



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN  
CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

**Efecto de la congelación de espermatozoides del conducto deferente (*Lama glama*) sobre la calidad espermática a la post descongelación**

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Reproducción animal	Conservación de espermatozoides	Ciencias Veterinarias

3. Duración del proyecto (meses)

**12 meses**

4. Tipo de proyecto

Individual	<input type="radio"/>
Multidisciplinario	<input type="radio"/>
Director de tesis pregrado	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Perez Durand Manuel Guido Perez Guerra Uri Harold
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	947562135 y 992000419
Correo Electrónico	<a href="mailto:mqperez@unap.edu.pe">mqperez@unap.edu.pe</a> y <a href="mailto:uperez@unap.edu.pe">uperez@unap.edu.pe</a>

I. Título

**Efecto de la congelación de los espermatozoides del conducto deferente (*Lama glama*) sobre la calidad espermática a la post descongelación**

II. Resumen del Proyecto de Tesis

La congelación de los espermatozoides es una técnica reproductiva muy útil como herramienta en programas de mejoramiento genético y conservación de especies, sin embargo, aún no existe un protocolo adecuado en llamas. El objetivo del presente estudio es evaluar la congelación de los espermatozoides procedente del conducto deferente de llama (*Lama glama*), sobre la calidad espermática a la post descongelación. El estudio se realizará en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano utilizando dos llamas machos adultos las cuales serán sometidas quirúrgicamente la desviación del conducto deferente, posteriormente se colectarán espermatozoides por fricción, una vez diluidas las muestras serán evaluadas la motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad, test hipoosmótico e integridad de membrana los mismos que serán evaluados al momento de colección, del periodo de equilibrio y a la descongelación, con la adición de la fracción B del dilutor se procederá a congelar los



espermatozoides sometiendo una curva de congelación de  $-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$  (tratamiento) y el control a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno líquido por 10 minutos; todos los datos serán sometidos previamente a una prueba de homogeneidad para ver si la distribución es normal y seguidamente se realizara la prueba de chi-cuadrado para ver la diferencia. Los resultados permitirán determinar una temperatura de congelación adecuada para la sobrevivencia de espermatozoides procedentes del conducto deferente para el uso posterior de otras biotecnologías como la inseminación artificial, transferencia de embriones y producción de embriones in vitro.

### III. Palabras claves (Keywords)

Congelación, espermatozoide, conducto deferente, llama, sobrevivencia

### IV. Justificación del proyecto

El conocimiento de la biología reproductiva de los camélidos sudamericanos es aún insuficiente, especialmente en lo referido a la fisiología reproductiva del macho, existe muy poca información sobre la colección, características, evaluación, conservación y aplicación del semen en camélidos sudamericanos, debido a la falta de una metodología confiable y reproducible para la colección de semen (Calderón Antezana, 2015; Ferré & Werkmeister, 1996) esto complementado con las técnicas de congelamiento de semen que posibilitarían aún más la multiplicación y difusión de genes, al mismo tiempo que permite su conservación por periodos más prolongados de tiempo; el desarrollo de la técnica de conservación de semen en camélidos permitirá el uso del semen de machos reproductores de alta calidad genética.

Sin embargo, la colección de espermatozoides del conducto deferente posee potencial para investigar en diferentes temas sobre la crioconservación de semen. La importancia dentro del protocolo de congelación sobre los espermatozoides y específicamente la tasa de congelación a través de los niveles de temperatura crítica, definido como la formación de los cristales de hielo y consecuentemente la deshidratación de los espermatozoides, siendo en las temperaturas de enfriamiento aproximadamente entre  $-5$  a  $-50^{\circ}\text{C}$ , donde se produce el daño celular, los autores recomiendan una tasa de congelación de  $-20^{\circ}$  a  $-30^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , por la obtención de mayor motilidad a la post descongelación.

La sobrevivencia del espermatozoide (congelado/descongelado) también depende de la temperatura inicial de congelación (Kumar, Millar, & Watson, 2003; Salamon, 1970), no teniendo registrado aún para los espermatozoides procedentes del conducto deferente en llamas.

### V. Antecedentes del proyecto

#### Características de semen de llama

Las características físicas y biológicas del esperma son muy variables y dependen de las condiciones de colección tales como: método de recolección, fertilidad y libido del macho, temperatura ambiental. Las eyaculaciones tienden a no estar fraccionadas, sin embargo, algunos parámetros como la concentración, porcentaje de esperma vivo y normal pueden variar ligeramente durante el tiempo de la eyaculación (Lichtenwalner, Woods, & Weber, 1996; Moscoso, 2002). El semen de los camélidos se caracteriza por una eyaculación muy viscosa y de bajo volumen además de una baja concentración de espermatozoides tales características macroscópicas se reflejan en una baja motilidad progresiva. Actualmente el plasma viscoso es el principal obstáculo para el desarrollo de las tecnologías de reproducción asistida (TRA) en camélidos (Kershaw-Young & Maxwell, 2012). Las características microscópicas más importantes que se evalúan en el semen son motilidad, concentración, funcionalidad de la membrana plasmática a través de la prueba hipoosmótica, viabilidad espermática mediante la coloración con eosina/nigrosina (Pérez, 1998).

#### Concentración espermática.



Viene a ser el número de espermatozoides por unidad de volumen de semen (SALISBURY, VAN DER MACK, & LODGE, 1982). En Alpacas con desviación de los conductos deferentes reportan diferentes concentraciones, con un promedio de  $515.0 \times 10^4$  esp/mm<sup>3</sup> (Paricahua, 2001), con  $23,87 \times 10^4$  esp/mm<sup>3</sup> (Quintano, 2002) y  $25,53 \times 10^4$  esp/mm<sup>3</sup> (Deza, 2004).

### **Motilidad total**

La motilidad es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal. Existen varias técnicas

de estudio de motilidad, pero la más utilizada y a la vez la más simple es la valoración visual subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento. Para la realización de esta valoración debe estar en condiciones de normocinesis (temperatura 37° C). Los espermatozoides pueden presentar 2 tipos de movimientos: Movimiento de rotación (alrededor de su eje) Movimiento progresivo (desplazamiento de la célula), el cual a su vez puede ser lineal o circular. Primero se estima, el porcentaje de espermatozoides que muestran algún tipo de movimiento o "motilidad total", segundo, el porcentaje de espermatozoides motiles que presentan un movimiento progresivo o "motilidad progresiva" (Salamon & Maxwell, 1995). La motilidad lograda a través de la desviación de los conductos deferentes reporta una motilidad individual del 64.81% al 67.37 % (Quintano, 2002) y 71.89 % (Deza, 2004).

### **Vitalidad**

La integridad de la membrana espermática ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su papel clave en la función espermática. De hecho, el estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula. La evaluación morfológica se realiza usando tinciones supravitales como la tinción eosina/nigrosina. El componente nigrosina proporciona un fondo de contraste a las células espermáticas. La eosina tiene la capacidad de penetrar la membrana plasmática de los espermatozoides muertos, observándose estos al microscopio, con la cabeza parcial o completamente rosada, mientras que los espermatozoides vivos aparecen de color blanco pálido contra el fondo púrpura, lo cual es un indicador de la integridad de la membrana celular y, en consecuencia, de la viabilidad o vitalidad celular (Holt, 2000). En algunas investigaciones con espermatozoides de alpacas procedentes de los conductos deferentes hallaron para la vitalidad un 58.99% (Paricahua, 2001) y de 41.75 al 86.25% (Quintano, 2002).

### **Test hiposmótico**

Está basado en la presión osmótica del espermatozoide, en su interior la presión osmótica es de 325 mOsm/Kg, al introducir el semen en una solución hipoosmótica (100 mOsm/Kg), la diferencia de presión entre el medio externo y el medio interno del espermatozoide, hará que éste libere líquido para equilibrar la presión osmótica, produciéndose así un enrollamiento del flagelo sobre sí mismo, permitiendo valorar microscópicamente la cantidad de espermatozoides vivos; por otro lado, los espermatozoides muertos permanecerán intactos (Jimenez, 1994). Se considera normal la prueba cuando más del 60% de espermatozoide presentan hinchamiento de la cola después del test hipoosmótico en espermatozoides recién colectados (Gonzales, 1998).

### **Integridad de acrosoma**

El acrosoma es una organela membranosa de doble capa ubicada en la parte apical de la cabeza espermática, que contiene distintas enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina. La determinación de la Integridad acrosomal es uno de los parámetros espermáticos de importancia debido a su papel en la reacción acrosomal. La reacción acrosomal es un proceso exocitótico que consiste en la fusión del acrosoma con la membrana plasmática, resultando en la exposición y liberación del contenido acrosomal al medio extracelular, permitiendo que se realice la fecundación del ovocito. La liberación del contenido acrosomal se lleva a cabo cuando el espermatozoide entra en contacto con mecanismos de señalización que se encuentra en la zona pelúcida y esta mediado por la progesterona, además de estar regulado por el incremento intracelular del calcio (Harrison, 1998). En una evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de Alpaca



mediante Citometría de Flujo, se encontró que el promedio porcentual de espermatozoides vivos fue de 63.38%, espermatozoides con integridad acrosomal 95.19% y espermatozoides vivos con integridad acrosomal de 61.13% (Ugarelli et al. 2017). Para evitar la viscosidad del semen en camélidos sudamericanos se desarrolló la técnica de plastia de conductos deferentes por medio quirúrgico para coleccionar espermatozoides directamente de los conductos deferentes sin la presencia de viscosidad seminal lo que facilita su manejo y dilución (Deza, 2004; Pérez, 1998; Quintano, 2002).

### **Criopreservación de semen**

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones (Ávila-Portillo et al., 2006). La criopreservación del semen contribuye a la expansión de técnicas reproductivas, como la inseminación artificial (AI) y la fertilización in vitro (Medeiros, Forell, Oliveira, & Rodrigues, 2002).

El fin de los protocolos de criopreservación es la de obtener mejores resultados en relación con la supervivencia espermática y la fertilidad del semen al descongelamiento, la criopreservación permite el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas muy bajas, por lo que es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo potencialmente fértil en el tiempo, durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir en la célula espermática, daños letales que comprometen su funcionalidad (Choez, 2010). La alta viscosidad es común en el semen de los camélidos. Esto representa un desafío más para desarrollar la inseminación artificial. Muchas investigaciones citan la viscosidad natural del semen de los camélidos como el principal obstáculo que impide el desarrollo de la conservación y la inseminación artificial (Morton, Vaughan Jane L., Maxwell W. M. Chris, Research, & (Australia, 2008).

Si bien la criopreservación garantiza la supervivencia de los espermatozoides, tiene efectos sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides y es un factor que debe ser considerado en protocolos de tecnologías de reproducción asistida, ya que la fertilidad del semen es el factor más importante para tener en cuenta al implementar nuevas técnicas o procedimientos en programas de IA (Aller, Rebuffi, Cancino, & Alberio, 2003). La conservación de espermatozoides y de su capacidad fertilizante exige la reducción o interrupción reversible del metabolismo celular, esto se consigue mediante el uso de dilutores, ya que los procedimientos de refrigeración y congelación deprimen el metabolismo (Choez, 2010).

La congelación de semen es una biotecnología reproductiva muy poco empleada en camélidos sudamericanos. Las dificultades en la colección de semen y en el manejo de las muestras seminales, debido a su alta viscosidad, y el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados para el semen de camélidos se constituyen en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación con resultados óptimos de calidad espermática post-descongelamiento. Esto determina que la inseminación artificial quede restringida al uso de semen fresco. Asimismo, se tiene que considerar la baja concentración de espermatozoides y el alto porcentaje de anormales que, como características usuales del semen de alpaca, incrementan la dificultad de obtener parámetros espermáticos post-descongelamiento adecuados que permitan la fecundación (Bravo, Flores, Garnica, & Ordoñez, 1997).

### **Licuefacción del semen**

La función de la gran viscosidad en el semen de los camélidos se desconoce pero se presume que crea una especie de reservorio de semen o que puede ser importante para mantener a los espermatozoides viables dentro del útero (Huanca & Adams, 2007). El semen se vuelve líquido a las 23 horas (rango de 8 – 30 horas) después de la colección naturalmente. Varios métodos de licuefacción del semen, como el uso de enzimas (Bravo P., 2002) y agitación mecánica se han utilizado



con cierto éxito para simplificar la manipulación y permitir la dilución, extensión, y congelación del semen. Se diseñó un estudio para probar la efectividad de enzimas para licuar el semen (por ejemplo, colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa o tripsina), la colagenasa fue efectiva para eliminar la viscosidad del semen en cinco minutos con muy baja repercusión en las características del semen (Huanca & Adams, 2007).

Un método mecánico para reducir la viscosidad del eyaculado implica la aspiración y expulsión del eyaculado a través de una aguja; la técnica efectivamente reduce la viscosidad y tiene muy poca influencia en otras características del semen (Valdivia, Ruiz, & Bermudez, 1999).

### **Temperaturas de congelación**

Durante la criopreservación, los espermatozoides son sometidos a tensiones mecánicas, osmóticas y termales, estos fenómenos pueden variar de acuerdo al tipo de congelamiento utilizado, que generalmente son dos: congeladores programables y no programables, este último mecanismo depende de la relación entre el volumen y la superficie de la pajilla y la velocidad de ventilación; por otro lado, mediante el uso de la congelación programada se obtuvieron velocidades de congelamientos óptimos para búfalos (Shah, Andrabi, & Qureshi, 2016).

Se ha observado que, en los protocolos de congelación equilibrada, los sistemas biológicos sometidos a congelación pueden presentar rangos específicos en los cuales al momento del descongelado la supervivencia es óptima, esto debido a que, entre el inicio del programa de congelamiento y estabilización de la célula en estado vídrio, estas son expuestas a condiciones no fisiológicas desfavorables, por lo tanto, un congelamiento demasiado lento o demasiado rápido ocasiona un daño irreversible en las células y tejidos a preservar (Woelders & Chaveiro, 2004).

Con mayor frecuencia el espermatozoide de los camélidos no es muy resistente frente a los procesos de congelado y descongelado, para lo cual uno de los aspectos importantes a tomar en cuenta para el éxito de la criopreservación viene a ser el tiempo de equilibrio durante el congelamiento (Malo, Crichton, & Skidmore, 2017).

El tiempo de equilibrio es definido como el periodo en el que, después de la dilución, el glicerol ingresa rápidamente dentro del espermatozoide con el fin de establecer el equilibrio entre los compartimentos intracelulares y extracelulares, en este tiempo también se da el equilibrio de concentración osmótica de otros componentes del dilutor (Salamon & Maxwell, 2000). En índices se demostró que tiempos de equilibrio de 15 minutos no afectaron la calidad espermática, y tiempos de equilibrio demasiado cortos menores a un minuto reducen la vitalidad del espermatozoide en toros y aves de corral (Leite et al., 2010; Pradiee et al., 2014; Santiago-Moreno et al., 2011). En camellos dromedarios se determinó que tiempos de equilibrio de una y dos horas no afectaron a la calidad espermática al momento del descongelamiento, sin embargo, se pudieron observar mejores resultados en la escala de entre 0 a 10 minutos (Malo et al., 2017).

## **VI. Hipótesis del trabajo**

Que el proceso de congelación/descongelación permite mantener viables a los espermatozoides procedentes del conducto deferente de la llama.

## **VII. Objetivo general**

Determinar la calidad espermática procedentes del conducto deferente al proceso de congelación/descongelación.

## **VIII. Objetivos específicos**

Evaluar la calidad espermática de los espermatozoides procedente del conducto deferente de llama



al momento de la colección y enfriamiento.

Determinar la calidad espermática procedente del conducto deferente de llama, después de haber sido sometidas al proceso de congelación con una curva gradual de  $-20^{\circ}/\text{minuto}$  hasta llegar a  $-100^{\circ}$  y su almacenamiento a  $-196^{\circ}\text{C}$  de temperatura de congelación

## IX. Metodología de investigación

### Lugar de Estudio

La presente investigación se realizará en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, el cual se encuentra ubicado en la ciudad universitaria de la Universidad Nacional del Altiplano, a 3823 msnm; durante los meses de enero a marzo.

### Material

Serán espermatozoides de 2 llamas colectados de conducto deferente, de cada macho se colectarán 6 veces, distribuyendo en cada sesión dos pajillas por temperatura de congelación (tratamiento) utilizando un solo dilutor para evitar alguna variación.

### Diseño del proyecto

Congelación a $-20^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$	Congelación control a 7 cm sobre el NL
n=10	n= 10

### Colección de espermatozoides

La colección de espermatozoides se realizará de acuerdo a la técnica recomendada por Pérez y col. (2014), con ligeras modificaciones, se describe en forma breve, se utilizarán 2 machos llamas como donadores de espermatozoides. Para la dilución se utilizará el dilutor Tris las muestras de los espermatozoides se colectarán de la fistula del conducto deferente realizando ligeros masajes, las microgotas de espermatozoides se recogerán con un tips de 5 uL de capacidad adosados a una jeringa de tuberculina y se colocaran dentro los 0.5 mL de dilutor que estará dentro un tubo graduado y que a la vez estará protegido en baño de agua a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$ .

### Evaluación

#### Motilidad total

La evaluación de la motilidad total se realizará bajo la luz de un microscopio óptico acoplado con una platina a  $37^{\circ}\text{C}$  a 400X de magnificación. Previamente se dejará calentar láminas portaobjetos y cubreobjetos sobre la platina a  $37^{\circ}\text{C}$ . Con la ayuda de una jeringa tuberculina acoplado a un tip de 20 $\mu\text{L}$  se aspirará la muestra de espermatozoides diluido del tubo de ensayo y se colocará un volumen de 5 $\mu\text{l}$  sobre una lámina porta objetos. Seguidamente se cubrirá con una laminilla cubreobjetos de 22x22 mm. La evaluación se realizará en cinco campos diferentes, las células espermáticas que presentaran cualquier tipo de movimiento se contarán y células que no presenten movimiento (se contarán 200 células espermáticas como mínimo). Los resultados se expresarán en porcentajes.

#### Motilidad progresiva

La Motilidad progresiva se realizará bajo la luz del microscopio a 400X de magnificación y acoplado con una platina a  $37^{\circ}\text{C}$  en 5 campos diferentes y se contarán al menos 200 células espermáticas y solo se contarán a los espermatozoides que presenten movimiento rectilíneo y se consideraran como motilidad progresiva y los resultados se expresaran en porcentajes.

#### Test hipoosmótico



La evaluación del Test Hiposmótico se realizará por el método descrito por Revell and Mrode (1994) de la siguiente manera: En un tubo de ensayo se colocará 100 uL de espermatozoides diluidos y se adicionará 1 mL de solución Hipoosmótica (13.51 g de fructuosa y 7.35 g de citrato de sodio trihidrato disueltos en un litro de agua destilada que tiene una osmolaridad de 150 mOsm/kg). La mezcla se incubará a 37°C durante 60 min. Luego con la ayuda de una jeringa adosada con un tip 15µL se aspirará y colocará sobre una lámina portaobjetos y se cubrirá con una lámina cubreobjetos, 200 espermatozoides serán evaluados bajo la luz de un microscopio óptico a 400X de magnificación donde los espermatozoides con cola enrollada e hinchada se considerarán con reacción positiva, los resultados se expresarán en porcentaje.

#### **Integridad de acrosoma**

Para la evaluación de la integridad de acrosoma se realizará en el mismo frotis realizado para evaluar la morfología y la vitalidad, se evaluarán los espermatozoides bajo la luz de un microscopio de contraste a 1000X de magnificación con aceite de inmersión, se evaluarán 200 células espermáticas, tomando en cuenta el acrosoma intacto y acrosoma dañado y los resultados se expresarán en porcentaje.

Las evaluaciones de Motilidad total, motilidad progresiva, test hiposmótico e integridad de acrosoma se realizarán a la pre-congelación y post descongelación.

#### **Congelación de los espermatozoides**

Para la congelación, primer lugar, los espermatozoides se determinara la concentracion, motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad, anormalidades, integridad de acrosoma, test hiposmotico cuando los espermatozoides esen pre-diluidos 0.5 mL de dilutor Tris a 37 °C.

Para el enfriamiento (a 5°C) la muestra se colocara dentro una refrigeradora por espacio de 2 horas aproximadamente.

La fracion B se le adicionara calculando que cada dosis de 0.25 ml de volumen contenga al menos 10 x 10<sup>6</sup> de espermatozoides motiles y con el 5% de glicerol al volumen total y se dejara por al menos 45 minutos para su equilibracion.

Para el empajillado, se rotularán las pajillas de 0.25 ml con la ayuda de lapiceros de tinta permanente, tomando en consideración al tratamiento, la clave del animal y la fecha de congelación, a continuación, será envasado en pajillas de 0.25 mL de capacidad.

La congelación de tratamiento tendrá una curva de congelación de -20°C/min por tanto la duración de la congelación serán de 4, 5, y 6 minutos respectivamente, enseguida las pajillas serán sumergidas en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados en tanques criogénicos hasta su evaluación.

#### **Descongelación**

Para la descongelación se utilizará un baño María a 37°C en el cual será sumergida la pajilla inmediatamente después de ser sacada del tanque criogénico siendo descongelada por un tiempo de 30 s, luego del cual se evaluará la motilidad.

#### **Estadístico**

Los datos serán sometidos a la prueba de homogeinidad para determinar si los porcentajes que se obtendrá si se distribuyen normalmente seguidamente se aplicara la prueba de Chi-cuadrado.

## **X. Referencias**





- Aller, J. F., Rebuffi, G. E., Cancino, A. K., & Alberio, R. H. (2003). Influence of Cryopreservation on the Motility, Viability and Fertility of Llama (Lama Glama) Spermatozoa. *Arch. Zootec*, 52, 15–23.
- Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., ... Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291- 300.
- Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J., & Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47(3), 619–626. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00020-4)
- Bravo P., W. M. (2002). *The Reproductive Process Of South American Camelids*. Ithaca: Seagull Printing.
- Calderón Antezana, D. W. (2015). Efecto de la adición del plasma seminal de toro (bos taurus) sobre la viabilidad de los espermatozoides criopreservados colectados de los conductos deferentes en alpacas (vicugna pacos). universidad nacional del altiplano.
- Choez, K. Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos, UNMSM-SIRIVS § (2010). Lima.
- Deza, H. (2004). Conservación de Espermatozoides Obtenidos a través del Conducto deferente en Alpacas (Vicugna pacos) y Llama (Lama glama) y su Posterior Viabilidad. Universidad Nacional del Altiplano.
- FAO. (2005). Situación actual de los samélidos sudamericanos en Perú. *Fao*, 1–429. [https://doi.org/10.5209/rev\\_RCCV.2013.v7.n1.41413](https://doi.org/10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n1.41413).
- Ferré, L., & Werkmeister, A. (1996). Desarrollo de una vagina artificial termoeléctrica para la colecta de semen. *Rev Agr Prod Anim.*, 16, 363–365.
- Gonzales, G. (1998). *Manual de diagnóstico de la pareja infértil*. Instituto de Investigación de la altura Lima.
- Harrison, R. (1998). *Sperm evaluation: what should be testing?* Tsukuba: 6a MAFF international Wordshop on Genetic nresources.
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Huanca, W., & Adams, G. P. (2007). Semen collection and artificial insemination in llamas and alpacas. In R. Youngquist & W. Threlfall (Eds.), *Current therapy in large animal theriogenology* (2nd Ed., pp. 869–873). Elsevier.
- Jimenez, C. (1994). Descripción de aspectos microscópicos al examen de espermatozoides. *Revista Argentina de Producción Animal*, 23, 121 – 126.
- Kershaw-Young, C. M., & Maxwell, W. (2012). Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(SUPPL.4), 369–375. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02100.x>
- Kumar, S., Millar, J. D., & Watson, P. F. (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: A comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, 46(3), 246–253. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00040-3)
- Leite, T. G., do Vale Filho, V. R., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Emerick, L. L., Zaffalon, F. G., ... Andrade, V. J. de. (2010). Effects of extender and equilibration time on post-thaw motility and membrane integrity of cryopreserved Gyr bull semen evaluated by CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science*, 120(1–4), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.04.005>





- Lichtenwalner, A. B., Woods, G. L., & Weber, J. A. (1996). Ejaculatory pattern of llamas during copulation. *Theriogenology*, 46(2), 285–291. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00185-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00185-9)
- Malo, C., Crichton, E. G., & Skidmore, J. A. (2017). Optimization of the cryopreservation of dromedary camel semen: Cryoprotectants and their concentration and equilibration times. *Cryobiology*, 74, 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.001>
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?, 57(1), 327–344. MINAGRI. (n.d.). *Camelidos Sudamericanos*.
- Morton, K. M., Vaughan Jane L., (researcher.), Maxwell W. M. Chris, (researcher.), Research, R. I., & (Australia), D. C. (2008). Continued development of artificial insemination technology in alpacas.
- Barton, A.C.T. : Rural Industries Research and Development Corporation. Moscoso, R. (2002). Ejaculatory Proces S and Related S Emen Characteris Tics, 72, 65–72.
- Paricahua, E. (2001). Evaluación del semen sin la secreción de las glándulas anexas en alpacas (Lama pacos). Universidad Nacional del Altiplano.
- Pérez Durand, M. G. (1998). Capitulo 4; Inseminacion Artificial en Camelidos Sudamericanos. Revisado
- Pradiee, J., Estes, M. C., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., López-Sebastián, A., & Santiago-Moreno, J. (2014). Cryopreservation of epididymal sperm from ibexes (*Capra pyrenaica*) using short equilibration time with glycerol. *Theriogenology*, 82(3), 525–528. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.012>
- Quintano, J. (2002). Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (lama pacos) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Universidad Nacional del Altiplano.
- Salamon, S. (1970). The survival of ram spermatozoa following pellet freezing below -79°C. *Australian Journal of Biological Sciences*, 23(2), 459–468. <https://doi.org/10.1071/BI9700459>
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*, 38(1–2), 1–36. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01328-J](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01328-J)
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- SALISBURY, G., VAN DERMACK, L., & LODGE, J. (1982). *Fisiología de la Reporducción Animal e inseminación Artificial de los Bóvidos*. (2da Ed.). Zaragoza: Editorial Acribia.
- Santiago-Moreno, J., Castaño, C., Toledano-Díaz, A., Coloma, M. A., López-Sebastián, A., Prieto, M. T., & Campo, J. L. (2011). Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time. *Poultry Science*, 90(9), 2047–2053. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01355>
- Shah, S. A. H., Andrabi, S. M. H., & Qureshi, I. Z. (2016). Effect of equilibration times, freezing, and thawing rates on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Andrology*, 4(5), 972–976. <https://doi.org/10.1111/andr.12214>
- Valdivia, M., Ruiz, M., & Bermudez, L. (1999). Criopreservacion de semen de alpacas. 2nd Congreso Mundial Sobre Camélidos.



Woelders, H., & Chaveiro, A. (2004). Theoretical prediction of “optimal” freezing programmes. *Cryobiology*, 49(3), 258–271. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.09.001>.

## XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto.

Los resultados servirían un protocolo para congelar espermatozoides de camélidos domésticos y que también se usaría en la inseminación artificial.

## XII. Impactos esperados

### i. Impactos en Ciencia y Tecnología

Los resultados permitirán generar conocimientos referenciales para el uso posterior de otras biotecnologías como la inseminación artificial, transferencia de embriones y producción de embriones in vitro

### ii. Impactos económicos

La investigación en camélidos sudamericanos, como al principio en otras especies, permite aprovechar eficientemente su producción y la mejora en la calidad genética de los animales, incrementando su valor y así el ingreso de los productores de llamas.

### iii. Impactos sociales

Las llamas y casi la totalidad de criadores de llamas han sido y aun vienen siendo marginados, para lo cual este estudio permitirá satisfacer la mejora en la producción de esta especie, y así su calidad de vida.

### iv. Impactos ambientales

El estudio permitirá indirectamente el incremento de la población de llamas de alto valor genético sobre las regiones alto andinas y aprovechar de esta manera los recursos vegetales de estas zonas, que otras especies no pueden consumir.

## XIII. Recursos necesarios (Infraestructura, equipos y principales tecnologías en uso relacionadas con la temática del proyecto, señale medios y recursos para realizar el proyecto)

### **Infraestructura:**

Laboratorio de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Corrales para las llamas

### **Equipos:**

Congelador de semen  
Balanza analítica  
Microscopio óptico  
Baño maría  
Refrigeradora  
Cocina eléctrica  
Platina térmica  
Estufa  
Termos  
Termocupla  
Recursos propios y del laboratorio.



**Material Biológico:**

3 o 2 llamas macho mayores de 3 años

**Reactivos y otros materiales:**

Tris  
Glicerol  
Eosina  
Nogrosina  
Nitrogeno liquido  
Polivinilo de cloruro  
Alcohol medicinal  
Agua bidestilada  
Aceite de inmersión  
Antibiotico  
Vasos de precipitación  
Probetas de diferentes capacidades  
Camara de Newbauer  
Tubos de ensayo  
Cronometro  
Laminas portaobjetos  
Laminas cubreobjetos  
Jeringas de tuberculina  
Tips  
Lapiceros indelebles de diferentes colores  
Pajillas de 0.25 mL  
Papel toalla

**XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)**

El proyecto se realizará en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, el cual se encuentra ubicado en la ciudad universitaria de la Universidad Nacional del Altiplano, a 3823 msnm, en la ciudad de Puno.

**XV. Cronograma de actividades**

Actividad	Trimestres												
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Presentación del proyecto	X												
Ejecución del proyecto		X	X	X	X	X	X	X					
Tabulación de datos y redacción del artículo									X	X	X		
Presentación del artículo													X

**XVI. Presupuesto**

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Congelador	equipo	500.00	1	500.00
Tris	mL	0.50	100 mL	50.00
Jeringas de tuber	caja	0.50	100	50.00
Portaobjetos	caja	15.00	3	45.00
Cubreobjetos	caja	10.00	5	50.00
Nitrogeno	Kg	20.00	20	400.00
			Total	<b>1145.00</b>