

EFFECTO DE DOS METODOS DE CRIOCONSERVACIÓN SOBRE LA CALIDAD SEMINAL Y TASA DE PREÑEZ EN ALPACAS INDUCIDAS A OVULACION CON PLASMA SEMINAL

Effect of Two Cryopreservation Methods on Seminal Quality and Pregnancy Rate in Alpacas Induced to Ovulation with Seminal Plasma

Wilber García^{1,3*} , Edwar Maxi², Veronica Macedo², Elizabeth Mendoza², Nilton Cardenas², Julio Malaga³ 

¹ IVITA-Marangani-
Facultad de Medicina
Veterinaria –
UNMSM- Lima-Perú.

² Escuela Profesional de
Veterinaria-UNSAAC
– Cusco-Perú.

³ Facultad de Medicina
Veterinaria y
Zootecnia-UNA-Puno.

⁴ E-mail:

* Corresponding author:
Wilber García, Mail:
wgarcia@unmsm.edu.pe

Recibido: 02/09/2020

Aceptado: 18/10/2020

Publicado: 31/12/2020

ABSTRACT

The objective was to evaluate the effect of two methods of freezing on seminal quality and effect of seminal plasma as an inducer of ovulation in pregnancy percentages in inseminated alpacas. The semen collection was made post copula. After the collection of the ejaculates, motility and volume were assessed. The ejaculates with volume (≥ 1 ml) and motility ($\geq 60\%$) were mixed (pool), 80 % was used (3 samples/pool) and 20 % (2 samples/pool) during the experiment. Then and diluted in Tris-base with 20% egg yolk. The samples were cooled 1.5 hours at 5 °C. At that temperature it was combined with the basic dilutor plus glycerol, obtaining a final concentration of 5% glycerol, then they were packed in 0.5 mL (13×10^6 sperm/straw) straws to be frozen by horizontal and vertical methods. The seminal (semen + vaginal fluid) quality analysis was performed fresh and after cooling and thawing. Insemination was performed in two groups with thawed semen from two straws of the vertical method, the first group 20 females induced to ovulate with GnRH analog, the second group 20 females induced to ovulate with seminal plasma. When comparing, the results obtained of motility, viability, HOST and acrosomal integrity of fresh sperm, after the freezing process, decreased ($p < 0.05$) compared to fresh and refrigerated samples. On the other hand, when comparing the freezing methods, the sperm values frozen by the vertical method were higher than those obtained by the horizontal method, with ($p < 0.05$) in motility and HOST without ($p > 0.05$) in acrosomal integrity and viability. The vertical semen freezing method can replace the horizontal method to obtain pregnancy.

Keywords: Semen, cryopreservation, pregnancy rate, alpacas.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de dos métodos de congelación sobre la calidad seminal y efecto del plasma seminal como inductor de la ovulación en los porcentajes de preñez en alpacas inseminadas. La colección de semen se realizó pos copula. Tras la recogida de los eyaculados, se procedió a valorar motilidad y volumen. Los eyaculados con volumen (≥ 1 ml) y motilidad ($\geq 60\%$) fueron mezclados (pool), en el 80 % se utilizó (3 muestras/pool) y en el 20 % (2 muestras/pool) durante el experimento. A continuación, fueron diluido en Tris-base con 20 % de yema de huevo. Las muestras se refrigeraron 1.5 horas a 5 °C. A esa temperatura se combinó con el dilutor básico más glicerol, obteniéndose una concentración final de 5% de glicerol, luego fueron envasadas en pajuelas de 0.5 mL (13×10^6 espermatozoides/pajilla) para ser congeladas por los métodos horizontal y vertical. El análisis de la calidad seminal (semen + fluido vaginal) se realizó en fresco, tras la refrigeración y descongelación. La inseminación se realizó en dos grupos con semen descongelado de dos pajuelas del método vertical, el primer grupo 20 hembras inducidas a ovular con análogo de GnRH, el segundo grupo 20 hembras inducidas a ovular con plasma seminal. Al comparar, los resultados obtenidos de motilidad, viabilidad, HOST e integridad acrosomal de los espermatozoides en fresco, tras el proceso de congelación, disminuyeron ($p < 0.05$) en comparación con las muestras en fresco y refrigerados. En cambio, cuando se compara los métodos de congelación, los valores de espermatozoides congelado por el método vertical fueron superiores a los obtenidos por el método horizontal, con ($p < 0.05$) en motilidad y HOST sin ($p > 0.05$) en integridad acrosomal y viabilidad. El método de congelación vertical del semen puede sustituir al método horizontal para obtener preñez.

Palabras clave: Semen, crioconservación, tasa de preñez, alpacas.

INTRODUCCION

La congelación de semen es una biotecnología reproductiva muy poco empleada en camélidos sudamericanos (CSA). Las dificultades en la colección de semen y manejo de las muestras seminales, debido a su alta viscosidad, y el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados y curvas de congelamiento, se constituyen en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación con resultados óptimos de calidad espermática post-descongelado (Giuliano et al., 2012; Casareto et al., 2012; Malo et al., 2017; Skidmore et al., 2018; Tibary y Anouassi, 2018). Esto determina que la inseminación artificial quede restringida al uso de semen fresco.

En los procesos de congelado y descongelado del espermatozoide se modifica las características biofísicas del medio intracelular y provocan cambios en los lípidos y proteínas celulares que alteran o dañan la estructura y fisiología celular. La intensidad de estos daños depende mucho de la composición de los diluyentes y de la curva de enfriamiento utilizada. Tanto en humanos como en animales domésticos y silvestres se estudió y se trató de determinar la combinación óptima de curva de enfriamiento y diluyente (Carretero et al., 2014). Es así, la criopreservación de los espermatozoides de CSA se realiza generalmente en 2 pasos: en el primer periodo, el enfriamiento hasta los 5°C de 1,5 a 2 horas es suficiente para permitir un adecuado periodo de equilibrio entre los espermatozoides y el medio (Bravo et al., 2013). Cuando la temperatura del semen llega a 5°C, empieza el segundo periodo o proceso de congelamiento. En alpacas no se conoce la velocidad óptima de congelación, el método horizontal de congelación empleado en casi todos los estudios generalmente da valores de calidad seminal bajos al descongelado (Vaughan et al., 2003; Bravo et al., 2013; Terreros et al., 2015; Gómez-Quispe et al., 2016; Torres, 2018). Sin embargo, la utilización del método vertical puede ser una alternativa para la congelación de los espermatozoides de CSA.

Por otra parte, los CSA son especies de ovulación inducida (San Martín et al., 1968); es decir, que necesitan un estímulo durante la cópula para que se produzca la liberación del ovocito. En los últimos años, diversos estudios en camellos bactrianos y CSA han demostrado la presencia de un componente del plasma seminal del macho, de naturaleza proteica de una masa molecular de 14 KDa, y 12-23 AA, al cual se le denominó Factor Inductor de Ovulación (OIF), debido a su capacidad de inducir a ovulación a las hembras sin ser apareadas y con solo depositar plasma seminal en la vagina (revisado por Huanca et al., 2018). Asimismo, Adams et al., (2005) demostraron el potente efecto luteotrópico del OIF, indicando que la aplicación intramuscular (IM) determina la liberación de LH en concentraciones más elevadas y perdurables en el tiempo, debido que el cuerpo lúteo formado por inyección IM del plasma seminal es de mayor diámetro. Con base a estos antecedentes, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos métodos de congelación sobre la calidad seminal y el efecto del plasma seminal como inductor de la ovulación en los porcentajes de preñez en alpacas inseminadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio y Animales

El estudio se realizó en el fundo La Raya del Centro de Investigación IVITA-Marangani de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, situado en el distrito de Marangani, Cusco, Perú, a una altitud de 4314 msnm. Se utilizaron 5 alpacas macho de 4 a 8 años de edad y peso promedio de 68 ± 3.5 kg, así como 40 alpacas hembra de 3 a 7 años de edad, condición corporal ≥ 2.5 con peso promedio de 56 ± 7.2 kg. Los animales se mantuvieron en pasturas naturales durante todo el estudio. Los machos pertenecieron al grupo elite de reproductores del centro.

Preparación del diluyente de congelación.

Se utilizó el método descrito para congelación de espermatozoides alpacas (Baca, 1998). La fracción A fue en base a 3.03 g de Tris, 1.70 g de ácido cítrico, 1.25 g de fructosa, 10 mg de tilosina, 50 mg de gentamicina, 180 mg de lincomicina y 20 ml de yema de huevo de codorniz, y se completó hasta 100 ml con agua bidestilada. La fracción B se preparó con 10 ml de glicerol completando hasta 100 ml con la fracción A.

Para la obtención de la yema de huevo, se utilizaron huevos de codorniz frescos, los cuales fueron rotos manualmente, descartando la mayor cantidad de clara y obteniendo las yemas. A continuación, se procedió a rodar la yema de huevo sobre un papel de filtro para eliminar las chalazas y restos de albúmina adheridos a la membrana vitelina, a la cual se le practicó un corte para extraer una fracción de la yema con ayuda de una jeringa.

El plasma seminal fue obtenido siguiendo la metodología de (Turin et al., 2015) a partir del semen colectado de cinco alpacas macho, de 4 a 8 años de edad. La colección se realizó una o dos veces por semana durante el mes previo al inicio del experimento, con el uso de vagina artificial adaptada en un maniquí de alpaca. El eyaculado fue diluido 1:1 (v/v) con fosfato salino bufferado (PBS, Gibco, Grand Island, NY, EEUU) y centrifugado a 1500 g por 30 min, para separar la fracción celular del plasma seminal. Luego fue decantado en tubos falcón de 10 ml, se agregó sulfato de gentamicina (10 mg por cada 10 ml de solución) y guardado en congelación a -20 °C.

Colección de semen y protocolo de criopreservación

La colección se realizó en los meses de enero a marzo, las muestras de semen fueron obtenidas pos cópula, de acuerdo con la técnica descrita por (Alarcón et al., 2012), para lo cual, se utilizaron alpacas hembras adultas vacías y sexualmente receptivas al macho. Cada hembra fue empadrada con un macho, con una frecuencia de colección de semen dos veces por semana, luego al terminar la copula, se insertó un espéculo vaginal y todo el semen que se encontraba en la vecindad externa de la cervix fue colectado y depositado en un tubo de vidrio graduado y mantenido a 37 °C. Se evaluó la calidad de la muestra de semen fresco más secreciones de la hembra, aceptando las muestras que cumplieron los siguientes requisitos: volumen ≥ 1 ml y motilidad total ≥ 60 %. Se trabajó con 30 muestras (6 eyaculados por macho). A continuación, las muestras fueron mezcladas en un solo tubo (pool), en el 80 % se utilizó (3 muestras/pool) y en el 20 % (2 muestras/pool) durante el experimento.

Para el proceso de criopreservación de la mezcla las muestras, se diluyeron (1:1) con la fracción A del dilutor a 35 °C. Seguidamente, las muestras fueron enfriadas hasta 5 °C en un tiempo de 90 min, descendiendo a un promedio de 3 grados por min. A esa temperatura los espermatozoides enfriados se diluyeron 1:1 (muestra: dilutor) con la fracción B del dilutor, obteniéndose una concentración final de 5% de glicerol y se dejó estabilizar por 30 min para seguidamente envasar las muestras en pajuelas de 0.5 ml.

A continuación, la mitad de las pajuelas fueron congeladas por el método horizontal y la otra mitad por el método vertical con la misma concentración de espermatozoides por pajuela. En el método horizontal las pajuelas fueron acomodadas en una canastilla de metal y transferidas a una caja de poliestireno, conteniendo nitrógeno líquido (NL) y acomodadas 5 cm por encima de la superficie líquida, durante 20 min (- 6.8 °C/min). Finalmente, las pajuelas fueron inmersas en NL y, posteriormente, almacenadas en un tanque de NL.

Para el método vertical, descrita por (Hanzen et al., 2014). Las pajuelas fueron colocadas en los globlets respectivos y acomodadas en portagloblets dentro de un tanque de NL, a una altura de 5 cm de la boca del tanque, de manera la parte inferior del globlets se encuentre a 15 cm sobre el nivel del NL; en esta posición se dejó a exposición de los vapores por 20 min (-8.7 °C/min) y luego se sumergió en NL para su conservación.

Evaluación de la Calidad Espermática

Se hizo una primera evaluación (volumen y motilidad) luego de su colección en semen fresco; todas las muestras que tenían $\geq 60\%$ de motilidad y volumen ≥ 1 ml se juntaron en tubo (pool), donde se evaluó (motilidad, concentración, viabilidad, HOST e integridad acrosomal), una segunda después del refrigerado y una tercera posterior a la descongelación. Para la descongelación, cada pajuela se retiró del tanque y se sumergió en agua a 37 °C durante 1 min y su contenido se recuperó en un vial que se llevó a baño maría a 37 °C por 5 min.

Concentración espermática. Se determinó en una cámara de Neubauer. Una muestra de semen se diluyó 1:50 o 1:100, de acuerdo a la evaluación previa de la motilidad, en solución de NaCl al 3%. La concentración espermática se expresó en millones de espermatozoides por mililitro.

Motilidad. Se evaluó en forma subjetiva. Se tomó 10 μ l de semen en una lámina portaobjetos precalentada, cubriéndola con una laminilla y observada a 40X en un microscopio de contraste de fase. La motilidad se calificó como porcentaje de espermatozoides con movimientos oscilatorios y progresivos en un campo microscópico como lo describe Garnica et al., (1993). La motilidad se expresó en porcentaje.

Viabilidad. Se evaluó por medio de la tinción de eosina-nigrosina (Hancock, 1957), en portaobjetos atemperados a 37 °C y con la ayuda de un microscopio óptico a 40X. Inmediatamente después del frotis de cada lamina, se procedió a realizar el conteo de 200 espermatozoides en varios campos del microscopio. Se consideraron como espermatozoides vivos aquellos donde el colorante no penetró en la cabeza. La viabilidad se expresó en porcentaje.

Integridad de membrana plasmática. Se utilizó el test de endosmosis (Hypoos-motic- Swelling test, HOST). Para esto, se incubaron 25 μ l de la muestra en 500 μ l de solución hiposmótica (100 mOsm: citrato de sodio 0.490 gr + fructosa 0.900 gr + 2H₂O c.s.p. 100 mL) durante 60 min a 37 °C y luego se observó 10 μ l de la muestra al microscopio. Un total de 200 espermatozoides fueron contados en varios campos del microscopio, donde los espermatozoides vivos con colas dobladas e hinchadas fueron registrados como células positivas a HOST (Aisen, 2004). Los resultados se expresaron en porcentaje.

Integridad acrosomal. Se evaluó por medio de la tinción de eosina-nigrosina (Bamba, 1988), en portaobjetos temperados a 37°C y con la ayuda de un microscopio de contraste de fases a 100X se evaluaron 200 espermatozoides en varios campos del microscopio. Se consideraron como espermatozoides con acrosoma íntegro y normal, aquellos donde se observa una especie de semiluna oscura con bordes muy nítidos, sin ninguna irregularidad en la parte más externa de la cabeza del espermatozoide. Los resultados se expresaron en porcentaje.

Inseminación Artificial

Para la IA se seleccionaron 40 alpacas adultas con historia de partos anteriores y un descanso sexual ≥ 20 días pos-parto. Los animales que presentaban conducta receptiva ante la presencia del macho y un folículo pre ovulatorio ≥ 7 mm detectado por ecografía transrectal, mediante un ecógrafo Aloka 500 (Aloka Co., Led Tokio, Japón) equipado con un transductor lineal de 7.5 MHz, fueron inducidas a ovular aleatoriamente en dos grupos: T1 (n=20): se les administro 2 ml de solución de plasma seminal diluida 1:1 (v/v) en PBS; T2(n=20); se le aplico 1 ml de un análogo de GnRH (0.0042 mg de acetato de busarelina) (Conceptal, Intevet International GMBH; Alemania); ambos vía IM. La IA se realizó a las 26-30 horas de la inducción de la ovulación. La región perineal fue limpiada con una toalla húmeda y se introdujo el espéculo vaginal para identificar la os externa de la cervix. El semen descongelado de dos pajuelas (26 x 10⁶ espermatozoides/ml) del método vertical fue cargado en un aplicador de vacunos depositando dentro del cuerpo del útero. El diagnóstico de preñez se hizo por ecografía a los 30 días de la IA. La presencia de la vesícula embrionaria dentro del útero fue considerada como preñez.

Análisis Estadístico

Se empleó la estadística descriptiva para evaluar el tiempo de cópula, volumen de la muestra de semen más las secreciones de la hembra y concentración. Los porcentajes de motilidad, viabilidad, HOST+ e integridad del acrosoma fueron transformados a valores angulares ($\text{ángulo} = \arccos(\sqrt{\text{porcentaje final}})$) para acercar los datos a la distribución normal. Para determinar la existencia de diferencias estadísticas se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA), así como la prueba de postest de Duncan para determinar diferencias estadísticas entre grupos. Para evaluar el porcentaje de preñez, se empleó una regresión logística con el procedimiento Genmod del SAS 9.1.

RESULTADOS

El tiempo promedio de cópula, volumen y concentración espermática de las 30 muestras colectadas fue de 20.2 ± 6.1 min, 2.5 ± 0.5 ml y $80.9 \pm 17.1 \times 10^6$ /ml, respectivamente. Los valores de motilidad, viabilidad, HOST e integridad acrosomal (Tabla 1) de los espermatozoides tras el proceso de congelación/descongelación, disminuyeron significativamente

($P < 0.05$) en comparación con las muestras en fresco y refrigerados. En cambio, cuando se compara los métodos de congelación, los valores presentados por aquellos espermatozoides congelados por el método vertical fueron superiores a los obtenidos por el método horizontal, con diferencias significativas ($p < 0.01$) en motilidad y HOST y sin diferencias significativas en integridad acrosomal y viabilidad.

Tabla 1. Parámetros de calidad espermática (media \pm de, $n=6$) en muestras colectadas de 5 alpacas antes y después de la congelación por los métodos vertical y horizontal.

Parámetros Espermáticos	Fresco	Refrigerado	Métodos de congelación	
			Vertical	Horizontal
Motilidad (%)	70.29 ± 3.45^a	56.66 ± 3.24^b	46.25 ± 4.79^c	34.25 ± 1.71^d
Viabilidad (%)	80.48 ± 4.81^a	74.52 ± 3.30^a	54.24 ± 9.62^b	43.47 ± 16.67^b
HOST (%)	70.83 ± 1.53^a	61.61 ± 2.10^b	48.26 ± 6.36^c	38.38 ± 5.70^d
Integridad acrosomal (%)	85.78 ± 5.44^a	81.87 ± 4.59^a	76.25 ± 3.02^{ab}	75.10 ± 6.33^b

^{a, b} Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Los resultados de la tasa de preñez de las alpacas inseminadas con espermatozoides congelado por el método vertical (Tabla 2), indican que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$), entre las hembras inducidas a ovular con plasma seminal (20%) y las hembras inducidas a ovular con un análogo de GnRH (15%).

Tabla 2. Tasa de preñez en alpacas posterior a la aplicación de plasma seminal y GnRH, e inseminadas con semen descongelado por vía cervical.

Tratamiento	Inseminadas		Gestantes ¹	
	(n)	n	n	%
T1-Plasma seminal	20	4		20.0 ^a
T2-GnRH	20	3		15.0 ^a
Total:	40	7		17.5

¹ Determinado por ecografía en el día 30 post servicio

^{a, b} Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas.

DISCUSIÓN

Las características seminales encontradas en este estudio por el método de colección pos cópula son similares a reportes en alpacas (Alarcón et al., 2012; García, 2015), sin embargo, fueron mejores al semen colectado con vagina artificial (Bravo et al., 2000; Davalos y Olazabal, 2002; Huanca et al., 2012), en motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y menor porcentaje de espermatozoides muertos.

En el presente estudio, los valores de motilidad post-descongelación obtenida del 46.25 % son superiores a los reportados de espermatozoides post-descongelación de 6-20% (alpaca: Vaughan et al., 2003, Santiani et al., 2005, Canorio, 2008, Morton et al., 2010; llama: Carretero et al., 2014), o 21-40% (alpaca: Terreros et al., 2015, Canorio et al., 2015, Choez et al., 2017; llama: Burgel et al., 2000; Aller et al., 2003), en espermatozoides con y sin plasma seminal, en diferentes diluyentes, crioprotectores (tipo y concentración),

duración de la exposición y temperatura del esperma al crioprotector, empaque, tasa de congelación y descongelación. Sin embargo, cabe destacar casi todos estos autores, utilizaron el método de congelación horizontal en vapores de nitrógeno, donde las pajuelas para su congelación de (5°C a -140°C) fueron colocadas horizontalmente por encima de la superficie del NL de 10 a 20 min, luego fueron sumergidas en NL (desde -140°C a -196°C), hasta su descongelación.

Por otra parte, la viabilidad de los espermatozoides puede disminuir de 40 a 50 % durante el proceso de crioconservación según la especie (Watson, 2000), e incluso los mejores protocolos de crioconservación no garantizan una alta supervivencia de los espermatozoides (Medeiros et al., 2002). Es así, el valor de 54.24 % de viabilidad de los espermatozoides post-descongelados obtenido en el presente estudio, es cercano a lo teóricamente esperado considerando que la viabilidad inicial fue 80 %, este resultado puede considerarse como aceptable, en comparación con el estudio de Santiani et al., (2005) quienes obtuvieron una tasa de 33 % en espermatozoides eyaculado, también Choez et al., (2017) reportan 38 % usando espermatozoides epididimarios. Sin embargo, Canorio et al., (2015) reportan 60.9 % de viabilidad en espermatozoides epididimario de alpaca, usando como diluyente Tes-Tris-yema de huevo, suplementado con el agente crioprotector la dimetilacetamida a 0.375 M, en un sistema de congelamiento controlado, a velocidades de $3^\circ\text{C}/\text{min}$ (4 a -2°C), de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ (-2 a -30°C) y $8^\circ\text{C}/\text{min}$ (-30 a -80°C). Finalmente, las pajuelas se sumergieron en NL (-196°C).

El porcentaje de HOST del presente estudio de 48.3 %, fue superior a 24% reportado por Banda et al., (2010) quienes utilizaron un sistema de congelamiento controlado con el software Cryogenesis 4.0. Asimismo, Terreros et al., (2015) reportaron porcentaje de 29% post-descongelado, donde las pajillas fueron colocadas horizontalmente por encima de la superficie del NL contenido en una caja de poliestireno para lograr su exposición a los vapores, primero a una distancia de 8 cm por 10 min y luego a 4 cm por 10 min, para luego ser sumergidas en el NL. Por otra parte, según los resultados obtenidos, tras la refrigeración y crioconservación, los valores

de la integridad acrosomal de 76.25 % fueron iguales a los reportados por Morton et al., (2007, 2010) en espermatozoides de alpaca; aunque utilizaron distintos protocolos de evaluación, criopreservación y distintos materiales biológicos.

En el presente estudio, la mayor supervivencia espermática obtenida va a depender de muchos factores, entre los cuales se encuentran la calidad seminal inicial (Choez et al., 2013), composición de los diluyentes y método de congelación, es así, la velocidad de congelamiento es de considerable importancia para la calidad espermática durante el rango crítico de temperatura (Kumar et al., 2003). Este rango es definido como el periodo donde ocurre la formación de cristales de hielo y la consecuente deshidratación celular (Kumar et al., 2003) que comprende entre -5 a -50°C . En ovinos la velocidad de congelamiento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre 5 a -25°C ; $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ entre -25°C a -130°C y posterior inmersión en NL produce la mejor viabilidad, actividad mitocondrial, integridad del acrosoma y fertilidad in vitro e in vivo (Byrne et al., 2000). Por lo tanto, para ovinos la reducción de la temperatura a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ durante el rango crítico de congelamiento parece ser la más cercana a la velocidad óptima de congelamiento. No obstante, la velocidad óptima de congelamiento varía en otras especies, en espermatozoides bovinos la velocidad óptima de congelamiento es $50\text{-}100^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ (Medeiros et al., 2002), en llamas el descenso de temperatura a velocidad de $10\text{-}12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -15°C y $25\text{-}40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta -120°C dan los mejores resultados en calidad espermática al descongelado (Carretero et al., 2014). En alpacas no se conoce la velocidad óptima de congelación, en el método horizontal empleado en este estudio como en la mayoría de los autores citados en general, reportan los valores más bajos al descongelado. Donde las pajuelas fueron colocadas a una altura de 5 cm por encima del NL, los vapores enfrían las dosis seminales bruscamente de 5°C a -25°C en pocos segundos por lo que la oscilación de la temperatura resultante es bastante considerable, habiendo en este punto un evidente riesgo de inducción intracelular de nucleación de hielo, hasta que éstas alcancen temperaturas cercanas a los -140°C en un tiempo de 20 min (Salomón y Maxwell, 2000). Sin embargo, la utilización del método vertical puede proporcionar una caída más suave en la temperatura, desde los 5 a -25°C con una notable menor oscilación de la temperatura (Hanzen et al., 2014), obteniéndose los valores más altos en calidad espermática al descongelado.

Respecto a la tasa de preñez, los resultados obtenidos en el presente estudio, en alpacas inseminadas con espermatozoides descongelados, indican que no existe diferencia significativa ($p>0.05$), entre las hembras inducidas a ovular con plasma seminal y las hembras inducidas a ovular con el análogo de GnRH. Estos resultados son similares a los reportados por (revisado por Huanca et al., 2018), quienes indujeron ovulación a un grupo de alpacas utilizando plasma seminal o un análogo de GnRH antes del empadre natural, la preñez de las alpacas inducidas ovulación con GnRH, plasma seminal y control no mostraron diferencias significativas, a pesar al efecto luteotrófico del factor inductor de ovulación presente en el plasma seminal, que produce la liberación de LH en concentraciones séricas más altas y persistentes en el tiempo cuando se aplica por vía intramuscular en comparación a la aplicación de un análogo de la GnRH (Adams et al., 2005; Ulloa-Leal et al., 2014). Así mismo, induce a la formación de

un cuerpo lúteo de mayor tamaño y duplica la secreción de progesterona producida por el cuerpo lúteo formado por la inducción de ovulación con el análogo de la GnRH (Turin et al., 2015).

CONCLUSIONES

El método de congelación vertical del semen puede sustituir al método horizontal convencional para obtener preñez.

El protocolo utilizado en este estudio permitió obtener preñeces en alpacas.

CONFLICTO DE INTERESES

No hay conflicto de intereses

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

La concepción y diseño de estudio (WG), adquisición de datos (VM, EM y JM), Análisis e interpretación de datos (JM y NC), redacción del artículo y aprobación (WG)

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al proyecto N° 053-FONDECYT/BM.

REFERENCIAS

- Adams G, Ratto M, Huanca W, Singh J. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biol. Reprod.* 2005; 73: 452-457. doi: 10.1095/biolreprod.105.040097
- Aisen E. Reproducción ovina y caprina. Argentina: Inter-Médica. 2004; 205 p.
- Alarcón V, García W, Bravo W. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2012; 23: 58-64. doi: 10.15381/rivep.v23i1.882
- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec* 2003; 52:15-23.
- Bamba K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 1988; 29:1245-1251.
- Banda RJ, Evangelista VS, Ruiz GL, Sandoval MR, Rodríguez LC, Valdivia CM, Santiani AA. 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* 2010; 21: 145-153. doi: 10.15381/rivep.v21i2.129
- Bravo W, Alarcón V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, Tito F. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Animal Reproduction Science.* 2013; 136: 157– 163.
- Bravo W, Skidmore A, Zhao X. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62: 173-193. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00158-5

- Burgel H, Erhardt G, Gauly M. Cryopreservation of llama (*Lama glama*) semen, *Reprod. Domest. Anim.* 2000; 35, pp. 26 (abstract).
- Byrne G, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan J, Boland M. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62:265-275.
- Canorio N, Paredes F, Valdivia M. Agentes Crioprotectores Alternativos para el Congelamiento Lento de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2015; 26(3): 434-443 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11185>
- Canorio N. Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*). Tesis de Magister. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2008: 73 p.
- Carretero M, Neild M, Ferrante M, Caldevilla C, Arraztoal C, Fumuso F, Giuliano S. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of Lama glama spermatozoa. *Andrologia*, 2014; 20; 1–9.
- Casareto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero M, Miragaya M. Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer, *Andrologia*, 2012; 44: 335-341.
- Choez K, Evangelista S, Castillo R, Santiani A. Efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *SPERMOVA* 2013; 3(1): 83 – 84.
- Choez K, Ruiz L, Sandoval R, Evangelista S, Santiani A. Determinación de la Concentración Óptima de Tres Crioprotectores para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2017; 28(3): 619-628 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13367>
- Dávalos R, Olazábal J. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 2002; 13 (2): 98-99.
- García W. Nueva metodología de colección de semen e inseminación artificial en alpacas y llamas. En: VII Congreso Mundial en Camélidos Sudamericanos. Puno, Perú. 2015.
- Garnica J, Achata R, Bravo PW. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim. Reprod. Sci.* 1993; 32: 85-90. doi: 10.1016/0378-4320(93)90059-Z.
- Giuliano S, Chaves M, Trasorras V, Gambarotta M, Neild D, Director A, Pinto M, Miragaya M. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Animal. Reproduction. Sci.* 2012;131: 204– 210.
- Gómez-Quispe O, Guido Pérez M, Machaca V. Adición del Antioxidante Tempol en la Criopreservación de Espermatozoides de Alpaca (*Vicugna pacos*) Colectados por Desviación del Conducto Deferente. *Rev Inv Vet Perú*; 2016; 27(2): 294-302.
- Hancock J. The morphology of boar spermatozoa. *JR. Microsc. Soc.* 1957; 76: 84-97.
- Hanzen C, Cucho H, Ampuero E, Ordoñez C, Sumar J. Principios de la Reproducción de los Camélidos Sudamericanos. Ed. FUNSAAC. Cusco-Perú. 2014: 58-59.
- Huanca T, Ccopa J, Mamani R, Sumar J. Impacto de la inducción de la ovulación en la aplicación de inseminación artificial y múltiple ovulación en transferencia de embriones en camélidos. *SPERMOVA.* 2018; 8(1): 49-53.
- Huanca T, Gonzales M, Mamani R, Naveros M, Huanca W. tasa de ovulación utilizando GnRH, plasma seminal y GnRH + cópula en alpacas y llamas del CIP-Quimsachata INIA – Puno. *SPERMOVA.* 2012; 2(1): 61 – 62.
- Kumar S, Millar J, Watson P. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology.* 2003; 46:246-253.
- Malo C, Crichton E, Skidmore J. Optimization of the cryopreservation of dromedary camel semen: Cryoprotectants and their concentration and equilibration times. *Cryobiology* 2017; 74: 141-147.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodriguez JL. Current status of cryopreservation: why isn't it better. *Theriogenology.* 2002; 57: 327-344. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00674-4.
- Morton K, Evans G, Maxwell W. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology.* 2010; 74: 311-316. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.02.015
- Morton KM, Bathgate R, Evans G, Maxwell CWM. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007; 19: 792-796. doi: 10.1071/RD07049.
- Salamón S, Maxwell W. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62: 77-111. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00155-X
- San-Martin M, Copaira M, Zuniga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L. Aspects of reproduction in the alpaca. *J. Reprod. Fertil.* 1968; 16: 395-399.
- Santiani A, Huanca W, Sapana R. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders, *Asian. J. Androl.* 2005; 7: 303-309.
- Skidmore J, Malo C, Crichton E, Morrell J, Pukazhenthi P. An update on semen collection, preservation and artificial insemination in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Animal Reproduction Science.* 2018; 194:11–18.
- Terreros M, Huanca W, Arriaga I, Ampuero A. Efecto de Tres Crioprotectores en la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2015; 26(3): 420-426 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11182>.
- Tibary A, Anouassi A. Challenges in the development of artificial insemination in the dromedary camel. *Rev. Mar. Sci. Agron. Vét.* 2018; 6 (2):178-188.

- Torres E. Comparación de 2 tipos de dilutores (Tris-yema de huevo y Leche descremada) en la sobrevivencia espermática post-descongelamiento de semen de alpaca (*Vicugna pacos*) de raza Huacaya en la zona costa de Tacna. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Tacna, Perú: Univ. Nacional Jorge Basadre Grohmann. 2018: 75p.
- Turín J, Huanca W, Huanca T, Sapana R. Efecto de la Aplicación Intramuscular de Plasma Seminal sobre la Supervivencia Embrionaria en Alpacas Poscópula. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2015; 26(3): 444-450
- Ulloa-Leal C, Bogle O, Adams G, Ratto M. Luteotrophic effect of ovulation-inducing factor/nerve growth factor present in the seminal plasma of llamas. *Theriogenology.* 2014;81: 1101-1107. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.-038
- Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation, Pub. No. 03/104, Kingston, Australia. 2003: 74-77.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61: 481-492.