

Criopreservación de espermatozoides de llama obtenidos del conducto deferente utilizando tres curvas de congelamiento

Cryopreservation of spermatozoa of llama obtained from the vas deferens using three freezing curves

Manuel Pérez D.¹, Carlos Bustamante Q.¹, Italo Coronel U.¹, María Ignacia Carretero², Yan Manrique Q.³, Eloy Condori C.⁴, Uri Perez G.^{1*}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de tres curvas de congelación sobre la viabilidad pos-descongelación de espermatozoides colectados del conducto deferente de llamas. Se utilizaron seis llamas machos con desviación quirúrgica de los conductos deferentes. Las muestras de los seis machos se mezclaron para su procesamiento (pools) y se diluyeron con Tris-yema de huevo. Se procedió al enfriamiento hasta los 5 °C donde se completó la dilución (dilutor con glicerol) y se mantuvo por media hora (fase de equilibrio). Las muestras en pajillas de 0.25 ml fueron sometidas a congelamiento utilizando una tasa de descenso de temperatura de -20°C/min hasta llegar a -80°C (TI), a -100 °C (TII) y a -120 °C (TIII) en 4, 5 y 6 minutos, respectivamente, para finalmente almacenarlas en nitrógeno líquido. Las muestras fueron colectadas durante tres meses (n=19 pooles). Se determinó la motilidad total (motilidad progresiva, circular, oscilatoria), viabilidad y funcionalidad de membrana luego de la colecta, en la fase de equilibrio y al descongelamiento. Se observó una disminución significativa ($p<0.05$) en todas las ca-

¹ Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

² Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias, Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Argentina

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú

⁴ Laboratorio de Anatomía Veterinaria y Granja de Animales Mayores, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Madre de Dios, Perú

* E-mail: uperez@unap.edu.pe

Recibido: 26 de marzo de 2022

Aceptado para publicación: 12 de noviembre de 2022

Publicado: 22 de diciembre de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

racterísticas espermáticas evaluadas en las muestras equilibradas respecto a las muestras luego de la colecta. Se obtuvo una correlación alta positiva entre viabilidad y motilidad total ($r^2=0.78$) y en fase de equilibrio entre funcionalidad de membrana y motilidad total ($r^2=0.881$). En las muestras descongeladas, la motilidad total y viabilidad fueron significativamente mayores en las muestras congeladas con la curva de congelamiento TIII respecto al TI ($p=0.041$ y $p=0.003$, respectivamente). No se observaron diferencias significativas en la funcionalidad de membrana entre las tres curvas de congelamiento ($p>0.27$). En conclusión, la curva de descenso de la temperatura hasta los -120 °C utilizando una tasa de -20 °C/min sería la más adecuada para criopreservar espermatozoides de llama obtenidos a partir de la desviación de los conductos deferentes.

Palabras clave: crioconservación, espermatozoide, motilidad, llama, temperatura

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of three freezing curves on the post-thaw viability of spermatozoa collected from the vas deferens of llamas. Six male llamas with surgical diversion of the vas deferens were used. The samples of the six males were mixed for processing (pools) and diluted with Tris-egg yolk. Cooling was carried out to 5 °C where the dilution was completed (dilutor with glycerol) and was maintained for 30 minutes (equilibrium phase). Samples in 0.25 ml straws were subjected to freezing using a temperature drop rate of -20 °C/min until reaching -80 °C (TI), -100 °C (TII) and -120 °C (TIII) in 4, 5 and 6 minutes, respectively, to finally store them in liquid nitrogen. The samples were collected for three months ($n=19$ pools). Total motility (progressive, circular, oscillatory motility), viability and membrane functionality were determined after collection, in the equilibrium phase and upon thawing. A significant decrease ($p<0.05$) was observed in all the sperm characteristics evaluated in the samples after the equilibrium compared to the samples after collection. A high positive correlation was obtained between viability and total motility ($r^2=0.78$) and in the equilibrium phase between membrane functionality and total motility ($r^2=0.881$). In thawed samples, total motility and viability were significantly higher in frozen samples. with the freezing curve TIII with respect to TI ($p=0.041$ and $p=0.003$, respectively). No significant differences in membrane functionality were observed between the three freezing curves ($p>0.27$). In conclusion, the temperature drop curve down to -120 °C using a rate of -20 °C/min would be the most suitable for cryopreserving llama spermatozoa obtained from the deviation of the vas deferens.

Key words: cryopreservation, llama, motility, sperm, spermatozoa, temperature

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial es una herramienta de gran importancia para el mejoramiento genético de los rebaños, siendo la colecta de semen mediante vagina artificial la técnica más utilizada en la mayoría de las especies domésticas. En camélidos sudamericanos (CSA), además de la vagina artificial, se emplean otros métodos de colecta

como la electroeyaculación, la fístula uretral y la aspiración post coital, entre otros (Giuliano *et al.*, 2008; Pacheco, 2008; Carretero *et al.*, 2017; Huanca *et al.*, 2020; Fumuso *et al.*, 2021; Garcia *et al.*, 2021). El semen colectado se caracteriza por ser filante y altamente viscoso (Casaretto *et al.*, 2012, Carretero *et al.*, 2015), lo cual dificulta la evaluación, manejo y crioconservación de las muestras (Carretero *et al.*, 2015; Kershaw *et al.*, 2017;

Fumuso *et al.*, 2019). La colecta de espermatozoides mediante la desviación del conducto deferente es una técnica interesante para aplicar en los CSA, ya que es posible obtener muestras sin filancia, facilitando su manejo y evaluación, y permitiendo una mejor homogeneización con los diluyentes, lo que podría tener un efecto beneficioso en la criopreservación (Bertuzzi *et al.*, 2020a).

El conducto deferente en los CSA es una estructura que emerge del testículo mediante el cordón espermático y que aumenta su diámetro al ingresar a la cavidad abdominal (de 2 a 3 mm) permitiendo realizar la técnica quirúrgica de desviación para la colecta de espermatozoides (Pérez *et al.*, 2006, 2014). Se dispone de varios estudios en los que se congelan espermatozoides de alpaca obtenidos a partir de la desviación de los conductos deferentes (Gómez-Quispe *et al.*, 2016; Mamani-Mango *et al.*, 2019; Aisen *et al.*, 2021), pero no existen reportes de congelamiento de espermatozoides de llama obtenidos a partir de esta técnica.

En la mayoría de los mamíferos domésticos, la crioconservación de espermatozoides consiste en la colecta de las muestras a temperatura corporal, su posterior fase de enfriamiento hasta los 5 °C, temperatura de equilibrio donde generalmente se adicionan los crioprotectores y el congelamiento que se realiza sobre vapores de nitrógeno líquido (-196 °C) (Khalil *et al.*, 2018). La eficiencia del congelamiento de espermatozoides depende de factores como la especie, dilutores, crioprotectores, y tasas de enfriamiento y de congelación y descongelación, entre otros (Castro *et al.*, 2016; Yeste, 2016; Peris-Frau *et al.*, 2020). En los CSA se han analizado el efecto de varias de estos factores, incluyendo el uso combinado de crioprotectores permeables (Aller *et al.*, 2003; Vaughan *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2013; Carretero *et al.*, 2015, Kershaw *et al.*, 2017; Stuart *et al.*, 2019; Contreras *et al.*, 2020; Flores Huarco *et al.*, 2021; Fumuso *et al.*, 2021).

En semen congelado de llama tratado con colagenasa, Carretero *et al.* (2015) compararon dos temperaturas de equilibrio (temperatura ambiente y 5 °C), en tanto que Stuart *et al.* (2019) y Tarifa *et al.* (2021) compararon tres curvas de congelamiento en semen congelado de alpaca y de llama tratado con papaína. Así mismo, Mamani-Mango *et al.* (2019) evaluaron dos curvas de descenso de temperatura (rápida y lenta) para congelar espermatozoides de alpaca obtenidos del conducto deferente. Hasta nuestro conocimiento, no se ha reportado la evaluación de curvas de congelamiento en espermatozoides de llama obtenidos por desviación de los conductos deferentes. En tal sentido, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de tres curvas de crioconservación sobre la viabilidad de espermatozoides de llama procedentes del conducto deferente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y Lugar de Estudio

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Puno-Perú, ubicada a una altitud de 3918 msnm. Se utilizaron seis llamas macho con edad promedio de 2.5 años y condición corporal promedio de 2.7 (Van Saun y Herdt, 2014). Los animales se alimentaron con base a pastos cultivados (asociaciones de gramíneas y leguminosas) con suplementación de heno de avena y agua *ad libitum*, pernoctando en corrales con cobertizo.

Colecta y Dilutor

Se realizó la desviación de los conductos deferentes mediante intervención quirúrgica en las seis llamas, según Perez *et al.* (2014). Las colectas fueron realizadas aproximadamente a los dos meses posteriores al procedimiento quirúrgico. Para obtener los espermatozoides se realizó la fricción del con-

ducto deferente hacia la salida de la fístula y la muestra (porción espermática) fue colectada con una punta de pipeta unida a una jeringa de tuberculina humedecida con el dilutor Tris (0.5 ml en un tubo de ensayo de 6 ml de capacidad) a 37 °C. Luego, las seis muestras fueron trasladadas al laboratorio y se mezclaron para evitar el efecto macho («pool» de espermatozoides de los seis machos). Se evaluó la motilidad y concentración espermática en cada pool. La colecta de los espermatozoides se realizó dos veces por semana durante tres meses, periodo en que se trabajó con 19 «pools».

La composición del dilutor fue: Tris (Trihidroximetilaminometano) 2.42 g, ácido cítrico 1.4 g, fructosa 1.0 g, glicerol 5% (Merck®, Alemania), yema de huevo 20% preparado en agua bidestilada y suplementado con 50 µg de gentamicina/ml según Anzar *et al.* (2011) con algunas modificaciones. El dilutor Tris mezclado con la yema de huevo se centrifugó a 4000 rpm por 30 min y el sobrenadante fue filtrado con papel filtro N.º 2 Whatman® para que las lipoproteínas de baja densidad (LDL: Lipoprotein density low) de la yema de huevo queden con el diluyente.

Crioconservación de Espermatozoides

Los «pools» fueron diluidos a 120×10^6 espermatozoides/ml con la Fracción A (Tris, ácido cítrico, fructosa y yema de huevo) a 37 °C; seguidamente se procedió al proceso de enfriamiento hasta los 5 °C por un lapso

de 2.5 h, donde se adicionó la Fracción B (Tris, ácido cítrico, fructosa, yema de huevo y glicerol [al 10% en esta fracción y al final de la dilución quedará a 5%]) llegando a una concentración final de 60×10^6 espermatozoides/ml. Las muestras se mantuvieron durante 30 min a 5 °C (fase de equilibrio). Las muestras fueron almacenadas en pajillas de 0.25 ml (IMV Technologies®, Francia) y congeladas en un biocongelador de semen (TK 3000 CSE, TK Technologies®, Brasil) utilizando una tasa de descenso de la temperatura de -20 °C/minuto y llegando a tres temperaturas antes de ser introducidas al nitrógeno líquido: -80 °C (TI), -100 °C (TII) y -120 °C (TIII) en 4, 5 y 6 minutos, respectivamente. El descongelamiento se realizó a 37 °C durante 45 s. El diseño experimental se presenta en la Figura 1.

Características Espermáticas

Se evaluó la motilidad, funcionalidad de membrana y viabilidad espermática luego de la colecta («pools»), y en la fase de equilibrio y en pos-descongelación.

- La motilidad se evaluó utilizando un microscopio de contraste de fase y una platina térmica (37 °C) colocando una gota de 20 µl de muestra entre porta y cubreobjetos (100x). Se evaluaron los siguientes patrones: motilidad progresiva (MP: espermatozoides que se mueven en línea recta o describiendo grandes círculos), motilidad oscilatoria (MO: espermatozoides que se mueven en su

Cuadro 1. Porcentajes de motilidad (promedio ± error estándar) a la descongelación en espermatozoides de llama obtenidos de la desviación de los conductos deferentes y sometidos a tres curvas de crioconservación (n=19)

	TI (-80 °C)	TII (-100 °C)	TIII (-120 °C)
Motilidad progresiva (%)	7.8 ± 1.3 ^a	9.6 ± 1.3 ^a	11.4 ± 1.2 ^a
Motilidad oscilatoria (%)	11.2 ± 1.1 ^a	14.4 ± 1.74 ^a	13.7 ± 0.9 ^a
Motilidad circular (%)	1.1 ± 0.5 ^a	1.5 ± 0.5 ^a	1.4 ± 0.6 ^a

^a Letras similares dentro de filas indican ausencia de diferencia significativa (p> 0.05)

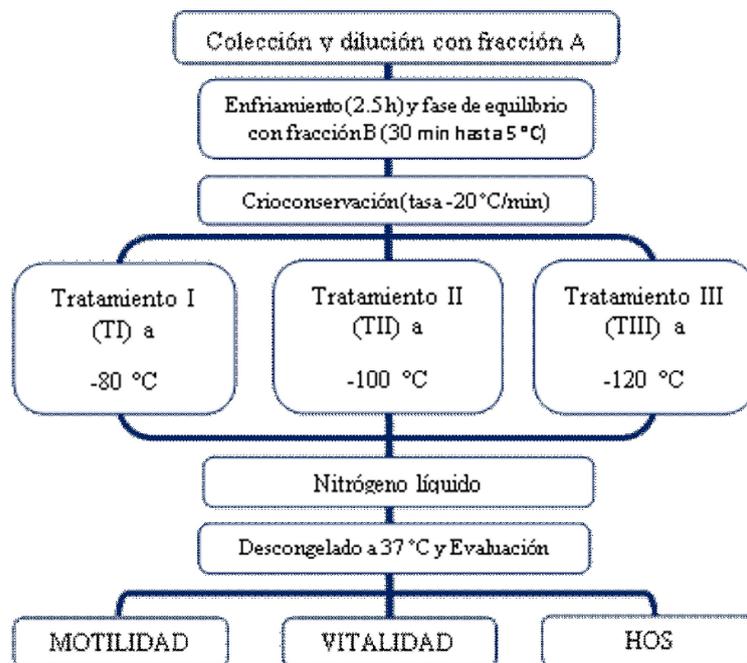


Figura 1. Diseño experimental utilizado para la criopreservación de espermatozoides de llamas obtenidos de la desviación de los conductos deferentes.

- lugar sin avanzar) y motilidad circular (MC: espermatozoides que se mueven en círculos muy cerrados), determinándose la motilidad total (MT: MP+MO+MC) (Bertuzzi *et al.*, 2022).
- La funcionalidad de membrana se evaluó mediante el test hipoosmótico (HOS-test) utilizando una solución hipoosmolar compuesta por citrato de sodio dihidratado (0.735 g) y fructosa (1.351 g) [Merck®, Alemania] csp 100 ml de agua destilada). Se contaron un mínimo de 200 espermatozoides en microscopio de contraste de fase a 400x (Flores Huarco *et al.*, 2021). Los espermatozoides que mostraron hinchazón a nivel de la cola fueron clasificados como Hos positivos teniendo la membrana plasmática funcional.
 - La vitalidad fue evaluada con eosina - nigrosina (1 g eosina, 5 g de nigrosina, csp 100 ml) colocando sobre el portaobjetos atemperado 10 µl de muestra y

20 µl del colorante y se realizando un frotis. Se contaron un mínimo de 200 células en microscopio de contraste de fase a 400x, para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos (aquellos que no se colorearon) y muertos aquellos que se colorean (Gómez-Quispe *et al.*, 2016).

Análisis Estadístico

Los análisis fueron realizados mediante el programa estadístico de R con el paquete *RCmdr* (R Core Team, 2020). Los datos fueron sometidos a la prueba de Shapiro Wilk y Levene para comprobar los supuestos de normalidad y homocedasticidad, respectivamente. Para comparar los parámetros espermáticos entre los pools (luego de la colecta) y las muestras equilibradas se utilizó un T de Student apareada. Además, se realizaron estudios de correlación entre los parámetros espermáticos utilizando la prueba de Pearson habiendo determinado el su-

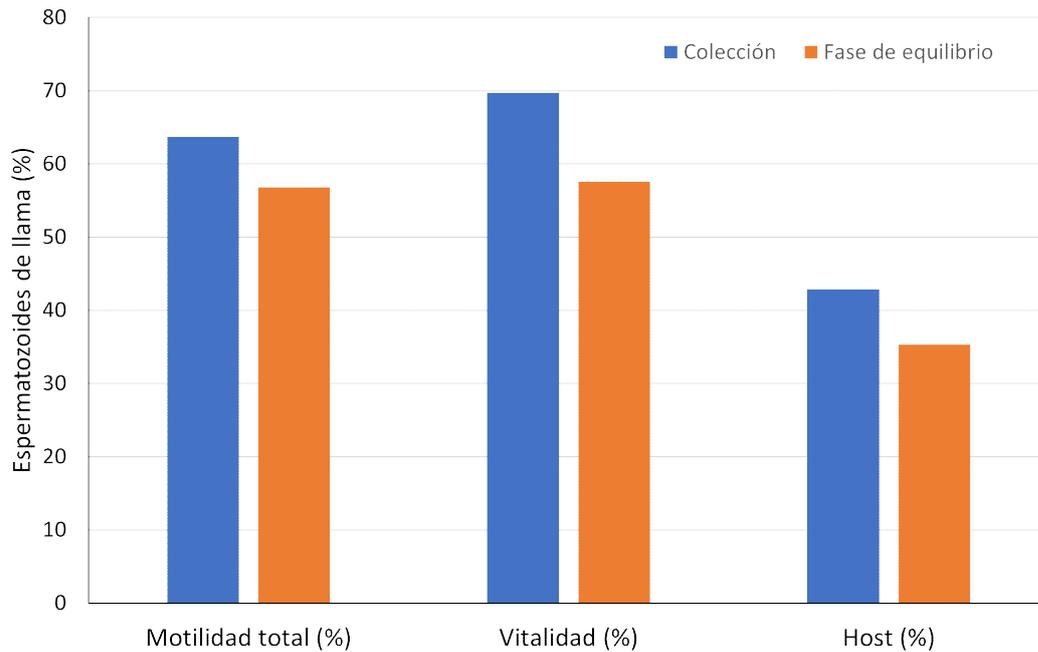


Figura 2. Porcentaje de variables espermáticas (motilidad total, viabilidad y funcionalidad de membrana) en muestras de espermatozoides luego de la colecta y de la fase de equilibrio en espermatozoides de llama obtenidos de la desviación de los conductos deferentes

puesto de normalidad de las variables. Los patrones de motilidad (MP, MO y MC) en las muestras descongeladas fueron analizados mediante una multi-análisis de varianza; mientras que, para comparar la MT, funcionalidad de membrana y viabilidad de las muestras descongeladas se utilizó un análisis de varianza «one way» con comparación de medias de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características espermáticas a la colecta y fase de equilibrio

Los resultados de las características espermáticas luego de la colecta fueron de $63.7 \pm 2.3\%$, para la MT, $42.9 \pm 3.4\%$ para la funcionalidad de membrana y $69.7 \pm 2.3\%$ para la viabilidad (promedio \pm error estándar). Se observó una correlación media positiva

entre la funcionalidad de membrana y la MT ($r^2=0.55$, $p=0.26$), una correlación alta positiva entre la viabilidad y la MT ($r^2=0.78$, $p=0.07$) y una correlación baja positiva entre la funcionalidad de membrana y la viabilidad ($r^2=0.01$, $p=0.978$).

Los valores obtenidos durante la fase de equilibrio (5°C) fueron: $56.8 \pm 2.9\%$ para MT, $35.3 \pm 1.6\%$ para funcionalidad de membrana y $57.6 \pm 1.4\%$ para la viabilidad. Se observaron correlaciones altas positivas entre la funcionalidad de membrana y la MT ($r^2=0.881$, $p=0.02$), la viabilidad y MT ($r^2=0.813$, $p=0.049$) y la funcionalidad de membrana y la viabilidad ($r^2=0.708$, $p=0.1153$). Por otro lado, se observó una disminución significativa ($p<0.05$) en las tres características espermáticas (MT, viabilidad y funcionalidad de membrana) en las muestras equilibradas respecto a las muestras luego de la colecta (Figura 2).

Cuadro 2. Porcentajes de motilidad total, funcionalidad de membrana y viabilidad a la descongelación (promedio \pm error estándar) en espermatozoides de llama obtenidos de la desviación de los conductos deferentes y sometidos a tres curvas de congelación (n=19)

	n	TI (-80 °C)	TII (-100 °C)	TIII (-120 °C)
Motilidad total (%)	34	20.1 \pm 1.7 ^a	25.5 \pm 2.0 ^{ab}	26.5 \pm 1.5 ^b
Funcionalidad de membrana (%)	37	18.7 \pm 2.2 ^a	24.0 \pm 2.6 ^a	20.2 \pm 1.7 ^a
Viabilidad (%)	34	31.2 \pm 1.3 ^a	36.4 \pm 1.7 ^{ab}	38.9 \pm 1.3 ^b

^{a,b} Letras diferentes dentro de filas indican diferencias significativas (p<0.05)

El 63.7% de MT luego de la colecta fue superior a lo reportado en espermatozoides de llama obtenidos por electroeyaculación y vagina artificial (22 a 50%) (Giuliano *et al.*, 2008; Santa Cruz *et al.*, 2016; Bertuzzi *et al.*, 2020b; Carretero *et al.*, 2020; 2021; Fumuso *et al.*, 2021). No obstante, estos valores fueron similares a lo reportado en estudios donde los espermatozoides fueron obtenidos mediante la desviación del conducto deferente (Aisen *et al.*, 2021; Bertuzzi *et al.*, 2020a; Meza *et al.*, 2018). Tanto en la colecta con electroeyaculación como con vagina artificial se obtienen espermatozoides con plasma seminal (semen) que, en los CSA se caracteriza por ser viscoso, mientras que, en muestras obtenidas de los conductos deferentes se obtienen espermatozoides sin plasma seminal, lo cual influencia los resultados de motilidad.

La funcionalidad de membrana obtenida de 42.95% fue similar al 35.6 y 40% reportado en espermatozoides de alpacas obtenidos por corte y lavado de epidídimos (Mamani-Mango *et al.*, 2019) y de 40-45% en semen de llama obtenido por electroeyaculación (Bertuzzi *et al.*, 2020b; Fumuso *et al.*, 2021), pero inferior al 71.7 y 50% reportado en muestras obtenidas del conducto deferente de alpacas (Gómez-Quispe *et al.*, 2016; Bertuzzi *et al.*, 2020a).

El 69.7% de viabilidad observada al momento de la colecta fue similar al 71.7% reportado por Mamani-Mango *et al.* (2019) en espermatozoides de epidídimo de alpaca y ligeramente inferior al 79.3% reportado en espermatozoides de alpaca obtenidos de la desviación de los conductos deferentes (Gómez-Quispe *et al.*, 2016).

Los parámetros evaluados muestran una disminución de entre 10 a 20% luego del proceso de equilibrio (5 °C) en comparación con los valores determinados al momento la colecta. Tal y como sucede en semen de otras especies, la disminución de temperatura hasta los 5 °C genera daños irreversibles en los espermatozoides como cambios de orientación de los lípidos de la membrana plasmática, pérdida de la motilidad, baja producción de energía, daños en el acrosoma y la membrana plasmática, reducción del metabolismo y pérdida de iones y de componentes intracelulares (Salamon y Maxwell, 2000; Medeiros *et al.*, 2002; Kumar *et al.*, 2003). Contrario a estos resultados, Fumuso *et al.* (2021) no observaron diferencias significativas en motilidad total ni en porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos en semen de llama de muestras equilibradas a 5 °C y semen fresco.

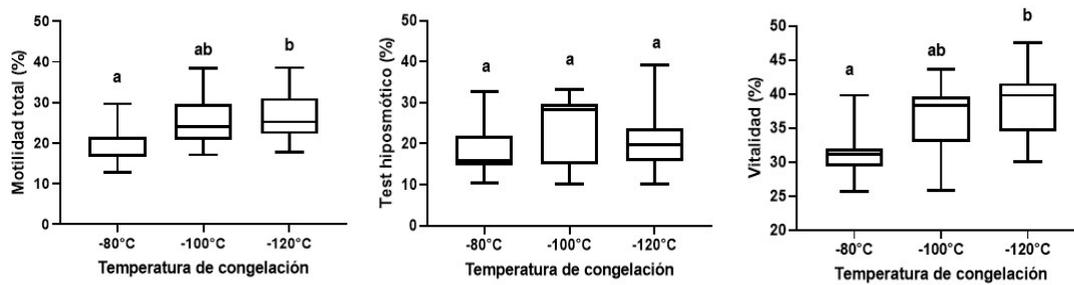


Figura 3. Comparación gráfica porcentual de la motilidad total, Host y viabilidad de espermatozoides crioconservados. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Características espermáticas a la descongelación

No se observaron diferencias significativas ($p > 0.27$) en motilidad (progresiva, oscilatoria y circular) entre las curvas de congelación de las muestras (Cuadro 1). Los porcentajes de motilidad total y viabilidad fueron significativamente mayores en las muestras congeladas con la curva de congelamiento TIII respecto a la TI ($p = 0.0416$ y $p = 0.0031$, respectivamente), en tanto que no se observaron diferencias significativas en la funcionalidad de membrana entre las tres curvas de congelamiento ($p > 0.27$) (Cuadro 2).

En las tres curvas de congelamiento se observó una caída cercana al 65% en la motilidad total de los espermatozoides. Similar descenso fue reportado en espermatozoides congelados-descongelados de llama y de alpaca (Aller *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2013; Stuart *et al.*, 2019; Fumuso *et al.*, 2020, 2021; Aisen *et al.*, 2021). Teniendo en cuenta que Santiani *et al.* (2018) reportaron que la criopreservación de espermatozoides de epidídimo de alpaca afecta la motilidad y el potencial de membrana mitocondrial, el descenso de la motilidad observado en el presente estudio podría vincularse a una disminución en la actividad mitocondrial; sin embargo, este parámetro no fue analizado en el presente estudio. Por otra parte, se observó asimismo una caída cercana al 50% en la

funcionalidad de membrana y la viabilidad, tal y como ha sido reportado en semen congelado de CSA (Aller *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2013; Carretero *et al.*, 2015; Stuart *et al.*, 2019; Fumuso *et al.*, 2020, 2021).

En la Figura 3 se muestran las diferencias en motilidad total y viabilidad por efecto de las curvas de congelación TI (-80 °C) y TIII (-120 °C), generando una mejor respuesta en TIII. La figura permite determinar mayor o menor variabilidad en los porcentajes obtenidos (tamaño de cajas y largo de los bigotes), observando una importante variabilidad en la funcionalidad de membrana al utilizar la curva TIII (-120°C) y en la viabilidad al utilizar la curva TII (-100°C).

Se tienen pocos estudios en CSA que comparen curvas de congelamiento a partir de una misma muestra de semen o espermatozoides. En semen congelado de llama tratado con colagenasa, Carretero *et al.* (2015) compararon dos temperaturas (temp. ambiente y 5 °C) para el equilibrio de las muestras con los crioprotectores encontrando mayores porcentajes de espermatozoides con sus membranas funcionales al realizar el equilibrio a 5 °C (24.2 vs. 29.3%), siendo estos valores similares a los observados en el presente estudio. Por otra parte, en semen criopreservado de alpaca tratado con papaína, Stuart *et al.* (2019) observaron mayores porcentajes de movilidad espermática al utilizar

una curva rápida (-47.8 °C/min) de congelamiento respecto a las curvas media y lenta (23.9 y 16 °C/min), siendo igualmente con valores similares a los observados en el presente estudio.

Tarifa *et al.* (2021), utilizando semen congelado de llama tratado con papaína no observaron diferencias en la viabilidad espermática (29.92, 29.98 y 29.46%) al comparar curvas de congelamiento con duración de 13, 15 y 18 minutos, respectivamente. Sin embargo, estos autores no reportan la tasa de descenso de la temperatura. Por otro lado, Mamani-Mango *et al.* (2019) congelaron espermatozoides de alpaca obtenidos de la cola del epidídimo y reportaron mejores valores de motilidad (20.9 vs 35.7%) y viabilidad (30.4 vs 40.0%) al utilizar una curva rápida de congelamiento (100-150 °C/min) respecto a una curva lenta (10-15 °C/min).

En conclusión, de los protocolos de congelamiento evaluados, la curva de descenso de la temperatura hasta los -120 °C utilizando una tasa de -20 °C/min, sería la más adecuada para criopreservar espermatozoides de llama obtenidos a partir de la desviación de los conductos deferentes. Sin embargo, sería conveniente evaluar otras curvas de descenso de la temperatura con el objetivo de mejorar la sobrevida espermática al descongelamiento de las muestras, por ejemplo, una curva rápida similar a la utilizada por Mamani-Mango *et al.* (2019).

LITERATURA CITADA

1. **Aisen EG, Huanca López W, Pérez Durand MG, Torres Mamani E, Villanueva Mori JC, Ousset MJ, Medina VH, et al. 2021.** Spermatozoa obtained from alpaca vas deferens. Effects of seminal plasma added at post-thawing. *Front Vet Sci* 8: 611301. doi: 10.3389/fvets.2021.611301
2. **Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. 2003.** Influence of cryopreservation on the motility, viability and fertility of llama (*Lama glama*) spermatozoa. *Arch Zootec* 52: 15-23.
3. **Anzar M, Kroetsch T, Boswall L. 2011.** Cryopreservation of bull semen shipped overnight and its effect on post-thaw sperm motility, plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and normal acrosomes. *Anim Reprod Sci* 126: 23-31. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.04.018
4. **Bertuzzi ML, Torres EY, Huanca T, Neild D, Carretero MI. 2020a.** Comparison of extenders with the addition of egg yolk for cooling alpaca sperm obtained from deferent ducts. *Front Vet Sci* 7: 597954. doi: 10.3389/fvets.2020.597954
5. **Bertuzzi ML, Fumuso FG, Giuliano SM, Miragaya MH, Gallelli MF, Carretero MI. 2020b.** New protocol to separate llama sperm without enzymatic treatment using Androcoll-E™. *Reprod Domes Anim* 55: 1154-1162. doi: 10.1111/rda.13755
6. **Bertuzzi ML, Fumuso FG, Neild DM, Udaquiola M, Carretero MI. 2022.** Use of commercial extenders, with and without the addition of egg yolk, for cooling llama semen. *Anim Reprod Sci* 247: 107073. doi: 10.1016/j.anireprosci.2022.107073
7. **Carretero MI, Neild D, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa C, Fumuso FG, Giuliano S. 2015.** Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on *Lama glama* sperm cryopreservation. *Andrología* 47: 685-693. doi: 10.1111/and.12319
8. **Carretero MI, Giuliano SM, Arraztoa CC, Santa Cruz RC, Fumuso FG, Neild DM. 2017.** Comparison of two cooling protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. *Andrología* 49: e12691. doi: 10.1111/and.12691

9. **Carretero MI, Arraztoa CC, Fumuso FG, Chaves MG, Santa Cruz RC, Neild DM. 2021.** Dehydration of llama sperm using different osmolarity media and temperatures for preservation. *Anim Reprod Sci* 225: 106683. doi: 10.1016/j.anireprosci.2020.106683
10. **Carretero MI, Chaves MG, Arraztoa CC, Fumuso FG, Gambarotta MC, Neild DM. 2020.** Air-drying llama sperm affects DNA integrity. *Front Vet Sci* 7: 597952. doi: 10.3389/fvets.2020.-597952
11. **Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero MI, Miragaya M. 2012.** Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia* 44: 335-341. doi: 10.1111/j.1439-0272.2011.-01186.x
12. **Castro LS, Hamilton TRS, Mendes CM, Nichi M, Barnabe VH, Visintin JA, Assumpção MEOA. 2016.** Sperm cryodamage occurs after rapid freezing phase: flow cytometry approach and antioxidant enzymes activity at different stages of cryopreservation. *J Anim Sci Biotechnol* 7: 17. doi: 10.1186/s40104-016-0076-x
13. **Contreras W, Ruiz García L, Santiani A. 2020.** Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 31: e17548. doi: 10.15381/rivep.v31i1.17548
14. **Flores Huarco NH, Giuliano SM, Fumuso FG, Miragaya MH, Cucho Dolmos HC, Carretero MI. 2021.** Use of dimethylformamide to cryopreserve alpaca semen previously incubated with collagenase. *Reprod Domest Anim* 56: 1387-1397. doi: 10.1111/rda.14003
15. **Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Carretero MI. 2019.** Evaluation of the cryoprotective effect of seminal plasma on llama (*Lama glama*) spermatozoa. *Andrologia* 51: e13270. doi: 10.1111/and.13270
16. **Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves G, Neild DM, Miragaya MH, Bertuzzi ML, Carretero MI. 2020.** Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. *Andrologia* 52(6): e13597. doi: 10.1111/and.13597
17. **Fumuso FG, Bertuzzi ML, Velásquez-González N, Miragaya M, Carretero MI. 2021.** Cryopreservation of llama semen using a combination of permeable cryoprotectants. *Reprod Dom Anim* 56: 958-964. doi: 10.1111/rda.13937
18. **García W, Maxi E, Macedo V, Ampuero E, Malaga J. 2021.** Cryopreservation of alpaca spermatozoa obtained via post copula in a tris extender with egg yolk from three avian species. *Spermova* 11: 11-16. doi: 10.18548/aspect/0009.02
19. **Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2008.** Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 104: 359-369. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2007.02.016
20. **Gómez-Quispe OE, Pérez MG, Ojeda-Gutierrez YG 2016.** Survival to freezing of sperm collected by vas deferens from *Vicugna pacos* with tempol antioxidant addition. *Asian J Anim Vet Adv* 11: 377-382. doi: 10.3923/ajava.2016.377.382
21. **Huanca N, Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H. 2020.** Sperm DNA fragmentation index of alpaca (*Vicugna pacos*) using the sperm chromatin dispersion test. *Rev Inv Vet Perú* 31; e19025. doi: 10.15381/RIVEP.V31I4.19025
22. **Khalil WA, El-Harairy MA, Zeidan AEB, Hassan MAE, Mohey-Elsaeed O. 2018.** Evaluation of bull spermatozoa during and after cryopreservation: Structural and ultrastructural insights. *Int J Vet Sci Med* 6(Suppl): S49-S56. doi: 10.1016/j.ijvsm.2017.11.001
23. **Kershaw CM, Evans G, Rodney R, Maxwell WM. 2017.** Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm

- function and improve post-thaw motility rates. *Reprod Fertil Dev* 29: 1107-1114. doi: 10.1071/RD15261
24. **Kumar S, Millar JD, Watson PF. 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: 246-253. doi: 10.1016/S0011-2240(03)00040-3
 25. **Mamani-Mango G, Gonzales MM, Hidalgo MR, Mallma JM, Béjar JR, Palma VR, Salas EM. 2019.** Effect of extender and freezing rate on quality parameters and *in vitro* fertilization capacity of alpaca spermatozoa recovered from cauda epididymis. *Biopreserv Biobank* 17: 39-45. doi: 10.1089/bio.2018.0021
 26. **Medeiros C, Forell F, Oliveira A, Rodrigues J. 2002.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344. doi: 10.1016/S0093-691X(01)00674-4
 27. **Meza A, Caldeira C, Valverde A, Ordóñez C, Ampuero E, Cucho H, Soler C. 2018.** Sperm kinematic characterization of alpaca (*Vicugna pacos* L) during the reproductive season. *Reprod Domest Anim* 53: 1415-1423. doi: 10.1111/rda.13284
 28. **Pacheco J. 2008.** Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. *REDVET* 9(5). [Internet]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050508.html>
 29. **Pérez MG, Apaza E, Deza H. 2006.** Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos. *Allpaca* 11(1): 17-23.
 30. **Perez MG, Zevallos J, Perez UH. 2014.** Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. *Spermova* 4: 139-144.
 31. **Peris-Frau P, Soler AJ, Iniesta-Cuerda M, Martín-Maestro A, Sánchez-Ajofrín I, Medina-Chávez DA, Fernández-Santos MR, et al. 2020.** Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int J Mol Sci* 21: 2781. doi: 10.3390/ijms21082781
 32. **R Core Team. 2020.** R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
 33. **Salamon S, Maxwell WMC. 2000.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62: 77-111. doi: 10.1016/S0378-4320(00)-00155-X
 34. **Santa Cruz R, Giuliano SM, Gambarotta MC, Morrell JM, Abraham MC, Miragaya MH, Carretero MI. 2016.** Comparison of different methods of sperm selection of llama raw semen. *Anim Reprod Sci* 173: 8-12. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.001
 35. **Santiani A, Evangelista Vargas S, Valdivia Cuya M, Risopatrón González J, Sánchez GR. 2013.** Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 79: 842-846. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.12.012
 36. **Santiani A, Ugarelli A, Allauca P, Juárez J, Evangelista-Vargas S. 2018.** Imaging flow cytometry assessment of viability and mitochondrial membrane potential during cryopreservation of alpaca spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 194: e12. doi: 10.1016/j.anireprosci.2018.-04.029
 37. **Stuart CC, Vaughan JL, Kershaw CM, de Graaf SP, Bathgate R. 2019.** Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Scientific Reports*, 9, 12826
 38. **Tarifa N, Meza A, Ampuero E, Ordóñez C, Becerra J, Huayllani F, Cutire U, Kuaquirá R, Cucho H. 2021.** Evaluación de tres protocolos de criopreservación sobre la vitalidad e integridad acrosomal de espermatozoide de llama (*Lama glama*). *Invet* 23(2): 58.

- 39. Van Saun R, Herdt T. 2014.** Nutricional Assesment. In Elsevier (Ed.), *Llama and Alpaca Care: Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health* (First Edit, p. 113).
- 40. Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. 2003.** Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation 03/104.
- 41. Yeste M. 2016.** Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology* 85: 47-64. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.047