Journal of the Selva Andina Animal Science
ISSN: 2311-3766
ISSN: 2311-2581
editor.animalscience@sars.org.bo
Selva Andina Research Society
Bolivia

García-Díaz, Juan Ramón; Garzón Jarrín, Rafael Alfonso; Chicaiza Sánchez, Luis Alonso; Villavicencio Villavicencio, Blanca Jeaneth

Vicugna pacos semen collection methods and review of semen parameters using Triladyl ® diluent

Journal of the Selva Andina Animal Science, vol. 11, no. 2, 2024, pp. 54-64
Selva Andina Research Society
Bolivia

DOI: https://doi.org/10.36610/j.jsaas.2024.110200054x

Complete issue
More information about this article
Journal's webpage in redalyc.org

meliCA

JOURNAL OF THE Selva Andina Animal Science
Official Journal of the Selva Andina Research Society.

Nota Técnica

ISSN 2311-3766 (print edition)
JSAAS
ISSN 2311-2581 (online edition)

Métodos de recolección del semen de *Vicugna pacos* y revisión de los parámetros seminales utilizando diluyente Triladyl®

Vicugna pacos semen collection methods and review of semen parameters using Triladyl® diluent

García-Díaz Juan Ramón[1*], Garzón Jarrín Rafael Alfonso[2], Chicaiza Sánchez Luis Alonso[2], Villavicencio Villavicencio Blanca Jeaneth[3]

Datos del Artículo

[1] Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Carretera a Camajuaní km. 5 ½. Santa Clara.
CP 54830, Santa Clara, Villa Clara.
Teléfonos +53 42281692; +53 428905.
Cuba.

[2] Universidad Técnica de Cotopaxi.
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.
Av. Simón Rodríguez s/n Barrio El Ejido Sector San Felipe.
Tel: +593- 03 2252205/2252307/2252346.
CAREN: 2266164.
Latacunga - Ecuador.

[3] Universidad Técnica de Ambato.
Facultad en Ciencias Agropecuarias.
Medicina Veterinaria.
Campus Querochaca 180601.
Cevallos, Ecuador.
villavicencio@uta.edu.ec

***Dirección de contacto**:

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Departamento de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Carretera a Camajuaní km. 5 ½. Santa Clara.
CP 54830, Santa Clara, Villa Clara,
Tel: +53 42281692; +53 428905.
Cuba.

Juan Ramón García-Díaz
E-mail address: juanramon@uclv.edu.cu

Palabras clave:

Eyaculado,
volumen,
concentración,
motilidad,
características seminales,
criopreservación.

J. Selva Andina Anim. Sci.
2024; 11(2):54-64.
ID del artículo: 137/JSAAS/2024.

Historial del artículo

Recibido febrero 2024.
Devuelto julio 2024.
Aceptado agosto 2024.
Disponible en línea, octubre 2024.

Editado por:
Selva Andina
Research Society

Resumen

Para evaluar 3 métodos de recolección del semen de *Vicugna pacos* y los parámetros seminales utilizando diluyente Triladyl®, se desarrolló esta investigación. Del 25 de abril al 9 de julio de 2023, en la Universidad Técnica de Cotopaxi, Ecuador. Se seleccionaron 9 alpacas machos y se evaluó la colección de semen, mediante maniquí completo, vagina artificial y uso de orina (A), maniquí de grupa, vagina artificial y hembra receptiva (B) y desviación de pene, vagina artificial y hembra receptiva (C), en la libido y la cópula. Se estudió el efecto del diluyente Triladyl® en las características del semen fresco y post descongelación. Se compararon la libido y aceptación del método mediante comparación múltiple de proporciones, las montas por hora con la prueba de Duncan, la cantidad de eyaculados con $\chi^2_{\text{C de Yates}}$ y las características seminales mediante t-Student para muestras pareadas. La libido y la aceptación del método no difirieron entre los métodos. Las montas por hora y el número de eyaculados fueron mayores ($P< 0.05$) en el método C. Fueron superiores ($P< 0.05$) la concentración, la motilidad en el semen fresco, la mortalidad y las morfo anomalías en el en semen post descongelación. Se concluye que el método C es el más óptimo para la colección del semen y que el empleo del diluyente Triladyl® en el protocolo de congelación disminuyó la concentración y motilidad seminal, mientras que, aumentó la mortalidad y las morfo anomalías espermáticas posterior a la descongelación.

2024. Journal of the Selva Andina Animal Science®. Bolivia. Todos los derechos reservados.

Abstract

To evaluate three methods of collecting *Vicugna pacos* semen and seminal parameters using Triladyl® extender, this research was carried out from April 25 to July 9, 2023, at the Technical University of Cotopaxi, Ecuador. 9 male alpacas were selected and the effect of semen collection was evaluated using a complete manikin, artificial vagina and urine use (A), rump manikin, artificial vagina and receptive female (B), and penile deviation, artificial vagina and receptive female (C), in libido and copulation. The effect of the Triladyl® extender on the characteristics of fresh and post-thawing semen was studied. Libido and acceptance of the method were compared by multiple comparison of proportions, mounts per hour with the Duncan test, the number of ejaculates with $\chi^2_{\text{C de Yates}}$ and semen characteristics using Student's t-test for paired samples. Libido and method acceptance did not differ between methods. The mounts per hour and the number of

Keywords:

Ejaculate,
volume,
concentration,
motility,
seminal characteristics,
cryopreservation.

ejaculates were higher (P< 0.05) in method C. Concentration and motility in fresh semen were higher (P < 0.05), and mortality and morpho anomalies in post-thawing semen were higher (P < 0.05). It is concluded that method C is the most optimal for semen collection and that the use of Triladyl® diluent in the freezing protocol decreased seminal concentration and motility, while it increased mortality and sperm morpho anomalies after thawing.

2024. Journal of the Selva Andina Animal Science®. Bolivia. All rights reserved.

Introducción

Para mejorar la genética y el desempeño bioproductivo y económico de la alpaca (*Vicugna pacos*), se emplean las biotecnologías reproductivas, que incluyen entre otras, la colección, evaluación, conservación del semen y la inseminación artificial (IA)[1].

Los métodos de colección de semen no deben afectar la libido de los machos, ni desencadenar reflejos inhibitorios que disminuyan su aceptación, además, afecten la colecta y la cantidad de eyaculados por machos. Permitan la obtención del máximo volumen de eyaculado, con absoluta pureza del material seminal[2].

Los diluyentes influyen en la calidad y fertilidad de los espermatozoides de alpaca durante la congelación y la post-descongelación, debido a que contribuyen en mantener la presión osmótica isotónica, proporcionan nutrientes para la vida de las células espermática y suministran lipoproteínas o lecitinas que protejan los espermatozoides del choque frío[3].

En Ecuador son escasos y poco concluyentes los estudios sobre los métodos de colección de semen en alpacas, por lo que se requieren de investigaciones que permitan desarrollar una técnica confiable para colectar semen que beneficien la libido y el rendimiento de los machos durante la colecta.

Además, es escasa la información científica disponible sobre los diluyentes y protocolos de congelación que se utilizan en el procesamiento y conservación del semen de alpacas en Ecuador[4], por lo que se necesitan estudios científicos sobre estos aspectos, que contribuyan a definir una metodología eficaz, para la optimización del proceso de conservación del semen en esta especie y de esta manera, desarrollar la IA y otras técnicas reproductivas.

El objetivo de este experimento fue evaluar 3 métodos de recolección del semen de *V. pacos* y los parámetros seminales utilizando diluyente Triladyl®.

Materiales y métodos

El presente trabajo de investigación se realizó entre el 25 de abril y el 9 de julio de 2023, en las instalaciones del Centro Experimental Académico Salache (CEASA) y el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción (LBR) de la carrera de Medicina Veterinaria de Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), ubicadas en la parroquia Eloy Alfaro, a 7.7 km de la ciudad de Latacunga, provincia de Cotopaxi, Ecuador.

El escenario de investigación geográficamente ese ubica entre los 16º 31’ 28” de latitud sur (LS) y 68º 20’ 39” de longitud oeste (LW), a los 3990 m.s.n.m. con temperatura promedio de 12° C, precipitaciones promedio anuales entre 500 y 1500 mm y un suelo arcilloso[5].

Se seleccionaron 9 alpacas machos (*V. pacos*), proporcionados por la UTC y las comunidades de Macas Chico y Apahua, 3 por cada una, pertenecientes a la provincia de Cotopaxi. Todos los animales eran de la raza Huacaya, con una edad comprendida entre los 3 y 7 años, con 65±3.5 kg de peso, clínicamente sanos y sin problemas reproductivos y defectos congénitos.

Su alimentación era a base de pastos naturales y agua ad libitum.

Se evaluó el efecto de los métodos de colección de semen con maniquí completo, vagina artificial (VA) y uso de orina (A), maniquí de grupa, VA y hembra receptiva (B), y desviación de pene con VA y hembra receptiva (C) sobre la libido, la aceptación del método, el número de montas y la cantidad de eyaculados. Se estudió el efecto de la inclusión del diluyente Triladyl® en el protocolo de congelación, en las características del semen fresco y pos descongelación.

La edad de los animales se evaluó mediante la inspección de su dentadura aplicando la técnica de boqueo[6,7]. Los órganos reproductivos (Figura 1) se evaluaron por los procedimientos descritos por Incahuanaco et al.[7].

Figura 1 Evaluación de aparato reproductor del macho

Entrenamiento de la alpaca macho para la monta. Se seleccionaron los machos y se mantuvieron durante 10 días en un corral dividido en 2 secciones (Figura 2). En una sección se tenía a los machos y en la otra a la hembra receptiva, se facilitó el contacto visual entre los animales de ambos sexos.

Los entrenamientos de las alpacas machos para los 3 métodos se realizaron durante 3 semanas en las instalaciones del CEASA, 3 veces por semana, en días alternos, 2 h por la mañana y 2 por la tarde.

Procedimientos para la monta. El reconocimiento del macho hacia los maniquís o la hembra receptiva, la monta y colección de semen se realizaron cada 48 h, 3 veces en una semana para cada método, la primera sesión de monta diaria se realizó entre las 6:00 y las 8:00 de la mañana y la segunda, 12 h después de la primera.

Figura 2 Separación de las alpacas hembras y machos

Previo al inicio del método A (Figura 3A), se colocó este fluido corporal para que se impregne el olor (feromonas) por 48 h. Para el método B (Figura 3B) se requirió entrenar a la hembra con el mismo protocolo descrito para los machos, para que su manejo sea lo menos estresante. Ambos métodos se ejecutaron según los procedimientos descritos por Delgado et al.[8]. Para el método C (Figura 3C) se colocó a la hembra en posición esternal y al macho en posición de copula, se verifico que el pene se encuentre dentro de la VA.

Colección de semen. El semen se colectó con la VA, según la metodología descrita por Sumar[9]. Se utilizó una VA que consta de un tubo de caucho de 21 cm de largo por 4 cm de diámetro, al que internamente se le adaptó una camisa de látex. Externamente se cubrió con una frazadilla eléctrica para mantener una temperatura de 40° C durante la colecta.

Los eyaculados se recolectaron en tubos falcón (50 mL), protegidos por una funda externa que mantuvo una temperatura de 37° C y se transportaron hasta al LBR del CEASA en menos de 1 h desde su recogida. No se procesaron las muestras contaminadas con orina.

Figura 3 Métodos utilizados para la colección del semen. A: Maniquí completo más vagina artificial y uso de orina. B: Maniquí de grupa, vagina artificial y hembra receptiva. C: Desviación de pene con vagina artificial y hembra receptiva

A B C C

Determinación de los parámetros seminales. El volumen del eyaculado se determinó por observación directa utilizando una probeta graduada. La concentración seminal se determinó mediante la cámara de Neubauer y la motilidad mediante un microscopio DM4B (Leica Microsystems AG, EE. UU), a 10X. Ambos parámetros se determinaron según los procedimientos descritos por Allauca et al.[10].

La vitalidad espermática se determinó por tinción eosina-nigrosina, los espermatozoides muertos no toman colorante y aparecen rosados, en cambio, los vivos aparecen traslúcidos[11].

La morfología espermática se evaluó mediante la observación de la tinción semen-eosina en un microscopio electrónico de barrido y el número de espermatozoides morfológicamente normales y anormales de acuerdo a las recomendaciones de Pérez et al.[12].

Diluyente utilizado. El estudio se realizó con el diluyente Triladyl® CSS One-step (Minitube International A.G., Alemania), que está basado en TRIS (Hidroxi-metil aminometano, un amortiguador sintético, además, contiene ácido cítrico, azúcares, sustancias

buffer, agua ultrapurificada y antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina). Este diluyente utilizó el glicerol como además el crio protector[13,14].

Preparación del diluyente. Se preparó el diluyente según recomendación del fabricante y se mantuvo en baño de agua a 37° C. Se adiciono 3 partes de agua destilada estéril (60 %), una parte de yema de huevo a baño maría (20 %) y una parte del concentrado comercial Triladyl® (20 %), seguidamente se centrifugó a 500 rpm.

Dilución de semen. En tubos falcón se midió el eyaculado y se mantuvo temperado en baño maría a 37º C. La dilución se realizó en una relación 1:1 de semen y de diluyente.

Congelación de semen con diluyente. Una vez mezclado el diluyente y el semen se enfrío a 5° C con una velocidad de enfriamiento de 0.4° C/min, y se mantuvo a esa temperatura por 2 h, los espermatozoides estuvieron en contacto con el glicerol. Cumplido este tiempo se envasaron las pajuelas, las que se colocaron horizontalmente en una gradilla a una distancia de 4 cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido, dentro de una caja de poliestireno o couler.

Las pajuelas se pusieron a vapores de nitrógeno líquido a -100° C durante 20 min, y posteriormente se depositaron directamente en nitrógeno líquido a -196° C. Seguidamente se depositó en el tanque criogénico.

Post descongelación del semen con diluyente. Una vez congelada la muestra se retiró la pajilla del tanque criogénico y se puso en baño maría a una temperatura de 37° C para su posterior uso en la evaluación espermática.

Procesamiento estadístico. Se obtuvieron los estadígrafos descriptivos de cada variable cuantitativa. Entre los métodos A, B y C se compararon la libido y aceptación del método mediante una comparación múltiple de proporciones, el número de montas por hora con la prueba de Duncan[15] y la cantidad de eyaculados con una prueba de χ^2 C de Yates. La concentración de espermatozoides en el eyaculado, y la motilidad, mortalidad y morfo-anomalías, entre el semen fresco sin diluyente y el post descongelado, con diluyente, mediante la prueba de t-Student para muestras pareadas. En todos los procesamientos se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurión Ver. XVII[16].

Resultados

En la Tabla 1 se puede apreciar que el 22.22 % de los machos tuvieron libido alto en cuando fueron expuestos al método A y lo aceptaron, lo que ocurrió en el 33.33 % de ellos frente los procedimientos B y C.

Tabla 1 Aspectos evaluados con los tres métodos de colección de semen en las alpacas

Método	Libido alta (%)	Aceptación del método (%)	Montas por hora, ($\bar{X}$±DE)	Eyaculados (n)
A	22.22[a]	22.22[a]	.66±.27[b]	0[a]
B	33.33[a]	33.33[a]	1.33±.27[b]	0[a]
C	33.33[a]	33.33[a]	3.00±.27[a]	3.00[a]

Letras diferentes en una misma columna indican diferencias significativas p< 0.05.
Se aplicó comparación múltiple de proporciones para la libido y aceptación del método Duncan[15] para comparar el número de montas por hora y χ^2 C de Yates para contrastar la cantidad de eyaculados.

Con el método C los machos realizaron mayor cantidad ($P< 0.05$) de montas por hora con los procedimientos A y B (Tabla 1). Con el C se obtuvieron 3 eyaculados, lo que difirió ($P< 0.05$) con el A y el B, con los que no se colectaron eyaculados (Tabla 1). El volumen de los eyaculados obtenidos fue 1.30±0.20 mL, con un coeficiente de variación de 15.38 %.

Tabla 2 Parámetros espermáticos ($\bar{x}$± DE) del semen fresco y post descongelado de las alpacas

Parámetros	Momentos	
	Fresco sin diluente	**Post descongelación, con diluyente**
Concentración, 10^6/mL.	1.80±.10[a]	1.30±.10[b]
Motilidad, %.	51.00±2.00[a]	13.00±1.00[b]
Mortalidad, %.	17.00±3.00[b]	24.33±.57[a]
Morfo anomalías, %.	29.00±2.64[b]	41.33±1.52[a]

[ab] Letras desiguales en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas para P< 0.01 (t-Student para muestras pareadas)

Tabla 3 Morfo anomalías ($\bar{x}$± DE) del semen fresco y post descongelado de las alpacas

Parámetros (%)	Momento	
	Fresco sin diluente	Post descongelación, con diluyente
Colas Curvas	9,33±.57[a]	8,33±.57[a]
Colas dobles	10.00±4.35[a]	13.33±.57[a]
Cabezas libres	4.66±1.52[a]	2.66±.60[a]
Cabezas dobles	9.00±3.60[a]	13.00±1.00[a]
Presencia de gota citoplasmática	3.66±3.05[a]	4.00±1.12[a]

La concentración y la motilidad disminuyeron ($P< 0.05$), mientras que la mortalidad y el por ciento de espermatozoides con formas anormales aumentaron ($P< 0.05$) después de la descongelación del semen (Tabla 2).

Los tipos de anomalías espermáticas no difirieron estadísticamente entre el semen fresco y post descongelación, no obstante, numéricamente, en este último se redujo el porciento de gametos masculinos con colas curvas y cabezas libres, y se aumentó el de nemaspermos con colas dobles, con cabezas dobles y con la presencia de gota citoplasmática (Tabla 3).

Discusión

La mayor aceptación de los métodos B y C, en los que los machos tuvieron una libido sexual superior, sugieren ser más viables y aceptados, que se debe al empleo de la hembra receptiva, que ayudó a incrementar la libido de los machos[8].

La obtención de semen con VA y desviación del pene tiene la ventaja que se colecta la totalidad del eyaculado, sin que se contamine con orina o agentes etiológicos que estén en la vagina de la hembra, sin la necesidad de equipos costosos y personal altamente especializados[8]. Su principal desventaja, es la necesidad de varios días de entrenamiento de los machos[6].

El orden de la aceptación de los métodos en esta investigación es similar al obtenido en llamas. Sin embargo, en esta especie los porcentajes de aceptación fueron 80 y 90 % en los procedimientos B y C, respectivamente[8]. La causa de estas diferencias puede estar motivada por las diferencias en el temperamento y fisiología reproductiva de cada especie[7].

No se obtuvieron eyaculados con los métodos A y B,

con los cuales, los machos no se acoplaron correctamente y no se adaptaron al maniquí, debido a que A tiene forma cuadrada y sus esquinas lastimaban el abdomen del macho, y en el B la grupa tuvo mucha movilidad. Además, la alpaca tiene persistencia de las adherencias del glande al prepucio en algunos animales, que imposibilitan la extrusión del pene[17]. También contribuyó que solo el 60 % de los machos respondieron bien al entrenamiento con el maniquí, dado la naturaleza nerviosa de la especie[18].

La obtención de eyaculados se asoció con el método de colección de semen utilizado (χ^2 C de Yates = 4.0548, *P*=.0440). La mayor cantidad de eyaculados con el método C se debió al empleo de la combinación de la VA con la hembra receptiva[19]. Estos autores señalaron que el empleo de VA y una hembra receptiva junto al maniquí, incrementó el tiempo de cópula de 15.9 a 16.8 min y la calidad del eyaculado obtenido con respecto al uso del maniquí solo.

El volumen de los eyaculados en este experimento es inferior al publicado en alpacas de la Raza Huacaya, de 3 a 5 años de edad, que osciló entre 1.48 a 1.91 mL[20] y que, en alpacas de esa raza, en las que se realizó la extracción seminal cada 48 h[4].

La causa de la variabilidad del volumen en este experimento y la falta de correspondencia con los trabajos publicados se debe a que sobre este parámetro influyen la raza, edad, alimentación, separación psicosexual y la frecuencia de colección[21,22]. Sin embargo, existe consenso en que este último factor es la causa de variación más importante del volumen del eyaculado en alpacas[23]

Además, las alpacas tienen bajo volumen en el eyaculado[24], que presenta variabilidad entre individuos y entre colecciones en un mismo macho[20]. La evaluación de este parámetro se dificulta por la presencia de espuma que se forma durante la colecta del semen[21].

La disminución de la concentración del semen post descongelado se debe a la adición del diluyente Triladyl®. Este y el protocolo de congelación utilizado pudieron aumentar el porcentaje de mortalidad de los espermatozoides post descongelación en este experimento y, por tanto, no cumplen eficientemente la función de preservar la supervivencia espermática posterior a la descongelación, lo constituye su criterio de evaluación principal[25].

El aumento de la mortalidad en el semen post descongelación puede deberse a los daños celulares que sufren los espermatozoides, provocados por los cambios de temperatura durante el proceso de congelación, principalmente la deshidratación de las células espermáticas y la formación de cristales de hielo intracelulares durante este proceso[26].

La disminución de la motilidad después de la descongelación del semen corrobora que aproximadamente el 50 % de espermatozoides pierden su motilidad durante la congelación y descongelación, lo que constituye un reto en el proceso de crio preservación de espermatozoides[25].

El porcentaje de morfo-anomalías en el semen fresco son inferiores a los trabajos publicados por otros autores[23,27], pero las del semen post congelación son similares a las que publicaron los investigadores mencionados. Las formas anormales en los gametos masculinos previo a la dilución podrían deberse al método de colección del semen, que causa variación de la morfometría espermática[27].

El aumento de las formas anormales en el semen post congelación, respecto a las del semen fresco puede deberse al efecto de los componentes del diluyente Triladyl® y la congelación. También a la preparación de la muestra, método de fijación, técnica de tinción, sistema microscópico y errores sugestivos en su determinación[28]. Estos factores pueden afectar la repe-

titividad del análisis, su reproducibilidad y la comparación de los resultados entre laboratorios[29]. No obstante, se requieren estudios más precisos y concluyentes sobre el efecto de la congelación en las morfo-anomalías espermáticas de las alpacas.

La concentración espermática, la motilidad y la mortalidad de los espermatozoides, y sus morfo-anomalías son menores que los obtenidos en alpacas de Perú[30]. Los resultados de este experimento confirman que las características físicas y biológicas del semen de alpacas también varían según las condiciones de colección, entre ellas, el método de colecta[31,32].

Se concluye que el método de desviación de pene con VA y hembra receptiva tuvo más aceptación, con los machos, realizaron mayor cantidad de montas por hora y se obtuvieron más eyaculados, por lo que es el más óptimo para la colección del semen. Con el empleo del diluyente Triladyl® en el protocolo de congelación disminuyeron la concentración y motilidad seminal, mientras que, aumentaron la mortalidad y las morfo anomalías espermáticas posterior a la descongelación.

Fuente de financiamiento

Esta investigación “Influencia del método de colección de semen en alpacas (*Vicugna pacos*) en la eyaculación y del diluyente Triladyl® en los parámetros seminales”, se financió con recursos propios de los investigadores.

Conflictos de intereses

Los autores declaramos no tener conflictos de intereses potenciales con respecto a la autoría y/o publicación de este artículo.

Agradecimientos

Los autores agradecemos al laboratorio de biotecnología de la Universidad técnica de Cotopaxi, Carrera de Medicina Veterinaria, en especial al director del Centro experimental Salache (CEASA) y personal que labora en el mismo.

Consideraciones éticas

Los protocolos utilizados en el estudio se ciñen a las normas europeas indicada en (https://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals//legislation_en.htm para el uso de animales en investigación.

Aporte de los autores en el artículo

*Rafael Alfonso Garzón Jarri*n: búsqueda de información, diseño del estudio**,** toma de muestras, escritura y redacción del documento. *Luis Alonso Chicaiza Sánchez:* búsqueda de información, diseño del estudio, toma de muestras, escritura y redacción del del documento. *Blanca Jeaneth Villavicencio Villavicencio,* toma de datos, escritura y redacción del documento. *Juan Ramón García Díaz*: procesamiento y análisis de datos, edición y revisión del manuscrito.

Limitaciones en la investigación

No se logran resultados concluyentes para establecer y validar uno de los métodos empleados en esta investigación para la obtención de semen en alpacas, y un diluyente y protocolo de congelación de semen, pues no se procesaron la cantidad de nuestras necesarias para ello.

Literatura citada

1. Pérez M, Bustamante C, Coronel I, Carretero MI, Manrique Y, Condori E, et al. Criopreservación de espermatozoides de llama obtenidos del conducto deferente utilizando tres curvas de congelamiento. Rev Investing Vet Perú 2022;33(6):e24099. DOI: http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v33i6.24099
2. Singh B, Mal G, Gautam SK, Mukesh M. Reproduction Biotechnology in Camelids. In: Singh B, Mal G, Gautam SK, Mukesh M, editors. Advances in Animal Biotechnology. Switzerland: Springer, Cham; 2019. p. 145-53. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-21309-1_13
3. Stuart CC, Vaughan JL, Kershaw CM, de Graaf SP, Bathgate R. Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. Sci Rep 2019;9(1):12826. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-019-49203-z
4. Garcés Cabrera JE. Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas de semen fresco de alpacas en la estación experimental Aña Moyocancha con la aplicación de oligoelementos [tesis licenciatura]. [Riobamba]: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2017 [citado 26 de octubre de 2023]. Recuperado a partir de: http://dspace.espoch.edu.ec/handle/123456789/8138
5. Datos meteorológicos de la estación meteorológica de Chalpatán, Carchi [Internet]. Instituto Nacional de Meteorología e Hidrografía. 2024 [citado 19 de enero de 2024]. Recuperado a partir de: https://www.inamhi.gob.ec/
6. García W, Alarcón V, Bravo PW. Inseminación artificial de alpacas con semen refrigerado y con inclusión de dos tipos de yema de huevo. Rev Investig Vet Perú 2017;28(2):337-44. DOI: http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13080
7. Incahuanaco LM, Ayala RD, Hinojosa RL, Torres EY, Huanca T, Nina A, et al. Eficiencia reproductiva de alpacas machos en relación al tamaño testicular y niveles hormonales durante época reproductiva en puna seca. Rev Agrop Sci & Biotech 2021;1(2):56-62. DOI: https://doi.org/10.25127/riagrop.20212.678
8. Delgado P, Flores F, Fernández R, González V, Maceda E, Copa S, et al. Técnicas de colección de semen en llamas. III Congreso mundial de camélidos. Potosí Bolivia; 2003.
9. Sumar J. Llamas y alpacas. En: Hafez ESE, Hafez B, editores. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2002. p. 224-42.
10. Allauca P, Ugarelli A, Santiani A. Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. Rev Investig Vet Perú 2019;30(1):288-98. DOI: https://doi.org /10.15381/rivep.v30i1.15677
11. Klimowicz-Bodys MD, Batkowski F, Ochrem AS, Savič MA. Comparison of assessment of pigeon sperm viability by contrast-phase microscope (eosin-nigrosin staining) and flow cytometry (SYBR-14/propidium iodide (PI) staining) [evaluation of pigeon sperm viability]. Theriogenology 2012;77 (3):628-35.DOI: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.09.001
12. Pérez MG, Zevallos J, Perez UH. Recuperación de espermatozoides de alpacas de conducto deferente durante la época reproductiva. Spermova 2014;4 (2):139-44.
13. Galarza Lucero DA. Eficacia de dos diluyentes: tris + lecitina de soya (Andromed®) y tris + yema de huevo (Triladyl ®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca-Ecuador [tesis maestría]. [Cuenca]: Universidad de

Cuenca; 2013 [citado 26 de octubre de 2023]. Recuperado a partir de: https://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/526

14. Triladyl® & Biladyl® [Internet]. Minitube. 2018 [citado 23 de noviembre de 2020]. Recuperado a partir de: https://tienda.arbiotech.com.mx/wp-content/uploads/2022/03/13500-xxxx_leaflet-bi-ladyl-triladyl_es_220107.pdf
15. Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. Biometrics 1955;11(1):1-42. DOI: https://doi.org/10.2307/3001478
16. Statgraphics Centurion XVIII [Internet]. Statgraphics.Net. 2006 [citado 5 de octubre de 2023]. Recuperado a partir de: https://statgraphics.net/
17. Oscanoa A, Leyva V, García W, Gonzáles De La Cruz R, Alarcón, V. Efecto de la testosterona exógena sobre las adherencias pene-prepuciales y la producción de fibra en Alpacas Huacaya. Rev Investig Vet Perú 2017;28(2):327-36. DOI: http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13070
18. Alarcón V, García W, Bravo PW. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. Rev Investig Vet Perú 2012;23(1):58-64. DOI: https://doi.org/10.15381/rivep.v23i1.882
19. Dávalos R, Olazábal J. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Rev Investig Vet Perú 2002;13(2):98-9. DOI: https://doi.org/10.15381/rivep.v13i2.7340
20. Trujillo Bravo J. Estudio histológico del espermatozoide de Alpacas y su correlación con las características microscópicas de calidad seminal en el fundo Ucrucancha - Cerro de Pasco [tesis licenciatura]. [Cerro de Pasco]: Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión; 2019. [citado 26 de noviembre de 2023]. Recuperado a partir de: http://repositorio.undac.edu.pe/handle/undac/1490?locale=en
21. Díaz H, Espinoza J, Huanca W, López-Torres B, Rodríguez J. Características bioquímicas del plasma seminal fresco y congelado/descongelado de alpaca (*Vicugna pacos*). Rev Investig Vet Perú 2015;26(1):43. DOI: https://doi.org/10.15381/rivep.v26i1.10911
22. Juyena NS, Vencato J, Pasini G, Vazzana I, Stelletta C. Alpaca semen quality in relation to different diets. Reprod Fertil Dev 2013;25(4):683-90. DOI: http://doi.org//10.1071/RD12050
23. Tibary A, Vaughan J. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: a review and clinical observations. Small Rumin Res 2006;61(2-3):283-98. DOI: https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.018
24. Miragaya M, Martínez Sarrasague M, Casaretto M, Rubin de Celis E, Carretero I, Giuliano S. Assessment of apparent viscosity and analysis of rheological profiles in llama ejaculates. En: 16th International Congress on Animal Reproduction (ICAR); 2008; July 13-17; Budapest. Hungry.
25. Bravo W, Alarcón V. Preservación de semen y avances recientes en la inseminación artificial de llamas y alpacas. Spermova 2013;3(2):158-60.
26. Moore AI, Squires EL, Bruemmer JE, Graham JK. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. J Equine Vet Sci 2006;26(5):215-8. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.03.003
27. Valle Zapata EM. Evaluación de dos técnicas de colección de semen en llamas (*Lama glama*) en la Estación Experimental de Choquenaira [tesis licenciatura]. [La Paz]: Universidad Mayor de San Andrés; 2013 [citado 26 de octubre de 2023]. Recuperado a partir de: https://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/4259
28. Cucho H, López Y, Caldeira C, Valverde A, Ordóñez C, Soler C. Comparison of three different

staining methods for the morphometric char-acterization of Alpaca (*Vicugna pacos*) sperm, using ISAS® CASA-Morph system. Nova Biologica Reperta 2019;6(3):284-91. DOI: https:// doi.org/10.29252/nbr.6.3.284

29. Brito LF, Greene LM, Kelleman A, Knobbe M, Turner R. Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation. Therigenology 2011;76(4):745-50. DOI: https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.04.007
30. Flores NH, Cucho H, Carretero MI, Ciprián R, Quispe C, Casa HA, et al. Dimethylformamide cryoprotectant effect on cryopreserved alpaca sperm motility (*Vicugna pacos*) evaluated by analysis system ISAS®. Spermova 2015;5(1):47-50. DOI: https://doi.org/10.18548/aspe/0002.10
31. Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. Anim Reprod Sci 2000;62(1-3):173-93. DOI: https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00158-5
32. Bravo PW, Alarcon V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, et al. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. Anim Reprod Sci 2013;136(3):157-63. DOI: https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.005

Nota del Editor:
***Journal of the Selva Andina Animal Science (JSAAS)*. Todas las afirmaciones expresadas en este artículo son únicamente de los autores y no representan necesariamente las de sus organizaciones afiliadas, o las del editor, editores y los revisores. Cualquier producto que pueda ser evaluado en este artículo, o la afirmación que pueda hacer su fabricante, no está garantizado o respaldado por el editor.**