congelación tradicional), posteriormente esta en tercer lugar el tratamiento

2(vitrificación con glicerol). Mientras que el tratamiento 3 (vitrificación con etilenglicol) tiene una motilidad de cero.

Cuadro N° 8: Procedimiento ANOVA para concentración

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	6.0077333E15	1.5019333E15	5.30	0.0015
Error	43	1.2183176E16	2.8332967E14		
Total correcto	47	1.8190909E16			

Interpretación:

Existen diferencias altamente significativas ($P < 0.0015$) entre tratamientos respecto a la concentración de espermatozoides epididimarios de alpacas Huacaya.

Cuadro N° 9: Comparaciones de medias con la prueba de Tukey:

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	43
Error de cuadrado medio	2.833E14
Valor critico del rango estudentizado	3.77938
Diferencia significativa minima	1.84E7

Cuadro N° 10: Comparaciones entre tratamientos con la prueba de Tukey

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Tratamiento
A	49583333	12	3 Vitri. Etilenglicol
A			
B A	44253333	12	2 Vitri. Glicerol
B A			
B A	36662000	12	4 fresco
B			
B	28485000	12	1 Cong. Tradicio

Interpretación:

Existen diferencias altamente significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos 3 (vitrificación con etilenglicol) y tratamiento 1 (congelación tradicional), mientras que el tratamiento 2 (vitrificación con glicerol) y tratamiento 4 (fresco) son iguales.

Cuadro N° 11: Procedimiento ANOVA paravivos:

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	35277.66917	8819.41729	394.50	<.0001
Error	43	961.31109	22.35607		
Total correcto	47	36238.98027			

Interpretación:

Existen diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$) entre tratamientos respecto a la concentración de espermatozoides epididimarios de alpacas Huacaya

Cuadro N° 12: Comparaciones de medias con la prueba de Tukey:

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	43
Error de cuadrado medio	22.35607
Valor crítico del rango estudentizado	3.77938
Diferencia significativa mínima	5.1585

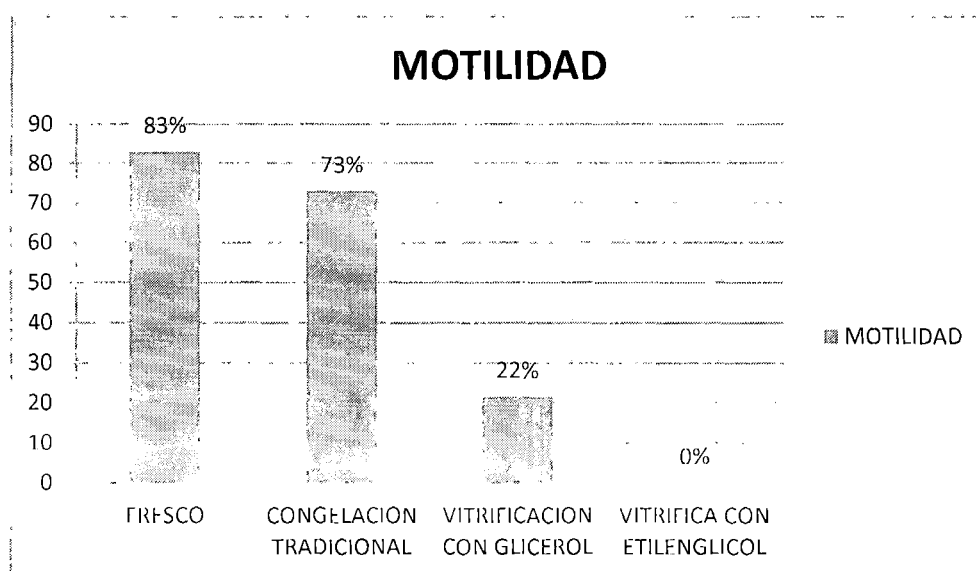
Cuadro N° 13: Comparaciones entre tratamientos con la prueba de Tukey

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Tratamiento
A	66.033	12	4 fresco
B	30.181	12	1 Cong.Tradicio
C	2.213	12	2 Vitri. Glicerol
C			
C	0.000	12	3 itri.Etilenglicol

Interpretación:

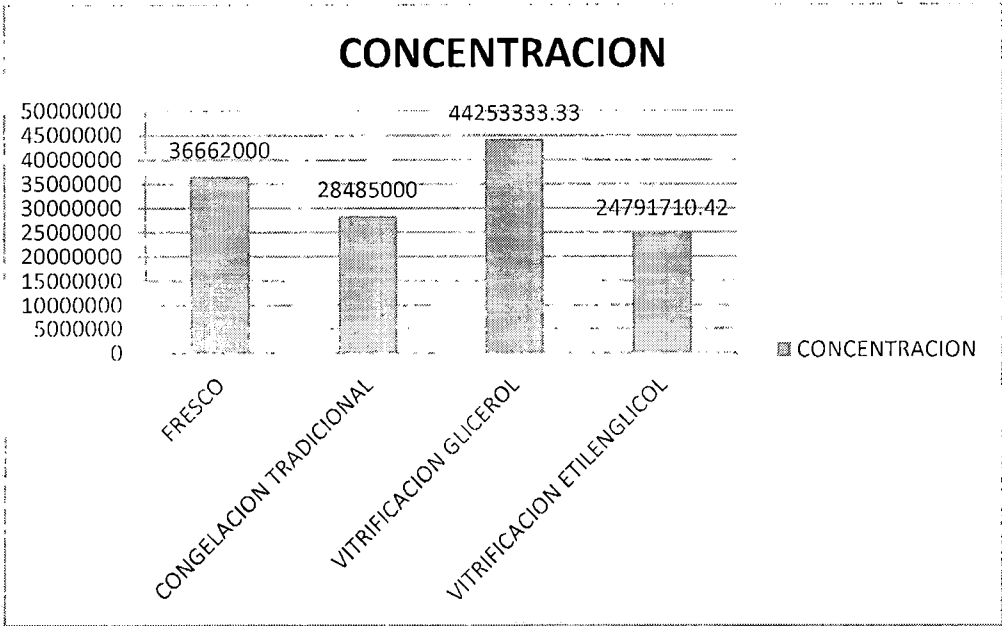
Existen diferencias altamente significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos 4 (Fresco) y tratamiento 1 (congelación tradicional), mientras que el tratamiento 2 (vitrificación con glicerol) y tratamiento 3 (vitrificación con etilenglicol) son iguales.

Gráfico N°1: Porcentaje de motilidad espermática según protocolos de criopreservación en alpacas



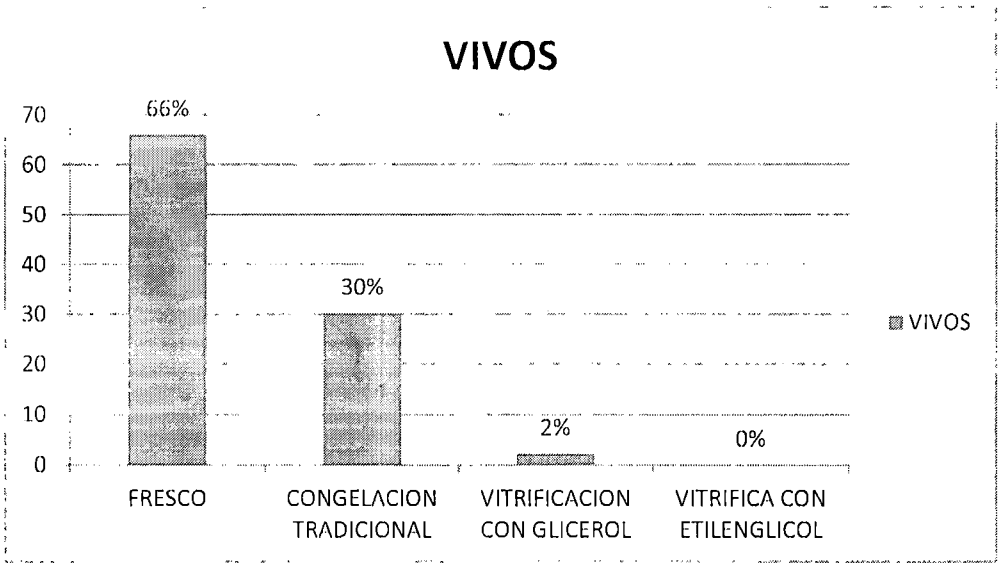
INTERPRETACION: Al realizar el analisis de las muestras se concluye que la motilidad más alta corresponde al tratamiento 1 (congelcaion tradicional) con un promedio de 73% de espermatozoides, teniendo valores que van de 71% 75% respectivamente.

Gráfico N° 2: Concentración espermática según protocolos de criopreservación en alpacas en millones.



INTERPRETACION: Al realizar el analisis de las muestras se obtiene una concentracion de 44,253,000 siendo esta la mas alta que corresponde al tratamiento 2 (vitrificacion con glicerol) , teniendo valores que van de 20,800,000 a 66,400,000 respectivamente.

Gráfico N° 3: Porcentaje de vivos según protocolos de criopreservación en alpacas



INTERPRETACION: Al realizar el analisis de las muestras se obtuvo un 30% siendo el mas alto porcentaje que corresponde al tratamiento 1 (congelacion tradicional) con un promedio de los valores varian de 17.04% a 62% respectivamente.

DISCUSIONES

Según **Bravo y col (1996)**, usando semen de alpaca, obtuvo un porcentaje de motilidad post congelamiento de 46.7% y en llama de 45%, para **Vaughan y col (2003)** que obtuvo porcentajes de 17.4%, **Santiani y col (2005)**, reportó la obtención de motilidades que iban desde 4 a 20%. **Pérez y col (2006)**, obtuvo una motilidad progresiva inicial (dilución) fue 74.3%, 77.7% y 68.6% en alpacas, a la descongelación varió el índice de recuperación del 18.0% al 43.0% dependiendo del nivel de yema de huevo. Mientras que **Giuliano y col. (2008)** encontró un 27.02% +/- 25.44 de motilidad con vagina artificial, 26.885 +/- 28.66 de motilidad, mediante electro eyaculación.

En el caso de vivos /muertos **Giuliano y col (2008)**, encontró un 59.23 +/- 12.96 de porcentaje de vivos con vagina artificial y 65.21 +/- 13.42 con electro eyaculación, **Bravo y col (1997)** reporta un porcentaje de espermatozoides vivos de 69.6 en promedio con un rango de 58.0 – 83.1

Giuliano y col (2008) reportan una concentración espermática ($10^6/\text{ml}$) con vagina artificial 72.79 +/- 68.96 y 50.28 +/- 73.13 con electro eyaculación, del mismo modo **Bravo y col (1997)** encontró una concentración total de 89 000 000 en promedio, con un rango de 61 875 000 – 750 000 000. En nuestro caso la motilidad promedio es de 83 % para muestras al fresco obtenidas de la cola del epidídimo con el dilutor Andromed. Así mismo se evaluó la motilidad después de la congelación tradicional obteniendo un promedio que es 73%, en la evaluación del protocolo de vitrificación

con glicerol se obtuvo un promedio de 22% en motilidad, si mismo en la vitrificación con etilenglicol se obtuvo un promedio de 0% en la motilidad. Respecto a los autores antes citados, no dan la edad aproximada del animal. Coincidiendo de esta forma con los rangos de **Santiani y col (2005)**, quienes reportaron la obtención de motilidades que iban desde 4 a 20%. Superando a **Pérez y col (2006)** que obtuvo una motilidad de 8 % - 43% al descongelado. Varía de acuerdo a la técnica de colección, frecuencia y estado de salubridad de la alpaca. Se coincidió también con **Pérez y col (2006)** que determinó una concentración de 25.53 y 40.49 millones de espermatozoides/ml para alpacas y llamas siendo diferentes ($p < 0.05$). Con la que coincidimos respecto a la concentración en los tratamientos 1 (congelación tradicional), tratamiento 3 (vitrificación con etilenglicol) y superamos ligeramente en el tratamiento 2 (vitrificación con glicerol) esto debido a la técnica de colección de extracción de espermatozoides epididimarios. En vivos no encontramos coincidencias con ningún autor citado,

CONCLUSIONES

- El protocolo que permite obtener mayor cantidad de espermatozoides epididimarios en alpacas viables post- congelamiento fue el de congelamiento tradicional.
- La motilidad de espermatozoides epididimarios de alpacas Huacaya varia de 83% a 22%, en congelación tradicional, 22% en vitrificación con Glicerol y 00% en vitrificación con Etilenglicol (post- congelación).
- La concentración de espermatozoides epididimarios de alpacas Huacaya oscila desde los 36 ($10^6/\text{ml}$) en fresco, 28 ($10^6/\text{ml}$) en congelación tradicional, 44 ($10^6/\text{ml}$) en vitrificación con Glicerol y 24 ($10^6/\text{ml}$) en vitrificación con Etilenglicol.
- En vivos el porcentaje de espermatozoides epididimarios de alpacas Huacaya oscila desde 66% en fresco, 30% en congelación tradicional, 2% en vitrificación con Glicerol y 00% en vitrificación con Etilenglicol.

RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos de investigación en alpacas macho ya que actualmente estas están basadas en alpacas hembras.
- Realizar investigaciones de alpaca Suri ya que no se reportan publicaciones en la parte reproductiva.
- Realizar trabajos de investigación secuencial al tema tratado en la tesis
- Realizar estudios con otros protocolos de vitrificación.
- Realizar estudios de vitrificación a nivel celular del espermatozoide.
- Realizar estudios con otros porcentajes de crioprotectores.

4.6. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. **Aitken R.J. Wang Y. F. Liu J. Best F. and Richardson D.W. 1983.** The influence of medium composition osmolarity and albumin on acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Journal Andrology* 6, Pp. 180-193.
2. **Ángulo Mejorada R. S. Ortiz Hernández A. y Berruecos Villalobos J. M. 1999.** Motilidad y fertilidad del semen de carnero descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. Departamento de reproducción, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma. México. Pp. 2-5.
3. **Albarracín J. 2005.** Vitricación de ovocitos bovinos mediante la técnica de open pulleds straw: Estudio estructural de cromosomas, microtúbulos, y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario in vitro. Tesis doctoral, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
4. **Aller J. F; Rebuffi G. E., Cancino A. K. Alberio R. H. 2003.** Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (lama glama). Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de mar de la plata. Argentina. *Arch. Zootecnia* Pp. 15-52.
5. **Arencibia Arrebola Daniel Francisco; 2009** Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), Avenida 25 y 158, Cubanacán, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de la Habana, Cuba. Vol. 10, N° 8.
6. **Bravo Pw; Ordoñez C; Alarcón V, 1996.** Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. In proceedings of the 13 the international congress on animal

reproduction, Sydney, Australia Pp 2-3. International congress on animal reproduction: Sydney.

7. **Begin I, B Bhatia, H Baldassarre, A Dinnyes, C Keefer. 2003.** Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to-4 cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. *The rriogenology* 59, 1839-1850.
8. **Burgel H; Erhardt G; Gauly M. 2001.** Cryopreservation of llama (lama glama). Spermatozoa with. On egg yolk. Free extender, in Gerken M. Renieri C, (eds) *progress in south American Camelids Research*. Wageningen pers, wageningen Netherlands.
9. **Bustinza Choque A. V. (2001).** La Alpaca Crianza, Manejo, y Mejoramiento. Libro 2. UNA- Puno - Perú. Pp. 212-236.
10. **Cando JF. 2005.** Evaluación de la sobrevivencia de embriones de coneja eclosionados, biopsiados y vitrificados por el método open pulledstraw modificado. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile
11. **Cueto M., Gibbons A., Vinent García J., Wolf M. y Arrigo J. 2003.** Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Estación Experimental Agropecuaria Barrichole, Instituto Nacional Agropecuaria. Argentina. Pp. 8-14.
12. **Critser, JK. Agca, Y. and Gunasema, KT. 1997.** The cryobiology of mammalian oocytes. In: Karrow, AM. And Critser, JK. editors. *Reproductive tissue banking*. San Diego: Academic Press. pp 332-358.
13. **Cuevas R., Leibob, Jonathan Daly, Terrence R. Tiersch 2011.** Production of channel catfish with sperm cryopreserved dy rapid non-equilibrium cooling.

14. **Daza A, 1997.** Reproducción y sistemas de explotación del ganado ovino. Ed. Mundi-prensa. Madrid.
15. **Dinnyés, A, Dai, Y., Jiang S., y Yang X. 2000.** High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. 2000. *Biology of Reproduction*. 63, 513-518.
16. **Dobrins E. Z., Crowe L.M., Berger T., Anchordoguy T., Oversteet J. W. and Crowe J. H., 1993.** Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal Exp. Zool.* Pp. 432-437.
17. **Enriquez, U. 1994.** Evaluación colectada a diferentes tiempos con vagina artificial en alpacas. Tesis MVZ. Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. Pp. 77.
18. **Ellinton J. E., Samper J. C., Jones A. E., Oliver S. A., Brunet K. M. and Wright R. W. 1999.** In vitro interaction of cryopreserved stallion spermatozoa and oviduct apithelial cells or their secretory products. *Anim reprod.* Pp. 51-56.
19. **Erdfelder, E, Faul, F., & Buchner, A. (2010).** GPOWER: A general power analysis program. *Behavior Research Methods, Instruments & Computers*, 28, 1-11.
20. **Fahy, GD.; Mac Tarlene, C.; Angell, H. and Meryman. 1984.** Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*. 21: 407-426.
21. **Fahy, G.M. 1986** Vitrification: A new approach to organ cryopreservation. *Prog Clin Biol Res* 224: 305 – 335.
22. **Fowler M 1989** Reproduction in: de di cine and surgery of South American camelids. Fowler. M. E (Ed), Iowa state university pross/Ames. .

23. **Garnica, J; Achata, R 1998.** Constituyentes químicos del plasma seminal de la alpaca. Resúmenes XII Reunión. Asoc. Per. Prod. Anim. Lima. pp 66.
24. **Graham J.K. y Foote R.H. 1987.** Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull. Cryobiol. Pp. 42-52.
25. **Gentry, A; Clutton, J; Groves, C. 2004.** The naming of wild species and their domestic derivatives. Journal of Archeological Science 31:645-651.
26. **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*) Ani. Reprod. Sci. 104, 359-369
27. **Hafez E.S.E., 2002.** Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma edición. McGraw-Hill Interamericana Ediciones. México. Pp.457-451.
28. **Holt W.V. y North R.D., 1991.** Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transition in ram spermatozoa. Journal Reprod Fert. Pp. 451-461.
29. **Huanca T. y Sapana R., 2000.** Conservación del semen de camélidos con fines de inseminación. CIP Quimsachata INIA. Puno. P. 1
30. **Ikeda H; Kikuchi K; Noguchi J; Takeda H; Shimada A; Mizokami T; Kaneko, H; 2002.** Effect of pre incubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. Theriogenology 57(4):1309-1318.
31. **Isachenko, V, Isachenko, E., Montag, M., Zaeva, V., Krivokharchenko, I, Nawroth, F., Dessole, S., Katkov, I.I., van der Ven, H., 2005.** Clean technique for cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa. Reprod. Biomed. Online 10, 350--354.

32. **Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I.I., Montag, M., Dessolet, S., Nawroth, F., Van Der Ven, H., 2004.** Cryoprotectant-free cryopreservation of human
33. **Kasai, m, irinati, a. Chang mc. 1979.** Fertilization *in vitro* of rat ovarian oocytes after freezing and thawing. Biol. Reprod. 21: 839-844.
34. **Kasai, m. Y. Hamaguchi, s. E. Zhu, t. Miyake, t. Sakurai, and t. Machida. 1992.** High survival of rabbit morulae after vitrification in an ethylene glycol-based solution by a simple method. Biology of Reproduction 46: 1042-1046.
35. **Katkov I., Katkova N., Cristales J. K. and Mazur P. 1998.** Mouse spermatozoa in high concentration of glycerol: chemical toxicity, osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. Journal Cryobiology. Pp. 325-338.
36. **Kelly M. P., Corson S. D., Social B., Batzer F. R., and Gutman J.N. 1997.** Discontinuous Percoll gradient preparation for donor insemination: determinants for success. Human Reprod. Pp. 2682-2685.
37. **Kikuchi, K; Nagai, T; Kashiwazaki, N; Ikeda, H; Noguchi, J; Shimada, A; Soloy, E; Kaneko, H. 1998.** Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 degrees. Theriogenology 50(4):615-23.
38. **Kim S; Yongcheol Lee; Honghyun Yang, Jun Kim 2012.** Department of veterinary obstetrics and theriogenology, college of veterinary medicine, Chonbuk National University, Jeonju, jeonbuk 561- 756, Republic of Korea
39. **Leivo S. P. y Dradey L. 1999.** Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa in Gagnon The male gamete. McGill University. Pp. 502-517.

40. **Linnaeus, C von. 1758.** Systema Naturae per Regna tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis. 10 ed. Laurentii Salvii. 824 p.
41. **Martins, C; Rumpf, R; Pereira, D; Dode, M. 2007.** Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal Reproduction Science* 101(3-4):326-31.
42. **Mazur F., 1984.** Cryobiology; the freezing of biological system. *Science*. Pp. 949-963.
43. **Medrano A., Cabrera F., Gonzáles F., Batista M., Quesada E., Calero P. y Gracia A. 2004.** La conservación de semen a -150 es una alternativa viable en caprinos. Unidad de Reproducción y Obstetricia, Facultad de Veterinaria, Universidad de las palmas de Gran Canaria. España. Pp. 1, 3.
44. **Ministerio de agricultura. 2006** Compendio Estadístico Agrario .Huancavelica
45. **Morton, K; Bathgate, R; Evans, G; Maxwell, C. 2007.** Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development* 19:792–796.
46. **Nawroth, F., Isachenko, V., Dessole, S., Rahimi, G., Farina, M., Vargiu, N., Mallmann, P., Dattena, M., Capobianco, G., Peters, D., Orth, I., Isachenko, E., 2002.** Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Lett.* 23, 93–102.
47. **Navarro Oscar J., Velasco Santamaría M. Yohana y Cruz Casallas Pablo E. 2004.** Evaluación de cinco protectores para la criopreservación de semen de

- Cachama Blanca (*Piaractus brachy pomus*). Facultad de Ciencias Agropecuaria, Universidad de los Llanos. Colombia. Pp. 1,2.
48. **Noiles E. E., Mazur P., Watson P. F. Kleinhans F. W. and Crister J. K. 1993.** Determination of water permeability coefficient for human spermatozoa and its activation energy. Biol Reprod. Pp. 99-109.
 49. **Olivares Rafael y Urdaneta Ramón, 1985.** Colección, Evolución y procesamiento del semen de toros. Revista Nº 17 FONAIAP. Pp. 4,5.
 50. **Pacheco C; Joel 2008.** Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos- Puno Universidad Nacional del Altiplano Pp 2.
 51. **Palma GA. 2001.** Producción in vitro de embriones. En palma GA. Primera edición .Biotecnología de la Reproducción.
 52. **Perez, M.; Apaza, E.; Deza, H. 2006.** Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos en el buffer tris con diferentes proporciones de yema de huevo y glicerol. II simposio internacional de investigación sobre camélidos sudamericanos. Arequipa – Perú. Pp. 221.
 53. **Pettit M. J. y Bhur M. M., 1998.** Extender components and surfactants after boar sperm function and membrane behavior during cryopreservation. Journal Androl. Pp. 736-746.
 54. **Quinn P. J., Chow P. Y. and White I. G. 1980.** Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at plasma membrane site. Journal Reprod. Fertil. Pp. 403-407.
 55. **Quispe, E; Alfonso, L; A Flores y Guillen, H, 2008.** Bases para establecer un programa de mejora de alpacas en la región andina de Huancavelica- Perú.

56. **Rall, WF. And Fahy, GM. 1985.** Ice free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573-575.
57. **Rosario Fernández Luis Alfredo.** 2009 Centro de Química Bio-molecular (CQB), Calle 200 y Avenida 21, Atabey, Playa, Apartado Postal 16042, Ciudad de la Habana, Cuba. Vol. 10, N° 8.
58. **Ruiz et al, 2009.** Vitrificación de ovocitos de alpaca (*vicugna pacos*). Tesis doctoral.
59. **Ruiz, JE Correa, M Martinezd, 2010.** Vitrificación de ovocitos en bovino y su uso en el desarrollo partenogénico de embriones arch. med. vet. Pp 42, 79-83.
60. **Ruiz et al., 2011.** Activación química de ovocitos de alpaca vitrificados después de la maduración in vitro. *Rev. inv. Vet. Perú.* Pp 22(3): 206-212.
61. **Santiani A; Huanca W; Sapana R; Huanca T; Sepulveda N; Sanchez R. 2005.** Effects on the quality of frozen thawed. Alpaca (*vicugna pacos*). And extenders. *Asian j. androl o* vol.7, pp 303-309
62. **Santiago-Moreno, J; Toledano-Díaz, A; Pulido-Pastor, A; Dorado, J; Gómez-Brunet, A; López-Sebastián, A. 2006.** An Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 66(5):1219-1226
63. **Shaw, JM.; Oranratnachai, A. And Trounson, AO. 2000.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology* 53 (1): 59-72.

64. **Schneider y Mazur, 1984;** Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology*. 21: 70-79.
65. **Somfai T, M Ozawa, J Noguchi, H Kaneko, N Kuriani, M Farhudin, A Dinnyes, T Nagai y K Kikuchi. 2007.** Developmental competence of in vitro fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Criobiology* 55, 115–126.
66. **Spinel C. 2002.** Biología molecular de la célula eucariótica animal. 1ra edición. Medellín (Colombia) Fondo editorial Biogénesis. Pp. 31-68.
67. **Sumar, J. 1997.** Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. I Symposium Internacional Avances en Reproducción de Rumiantes. Lima. p 30.
68. **Stornelli M. C., Tittarell C. M., Savignose C. A. y Stornelli M.A. 2005.** Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. Facultad de Ciencias de veterinaria, Universidad Nacional de La Plata. Argentina. Pp. 28-35
69. **Tachikawa, s. Otoi, t. Kondo s, machida t, kasai m. 1993.** Successful vitrification of bovine blastocyst derived by *in vitro* maturation and fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 266-271.
70. **Vaughan Jane, Galloway D. and Hopkins David, 2003.** Artificial Insemination en alpacas (*Lama pacos*). Rural Industries research and Development Corporation. Australia. Pp. 67-72.
71. **Vajta, G. 2000.** Vitrification of oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 61: 357-364.

72. **Veltjenz, N. 1997.** The globalization of alpacas. In: "Alpacas Australia" magazine Issue 18.
73. **Vilca, J. 2008.** Presentación Camélidos y Población – Curso Categorización de Fibras Comunidad San Pablo. Riobamba-Ecuador
74. **Vicent, J. S.M1998 F.X. García. 1994.** Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylenglycol on rabbit morulae. Theriogenology 42: 1205-1215.
75. **Watson P.F. 1981.** The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. J. Reprod. Fert. Pp. 483-492.
76. **Watson P.F. 1988.** Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. Journal Cryobiology. Pp. 131-142.
77. **Zhang J, TL Nedambale, Yang M, Li J. 2009.** Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. Animal reproduction Science 110, 46–55.

CYBERGRAFIA:

1. <http://www.rcl.fao.org/es/ganaderia/pdf/2914per.pdf>.

ANEXOS

**CUADRO N° 5: Base de datos de análisis de protocolos de criopreservación
en espermatozoides epididimarios de alpacas**

Programa SAS.

MOTILIDAD

Obs	TRATAMIENTO	BLOQUE	VR
1	1	4	75
2	1	4	71
3	1	4	75
4	1	4	71
5	1	4	75
6	1	2	73
7	1	2	75
8	1	2	75
9	1	2	71
10	1	4	75
11	1	4	72
12	1	4	71
13	2	2	28
14	2	4	18
15	2	4	12
16	2	4	18
17	2	4	38
18	2	2	31
19	2	2	29
20	2	4	22
21	2	2	25
22	2	4	10
23	2	2	15
24	2	4	13
25	3	2	0
26	3	4	0
27	3	4	0
28	3	4	0
29	3	2	0
30	3	2	0
31	3	2	0
32	3	2	0
33	3	2	0
34	3	2	0
35	3	2	0
36	3	4	0
37	4	4	80
38	4	4	75
39	4	4	82
40	4	4	85
41	4	4	87
42	4	2	89
43	4	2	88
44	4	2	89
45	4	2	81
46	4	4	80
47	4	4	81
48	4	4	83

Procedimiento ANOVA

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	1 2 3 4
Bloque	2	2 4

Número de observaciones leídas 48

Número de observaciones usadas 48

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: VR

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	59161.91667	14790.47917	Infin	<.0001
Error	43	0.00000	0.00000		
Total	47	59161.91667			
correcto					

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	VR Media
1.000000	0	0	44.54167

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	58080.08333	19360.02778	Infin	<.0001
Bloque	1	2343.33466	2343.33466	Infin	<.0001

Prueba de Tukey:

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	43
Error de cuadrado medio	0
Valor crítico del rango estudentizado	3.77938
Diferencia significativa mínima	0

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Tratamiento
A	83.33	12	4
B	73.25	12	1
C	21.58	12	2
D	0.00	12	3

VIVOS:

Obs	TRATAMIENTO	BLOQUE	VR
1	1	4	32.20
2	1	4	62.00
3	1	4	27.72
4	1	4	25.94
5	1	4	30.77
6	1	2	32.58
7	1	2	28.17
8	1	2	20.02
9	1	2	26.60
10	1	4	17.04
11	1	4	31.43
12	1	4	27.70
13	2	2	2.80
14	2	4	1.90
15	2	4	1.30
16	2	4	1.90
17	2	4	3.90
18	2	2	3.10
19	2	2	2.98
20	2	4	2.20
21	2	2	2.57
22	2	4	1.00
23	2	2	1.50
24	2	4	1.40
25	3	2	0.00
26	3	4	0.00
27	3	4	0.00
28	3	4	0.00
29	3	2	0.00
30	3	2	0.00
31	3	2	0.00
32	3	2	0.00
33	3	2	0.00
34	3	2	0.00
35	3	2	0.00
36	3	4	0.00
37	4	4	58.60
38	4	4	53.69
39	4	4	64.94
40	4	4	69.59
41	4	4	71.56
42	4	2	76.56
43	4	2	72.52
44	4	2	76.66
45	4	2	60.54
46	4	4	57.49
47	4	4	62.88
48	4	4	67.37

Procedimiento ANOVA

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	1 2 3 4
Bloque	2	2 4

Número de observaciones leídas 48

Número de observaciones usadas 48

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: VR

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	35277.66917	8819.41729	394.50	<.0001
Error	43	961.31109	22.35607		
Total correcto	47	36238.98027			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	VR Media
0.973473	19.21520	4.728221	24.60667

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	34250.72148	11416.90716	510.68	<.0001
Bloque	1	1026.94769	1026.94769	45.94	<.0001

Prueba de Tukey:

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	43
Error de cuadrado medio	22.35607
Valor crítico del rango estudentizado	3.77938
Diferencia significativa mínima	5.1585

Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Tratamiento
A	66.033	12	4
B	30.181	12	1
C	2.213	12	2
C			
C	0.000	12	3

CONCENTRACION

Obs	TRATAMIENTO	BLOQUE	VR
1	1	4	19000000
2	1	4	18500000
3	1	4	45200000
4	1	4	26600000
5	1	4	52900000
6	1	2	19200000
7	1	2	19000000
8	1	2	17760000
9	1	2	27760000
10	1	4	19800000
11	1	4	27200000
12	1	4	48900000
13	2	2	20800000
14	2	4	65000000
15	2	4	54300000
16	2	4	27500000
17	2	4	64400000
18	2	2	20800000
19	2	2	37000000
20	2	4	66400000
21	2	2	52800000
22	2	4	30720000
23	2	2	32000000
24	2	4	59320000
25	3	2	33400000
26	3	4	73300000
27	3	4	80100000
28	3	4	67200000
29	3	2	56700000
30	3	2	36000000
31	3	2	10400000
32	3	2	21000000
33	3	2	53500000
34	3	2	30400000
35	3	2	57600000
36	3	4	75400000
37	4	4	22304000
38	4	4	22700000
39	4	4	61600000
40	4	4	36100000
41	4	4	79200000
42	4	2	27000000
43	4	2	23940000
44	4	2	20400000
45	4	2	30000000
46	4	4	25600000
47	4	4	32200000
48	4	4	58900000

Procedimiento ANOVA

Información de nivel de clase

Clase	Niveles	Valores
Tratamiento	4	1 2 3 4
Bloque	2	2 4

Número de observaciones leídas 48

Número de observaciones usadas 48

Procedimiento ANOVA

Variable dependiente: VR

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	4	6.0077333E15	1.5019333E15	5.30	0.0015
Error	43	1.2183176E16	2.8332967E14		
Total correcto	47	1.8190909E16			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	VR Media
0.330260	42.35001	16832399	39745917

Fuente	DF	Anova SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Tratamiento	3	3.0409243E15	1.0136414E15	3.58	0.0214
Bloque	1	2.966809E15	2.966809E15	10.47	0.0023

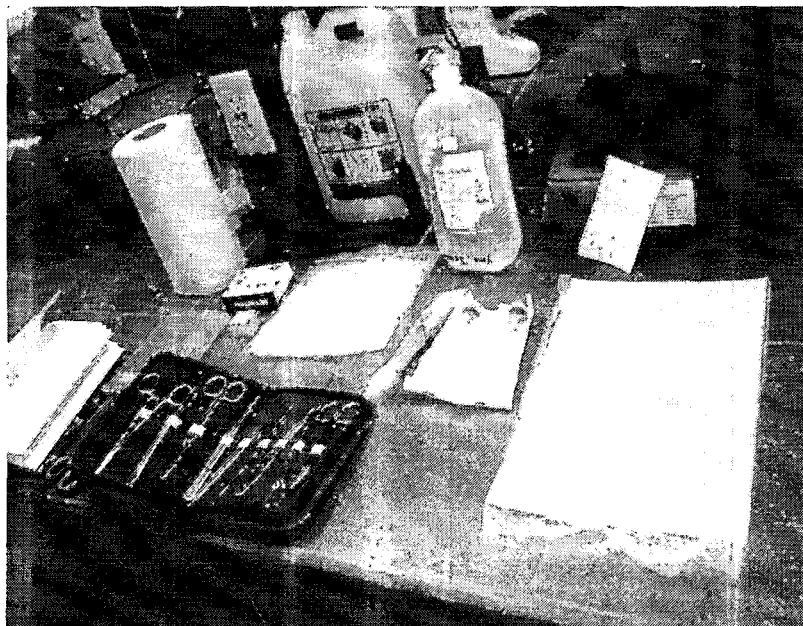
Prueba de Tukey:

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	43
Error de cuadrado medio	2.833E14
Valor crítico del rango estudentizado	3.77938
Diferencia significativa mínima	1.84E7

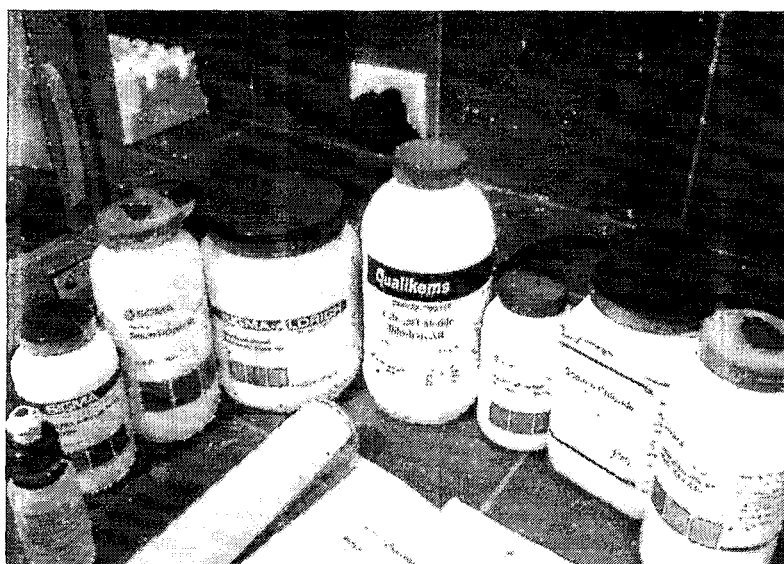
Tukey Agrupamiento	Media	Número de observaciones	Tratamiento
A	49583333	12	3
A			
B A	44253333	12	2
B A			
B A	36662000	12	4
B			
B	28485000	12	1

FOTOGRAFIAS

Fotografía N° 01: Materiales utilizados en la investigación



Fotografía N° 02: Materiales utilizados en la investigación



Fotografía N° 03: Momento de identificación de animales y colección de testículos



Fotografía N° 04: Alpaca de 4 dientes



Fotografía N° 05 Alpaca de 4 dientes



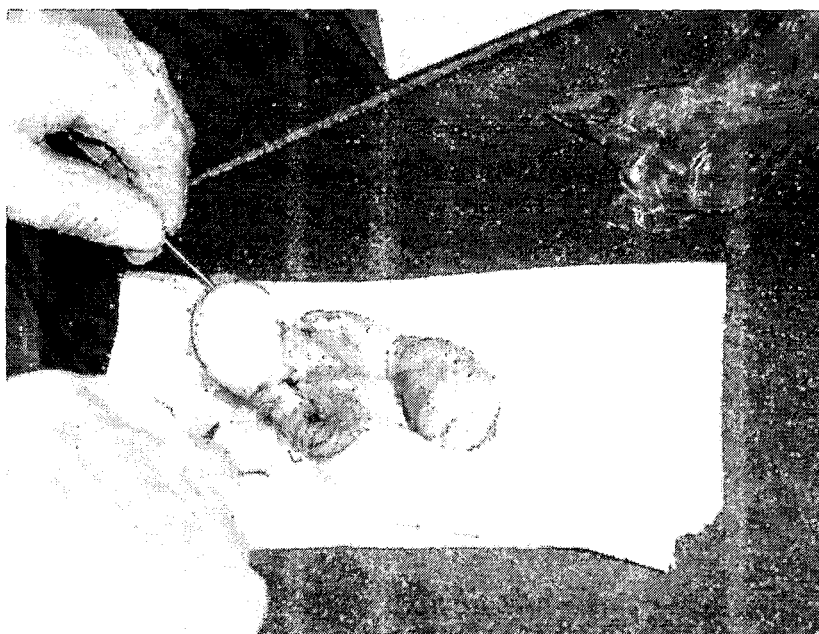
Fotografía N° 06: Extracción de testículos de alpaca



Fotografía N° 07: Extracción de testículos de alpaca



Fotografía N° 08: Separación de la membrana testicular.



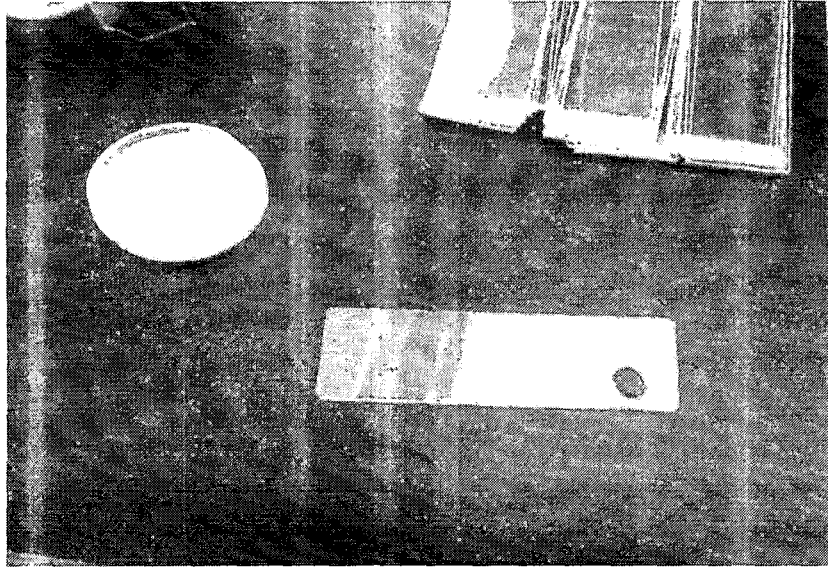
Fotografía N° 09: Limpieza de la cola del epidídimo



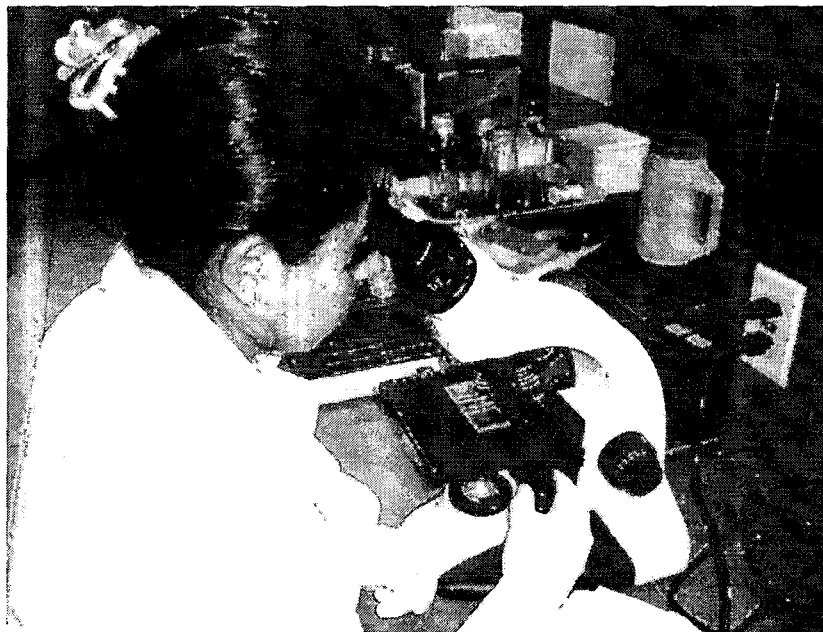
Fotografía N° 10: Trituración de epidídimo en medio de dilución



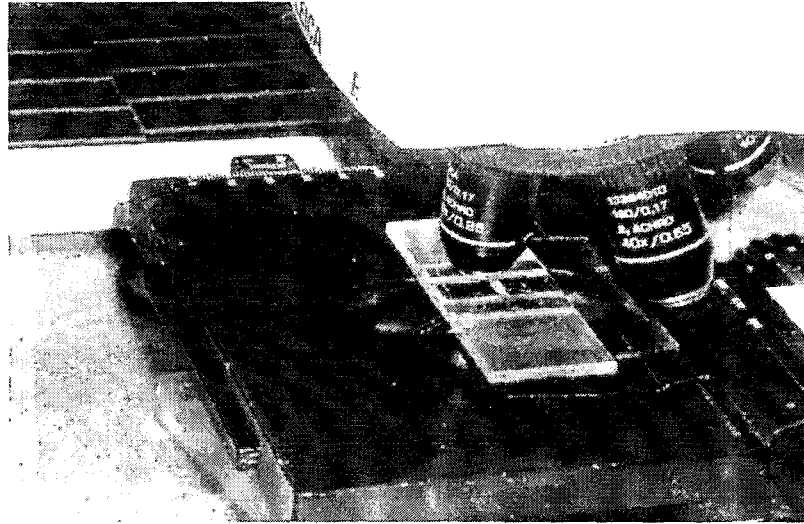
Fotografía N° 11: Muestras con tinción de Eosina, previamente identificadas



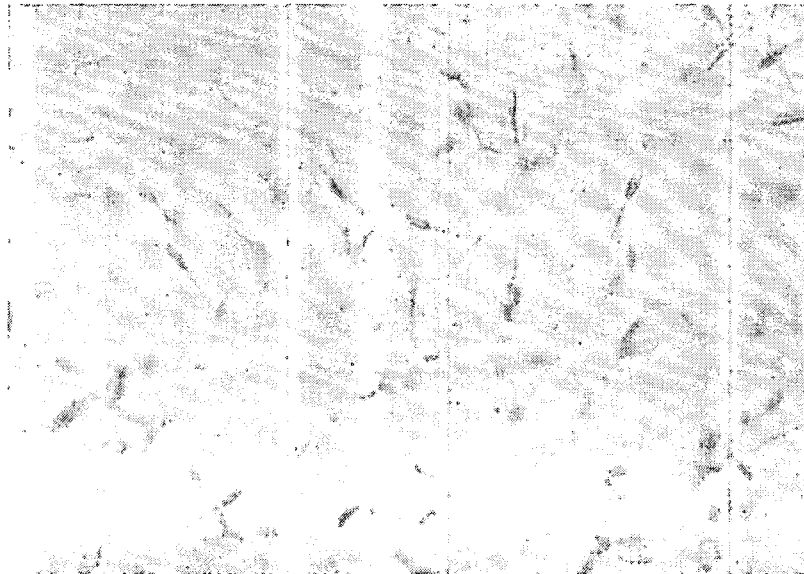
Fotografía N° 12: Evaluación de las muestras en el microscopio



Fotografía N° 13: Preparación de la cámara de Neubauer para realizar el conteo de espermatozoides



Fotografía N° 14: Evaluación de muestra de alpaca de boca llena. 40X.



Fotografía N° 15: Proceso de congelación de espermatozoide de alpaca



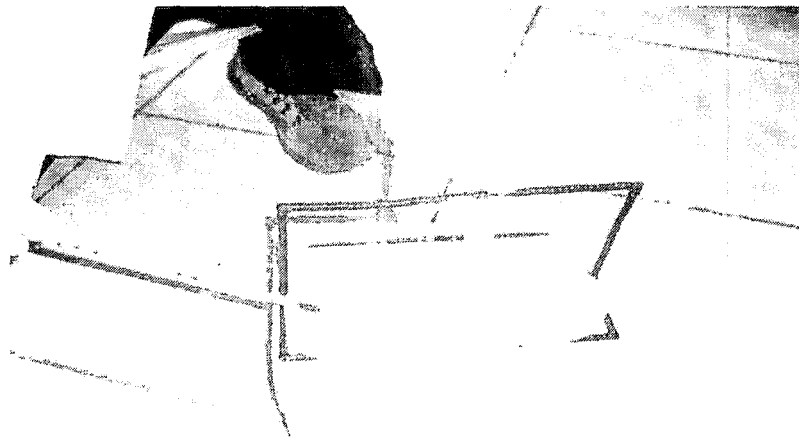
Fotografía N° 16: Enpajillado de espermatozoide d alpacas para congelación.



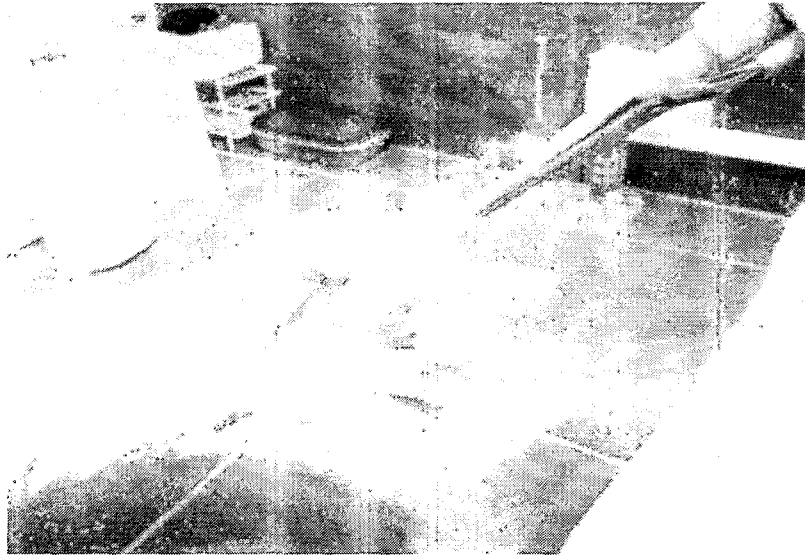
Fotografía N° 17: sellado con alcohol polivinílico para congelación de espermatozoide de alpaca



Fotografía N° 18: Exposición de pajillas de espermatozoide de alpaca al nitrógeno líquido.



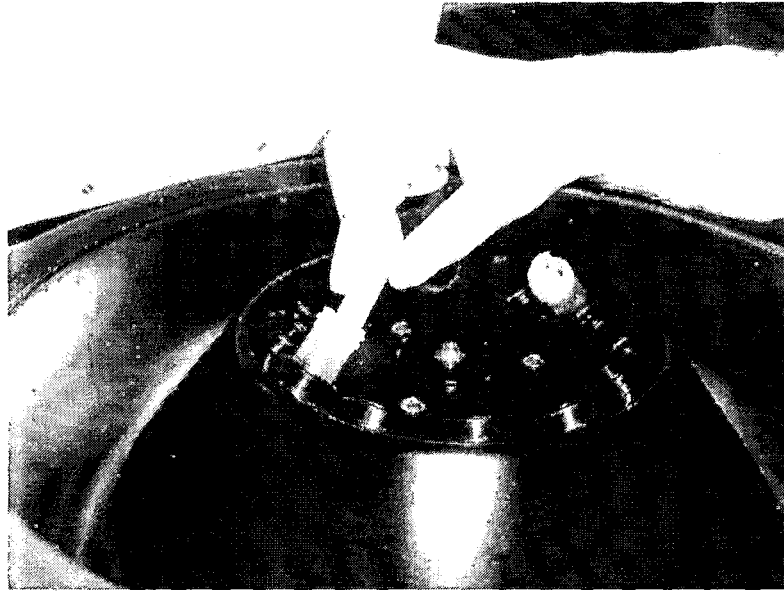
Fotografía N° 19: Preparación de muestras para vitrificación.



Fotografía N° 20: centrifugado de muestra.



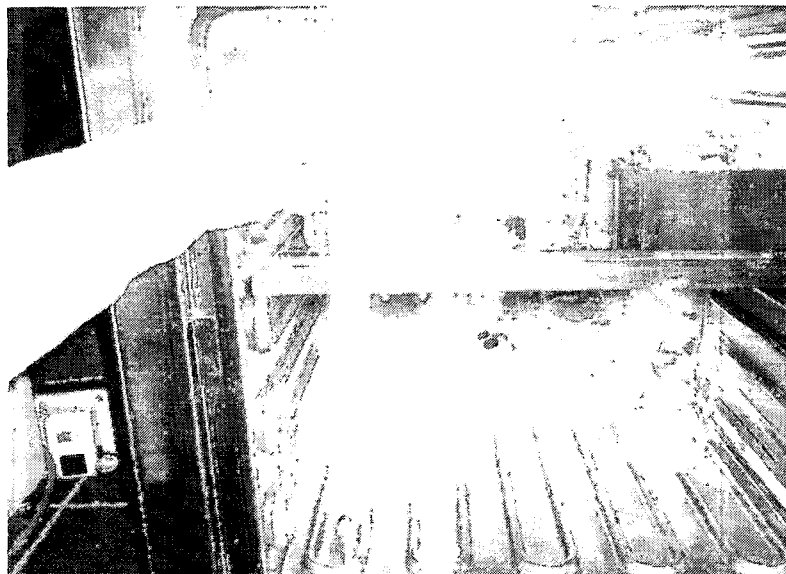
Fotografía N° 21: Extracción de muestra de centrifugado.



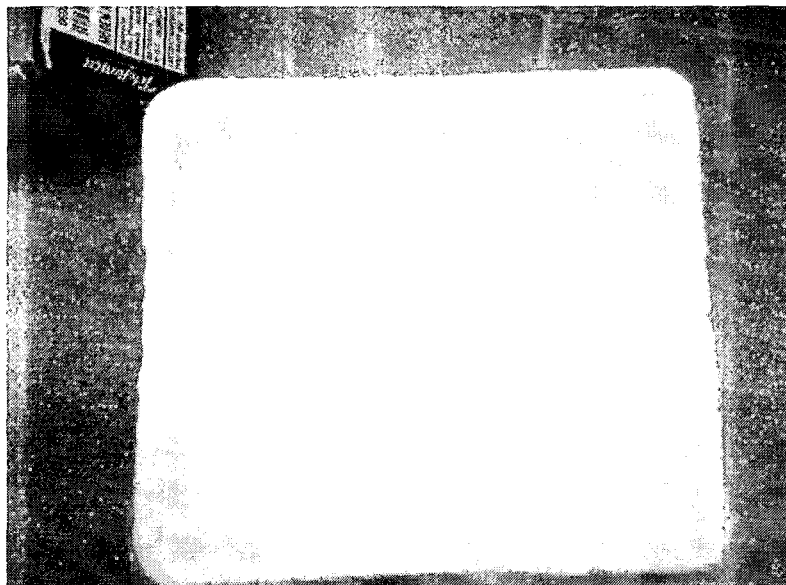
Fotografía N° 22: Muestra en medio de vitrificación.



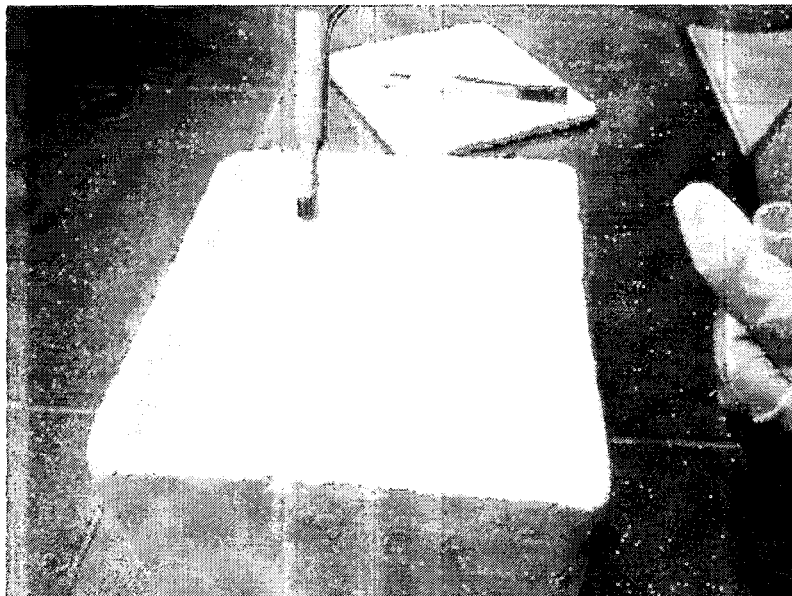
Fotografía N° 23: Estabilización de muestra con medio de vitrificación en incubadora a 37°C.



Fotografía N° 24: Preparación del nitrógeno líquido para vitrificación.



Fotografía N° 25: Lanzado de alicuotas de muestra en superficie expuesta a nitrógeno líquido.



Fotografía N° 26: vitrificación.



Fotografía N° 27: Descongelación de alícuotas vitrificadas en medio SP - TALP stock a 37° c°



Fotografía N° 28: Extracción de muestra para evaluación de muestra.



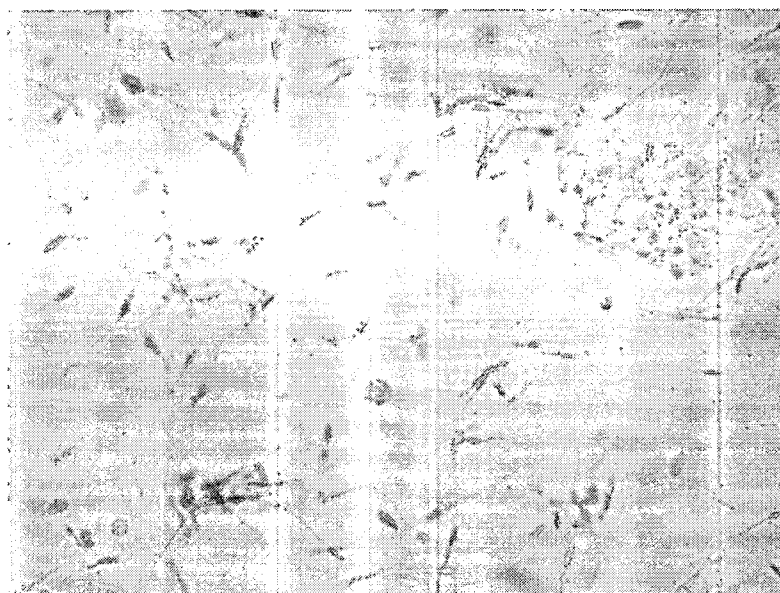
Fotografía N° 29: Evaluación de muestras post congelación. 40X.



Fotografía N° 30: Evaluación de muestras post congelación. 40X.



Fotografía N° 31: Evaluación de muestras post vitrificación. 40X.



Fotografía N° 32: Evaluación de muestras post vitrificación. 40X.

