



Evaluación de dos concentraciones de glicerol y dimetilformamida en la criopreservación de semen de llama (*Lama glama*)

Salas Champi, F.; Ampuero, E. ; Ordóñez, C. ; Meza, A. ; Cucho, H. *

Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas del Centro Experimental La Raya, Escuela Profesional de Zootecnia, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), Apartado postal 921 Cusco, Perú. hernan.cucho@unsaac.edu.pe

Resumen

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de dos concentraciones de glicerol (5 y 7%) y de dimetilformamida (DMF; 7 y 9%) en la criopreservación del semen de llama colectado por electroeyaculación (EE). Se colectaron 16 eyaculados de 8 llamas machos adultos de 4 a 7 años de edad. Las muestras seminales fueron incubadas con papaína por 20 minutos para reducir la filancia, luego de inhibir la acción de la enzima se evaluaron en fresco. Posteriormente las muestras se diluyeron en un medio base Tris y se enfriaron gradualmente hasta 5 °C durante 2,5 horas. Se dividieron en cuatro alícuotas para la adición de los crioprotectores, se evaluaron en la etapa de refrigeración y empajuelado. La congelación se efectuó en 25 minutos, y las pajuelas fueron almacenadas por 7 días antes de su descongelación. El análisis espermático se realizó mediante un sistema CASA-Mot (ISAS®), determinando movilidad total (MT), parámetros cinemáticos de movilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y con integridad acrosomal en semen fresco incubado con papaína, y en las muestras refrigeradas y descongeladas. El análisis estadístico se realizó con un diseño de bloques completos al azar, utilizando la prueba de Tukey para la comparación de medias ($p<0,05$). Los resultados mostraron que la MT, la viabilidad espermática y la integridad acrosomal fueron significativamente superiores ($p<0,05$) en el semen fresco respecto a las muestras con glicerol y DMF en las etapas de refrigeración y luego del descongelado. Asimismo, la velocidad curvilinear y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza presentaron valores mayores en el semen fresco y en las muestras con glicerol (5% y 7%) en la etapa de refrigeración. En conclusión, ninguno de los niveles evaluados de glicerol ni DMF logró preservar adecuadamente los parámetros microscópicos espermáticos tras la criopreservación.

Palabras clave: Llama, semen, criopreservación, glicerol, dimetilformamida.

Comparison between glycerol and dimethylformamide in the cryopreservation of llama semen (*Lama glama*)

Abstract. The objective of this study was to evaluate the effect of two concentrations of glycerol (5% and 7%) and dimethylformamide (DMF; 7% and 9%) on the successful cryopreservation of llama semen collected by electroejaculation (EE). Sixteen ejaculates were obtained from eight adult males (4-7 years old). Semen samples were incubated with papain for 20 min to reduce viscosity, and the enzymatic action was subsequently inhibited before fresh evaluation. Samples were diluted in a Tris-based medium and gradually cooled to 5 °C over 2.5 h. They were then divided into four aliquots for cryoprotectant addition, evaluated during the cooling phase, packaged in straws, frozen within 25 min, and stored for 7 days prior to thawing. Sperm analysis was performed using a CASA-Mot system (ISAS®), assessing total motility (TM), kinematic parameters, sperm viability, and acrosomal integrity in fresh (papain-incubated), cooled, and thawed samples. Data was analyzed using a randomized complete block design, with mean comparisons performed by Tukey's test ($p<0.05$). Results showed that TM, viability, and acrosomal integrity were significantly higher ($p<0.05$) in fresh semen compared to samples treated with glycerol or DMF during the cooling and post-thaw stages. Moreover, curvilinear velocity and amplitude of lateral head displacement were higher in fresh semen and in samples treated with 5% and 7% glycerol during cooling. In conclusion, none of the evaluated concentrations of glycerol or DMF effectively preserved sperm parameters after cryopreservation.

Key words: Llama, semen, cryopreservation, glycerol, dimethylformamide.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial y la conservación del semen son procedimientos importantes para la expansión mundial de las industrias bovina y porcina; pero en camélidos aún no se han desarrollado por completo y no se aplican comercialmente de forma rutinaria (Bashawat et al. 2021), debido a las características únicas del semen de estas especies (Stuart et al. 2019).

La viscosidad elevada y la filancia de los eyaculados de los camélidos, que dificultan la interacción entre el crioprotector y la membrana espermática (Kershaw-Young et al. 2013), son probablemente los mayores impedimentos para desarrollar protocolos de criopreservación de semen en estas especies (Crichton et al. 2015). Dentro de los crioprotectores permeables, el glicerol y dimetilformamida (DMF), son los más usados en la criopreservación de semen de diferentes especies (Alvarez et al. 2020); y también los son en alpacas y llamas.

El glicerol ha demostrado buenos resultados en diversas especies; sin embargo, también se ha reportado que puede inducir toxicidad celular (Oliveira et al. 2013) y alterar las propiedades fisicoquímicas del medio, lo cual puede comprometer la integridad de la membrana plasmática (Curry 2000). En camélidos sudamericanos, se han evaluado concentraciones de glicerol entre 2% y 12% (Morton et al. 2010, Carretero et al. 2015a, Stuart et al. 2019, Tarifa et al. 2021, Fumuso et al. 2021, Huayllani 2022).

Por su parte, la dimetilformamida (DMF), una amida con propiedades crioprotectoras, ha mostrado un efecto más favorable sobre la movilidad espermática y la funcionalidad de la membrana plasmática, en comparación con el glicerol, sin afectar negativamente la integridad del ADN espermático (Carretero et al. 2015a). En alpacas y llamas se han evaluado concentraciones de DMF entre 1% y 9% (Ciprian 2019, Contreras et al. 2020, Flores Huarco et al. 2021, Ccalta Hancco et al. 2022).

A pesar del uso de estos crioprotectores, los estudios reportan que los parámetros microscópicos post-descongelación, tales como la movilidad, viabilidad espermática, integridad acrosomal y funcionalidad de membrana, son significativamente inferiores a los observados en semen fresco (Ciprian 2019, Contreras et al. 2020, Flores Huarco et al. 2021). Esto sugiere una alta susceptibilidad de los espermatozoides de camélidos sudamericanos al proceso de congelación. Además, se ha planteado que el menor tamaño de las cabezas espermáticas en alpacas y llamas, en comparación con especies como bovinos u ovinos (Buendía et al. 2002, Soler et al. 2014), podría requerir la aplicación de protocolos de congelación más rápidos (Stuart et al. 2019).

Actualmente, las tasas de fertilidad reportadas con semen criopreservado en camélidos sudamericanos oscilan entre 0% y 33,3% (Fumuso et al. 2018a, Contreras Huamani et al. 2024), lo cual limita el desarrollo y la implementación comercial de la inseminación artificial en estas especies (Stuart et al. 2019). En este contexto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de dos concentraciones de glicerol (5% y 7%) y de dimetilformamida (7% y 9%) en la criopreservación del semen de llama, recolectado mediante electroeyaculación,

previamente tratado con papaína para reducir su filancia, y sometido a un protocolo de congelación rápida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Del lugar de estudio y los animales. El estudio se llevó a cabo en el Centro Experimental La Raya (14°28' S; 71°02' W), ubicado en el distrito de Maranganí, provincia de Canchis, departamento del Cusco, Perú. Esta unidad experimental se encuentra a una altitud de 4130 metros. La fase experimental se desarrolló entre los meses de enero y marzo del año 2020.

Se utilizaron ocho ($n = 8$) llamas macho (*Lama glama*) de fertilidad comprobada, con edades comprendidas entre 4 y 7 años, y un peso corporal promedio de $129,25 \pm 10,86$ kg. Todos los individuos se encontraban clínicamente sanos y no presentaban anomalías reproductivas al momento del estudio. Los animales fueron mantenidos en pastoreo continuo sobre praderas naturales, compuestas principalmente por especies pertenecientes a los géneros *Stipa*, *Festuca*, *Muhlenbergia* y *Calamagrostis*.

Colección y dilución de las células espermáticas. La recolección de semen se realizó mediante la técnica de electroeyaculación (EE), siguiendo el protocolo descrito por Director et al. (2007). Cada animal fue sometido a dos sesiones de colecta, con un intervalo de una semana entre cada una, totalizando 16 eyaculados. Para garantizar el bienestar animal y facilitar el procedimiento, se utilizó anestesia general mediante la administración de una combinación de xilacina (Dormi-Xyl® 2) y ketamina (Ket-A-100®), en dosis de 0,3 y 2,8 mL por 100 kg de peso vivo, respectivamente. Los eyaculados fueron recolectados en tubos Falcon de 15 mL estériles y mantenidos a temperatura de 37 °C hasta su procesamiento.

Tratamiento del semen. Los eyaculados fueron mantenidos a 37 °C en un baño seco hasta su selección y procesamiento. Se determinó que el criterio de exclusión de eyaculados fuera de muestras que presentaran una concentración espermática inferior a 40×10^6 espermatozoides mL⁻¹, contaminación con orina o que correspondieran a eyaculados parciales.

Los eyaculados fueron diluidos con papaína (Sigma Aldrich®) disuelta en Tris (0,1 mg mL⁻¹ de papaína en Tris) en una proporción de 1:1, incubados a 37 °C durante 20 minutos. El medio Tris fue preparado según Souza (2009) con Tris (hidroximetil) aminometano 0,3028 g, ácido cítrico 0,17 g, y fructosa 0,125 g. Posteriormente, se adicionaron 20 µL del inhibidor de papaína E-64 (Sigma-Aldrich®) por cada mililitro de mezcla semen–papaína. Esta solución fue incubada durante 5 minutos adicionales a 37 °C, de acuerdo con el protocolo propuesto por Crichton et al. (2015).

Análisis del semen. Previo al tratamiento con papaína, las muestras de semen fueron sometidas a una evaluación básica que incluyó volumen, filancia y concentración espermática. El volumen fue determinado mediante medición directa en tubos Falcon de 15 mL graduados. La filancia, entendida como la capacidad del semen para formar un hilo de extensión variable (Giuliano 2012), fue evaluada

utilizando una regla milimetrada, midiendo la longitud del hilo. La concentración espermática (expresada en millones de espermatozoides mL^{-1}) fue determinada utilizando una cámara de conteo Spermtrack® (Proiser R+D, S.L., Paterna, España), depositando 3 μL de semen en la cámara.

Posterior al tratamiento con papaína, se evaluó la movilidad total y los parámetros cinemáticos de movilidad espermática mediante un sistema computarizado de análisis de semen (ISAS®; Proiser R+D, Paterna, España). Para ello, se utilizó una alícuota de 5 μL de muestra, analizada con un microscopio de contraste de fase UOP-UB200i, equipado con un objetivo de contraste de fase negativo de 10 \times . La adquisición de imágenes se realizó con una videocámara digital (Ximea MQ003MG-CM; Münster, Alemania), analizándose a 25 cuadros por segundo.

La movilidad total (MT; %) fue definida como el porcentaje de espermatozoides móviles dentro de la muestra analizada. Los parámetros cinemáticos de movilidad determinados fueron: velocidad curvilínea (VCL; $\mu\text{m s}^{-1}$), que es la velocidad de la cabeza del espermatozoide a lo largo de la trayectoria curvilínea; velocidad rectilínea (VSL; $\mu\text{m s}^{-1}$), que es la velocidad entre el punto inicial y final de la trayectoria del espermatozoide; velocidad promedio (VAP; $\mu\text{m s}^{-1}$), que es la velocidad de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria media (Amann y Waberski 2014). Los índices de rectitud (STR = (VSL/VAP) \times 100), linealidad (LIN = (VSL/VCL) \times 100) y oscilación (WOB = (VAP/VCL) \times 100), sirven para caracterizar la calidad del movimiento espermático y son adimensionales (Mortimer 2000, Meza et al. 2018). La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μm), se define como la desviación de la trayectoria curvilínea respecto de la media; la frecuencia de batido de la cola (BCF, Hz), expresa el número de movimientos oscilatorios laterales de la cabeza del espermatozoide alrededor de la trayectoria media (Amann y Waberski 2014).

El porcentaje de espermatozoides vivos se calculó empleando 3 μL de semen tratado con papaína, mezclado con la misma cantidad de eosina y nigrosina (Minitube®, Alemania). La integridad acrosomal se evaluó con azul de Coomasie (Sigma-Aldrich®), según lo descrito por Fumuso et al. (2014), que permite evaluar la presencia/ausencia de acrosoma. La viabilidad e integridad acrosomal se evaluaron en el microscopio antes descrito a 400x, y contando más de 200 espermatozoides por muestra en cada técnica.

Criopreservación de semen. Las muestras de semen incubadas con papaína fueron diluidas hasta una concentración de 20×10^6 espermatozoides mL^{-1} utilizando la fracción A del diluyente (base Tris, yema de huevo y agua bidestilada) a 37 °C, la proporción de yema de huevo empleada fue de 25%. Posteriormente, las muestras fueron enfriadas gradualmente hasta alcanzar los 5 °C en un período de 2,5 horas. Luego se dividieron en cuatro alícuotas para la adición directa de los crioprotectores: glicerol al 5% y 7%, y dimetilformamida al 7% y 9%. Estas alícuotas fueron mantenidas en equilibrio durante 10 minutos a 5 °C, y luego se evaluaron en la fase de refrigeración como se describió previamente (movilidad total, parámetros cinemáticos de movilidad, porcentaje de

espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides con integridad acrosomal, tras lo cual fueron cargadas en pajuelas de 0,5 mL (IMV Technologies®; Francia).

Para el proceso de congelación, se vertió nitrógeno líquido en una caja de poliestireno expandido (35 x 17 x 13 cm, medidas internas) hasta alcanzar una altura de 3 cm. En esta caja, se realizó el descenso de temperatura mediante los vapores de nitrógeno, colocando las pajuelas sobre una gradilla a 5 cm de la superficie del nitrógeno durante 15 minutos. Después de este enfriamiento, las pajuelas fueron sumergidas en nitrógeno líquido a -196 °C durante 10 minutos. El descongelamiento de las pajuelas se realizó después de 7 días de almacenadas en términos de nitrógeno líquido, sumergiendo las pajuelas en un baño de agua a 37 °C durante 30 segundos, manteniendo las muestras a esta temperatura para su posterior evaluación. El diseño experimental utilizado en este estudio se presenta en la Figura 1.

Análisis estadístico. Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos y la prueba de Levene para verificar la homogeneidad de las varianzas en las siguientes variables: movilidad total, parámetros cinemáticos de movilidad (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF), porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides con integridad acrosomal. Todas las variables mostraron homocedasticidad. Sin embargo, las variables ALH, BCF y VAP no presentaron una distribución normal y fueron transformadas a su raíz cuadrada para cumplir con los supuestos de normalidad. Posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando un diseño de bloques al azar. La comparación de medias se efectuó mediante el test de Tukey ($\alpha = 0,05$). Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Statistical Analysis System (SAS) versión 9.4.

Consideraciones éticas del trabajo experimental. Los autores declaran que el presente estudio fue realizado conforme a las normas éticas de cuidado y bienestar animal, de acuerdo con lo establecido en la Resolución N° D-1714-2025-FAZ, aprobada por la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú.

RESULTADOS

Colección y evaluación del semen. La duración promedio de la colecta de semen fue de $13,5 \pm 3,31$ minutos (media \pm desvío estándar). El volumen de los eyaculados fue de $3,69 \pm 0,75$ mL (media \pm desvío estándar), con un rango de 2 a 5 mL. La filancia fue de $3,53 \pm 0,54$ cm (media \pm desvío estándar), la cual desapareció luego del tratamiento con papaína, y la concentración espermática fue de $72,92 \times 10^6 \pm 35,33 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} (media \pm desvío estándar).

Movilidad espermática. Los porcentajes de movilidad total (MT) en el semen fresco incubado con papaína ($43,28 \pm 15,15\%$) fueron mayores ($p < 0,05$) a los encontrados en los tratamientos con glicerol y DMF tanto en las etapas de refrigerado y descongelado (Tabla 1).

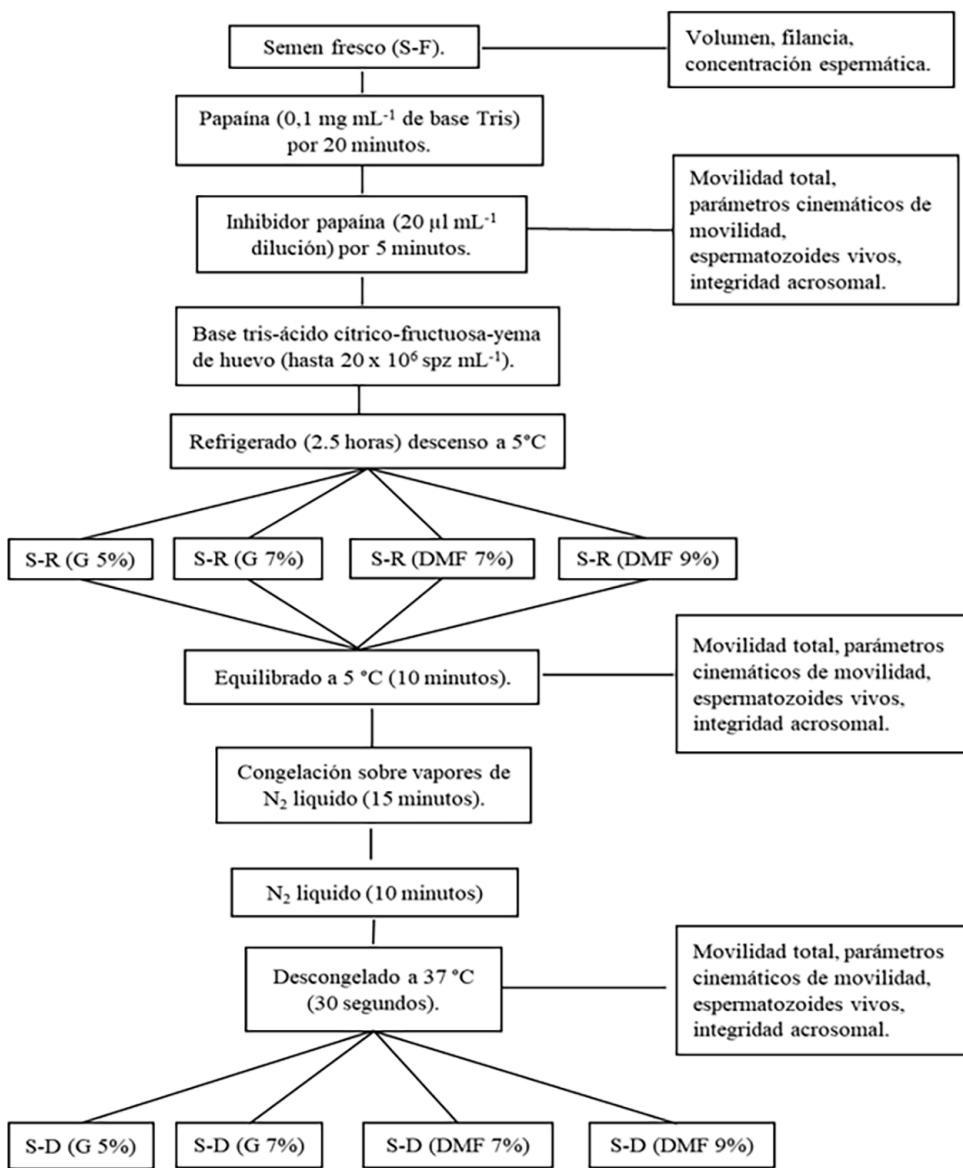


Figura 1. Diagrama que ilustra el diseño experimental utilizado para la criopreservación de semen de llama utilizando glicerol y DMF. S-F: muestra de semen fresco; S-R: muestra de semen refrigerado; S-D: muestra de semen descongelado; G: glicerol; DMF: dimetilformamida.

Tabla 1. Movilidad total y parámetros cinemáticos de movilidad (media ± DS) en espermatozoides de semen fresco de llama incubado con papaina, en muestras refrigeradas y descongeladas (n = 16 eyaculados).

Variable	Fresco con papaína	Refrigerado				Descongelado			
		Glicerol 5%	Glicerol 7%	DMF 7%	DMF 9%	Glicerol 5%	Glicerol 7%	DMF 7%	DMF 9%
MT (%)	43,28 ^a ± 15,15	20,76 ^b ± 13,06	20,00 ^b ± 11,96	12,35 ^{bc} ± 6,39	14,34 ^{bc} ± 7,79	10,01 ^c ± 5,34	11,54 ^c ± 7,41	8,28 ^c ± 2,50	7,66 ^c ± 4,05
VCL (µm s⁻¹)	55,37 ^a ± 16,53	47,56 ^a ± 14,32	48,29 ^a ± 12,50	35,54 ^b ± 7,52	33,88 ^b ± 7,68	34,68 ^b ± 6,43	32,82 ^b ± 4,91	32,22 ^b ± 4,59	32,10 ^b ± 4,49
VSL (µm s⁻¹)	12,38 ^{ab} ± 3,23	13,46 ^a ± 2,81	12,75 ^{ab} ± 2,36	10,65 ^{bc} ± 1,34	10,63 ^{bc} ± 1,31	10,54 ^{cd} ± 1,36	10,72 ^{bc} ± 1,24	10,79 ^{bc} ± 1,88	10,00 ^d ± 1,18
VAP (µm s⁻¹)	25,99 ^a ± 5,33	26,76 ^a ± 6,02	26,21 ^a ± 5,29	21,74 ^b ± 4,26	21,07 ^b ± 4,28	20,45 ^b ± 2,99	19,98 ^b ± 2,06	20,09 ^b ± 3,05	19,31 ^b ± 2,29
LIN (%)	48,60 ^b ± 7,47	53,93 ^{ab} ± 9,67	51,64 ^{ab} ± 6,18	53,04 ^{ab} ± 7,34	54,61 ^{ab} ± 7,16	55,98 ^a ± 6,34	58,23 ^a ± 3,99	57,66 ^a ± 5,76	55,77 ^a ± 6,59
STR (%)	26,96 ^c ± 7,05	35,52 ^{ab} ± 10,98	32,57 ^{bc} ± 6,53	36,40 ^{ab} ± 6,41	37,86 ^{ab} ± 7,09	37,89 ^{ab} ± 5,88	40,87 ^a ± 5,50	40,69 ^a ± 5,42	39,36 ^{ab} ± 5,38
WOB (%)	51,81 ^c ± 7,04	62,14 ^{ab} ± 8,05	60,09 ^b ± 6,45	65,69 ^{ab} ± 5,02	66,12 ^{ab} ± 4,41	64,51 ^{ab} ± 4,22	66,64 ^a ± 6,71	67,05 ^a ± 4,26	66,19 ^{ab} ± 5,37
ALH (µm)	3,01 ^a ± 0,68	2,78 ^a ± 0,64	2,74 ^a ± 0,56	2,11 ^b ± 0,32	2,04 ^b ± 0,31	2,16 ^b ± 0,29	2,01 ^b ± 0,24	1,98 ^b ± 0,22	1,98 ^b ± 0,23
BCF (Hz)	4,44 ^a ± 1,36	3,68 ^a ± 1,17	3,46 ^{bc} ± 1,01	2,96 ^{bc} ± 1,09	2,74 ^{bc} ± 1,13	2,41 ^d ± 0,60	2,54 ^{cd} ± 0,53	2,29 ^d ± 0,57	2,34 ^d ± 0,83

DS: desviación estándar; MT: movilidad total; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea; VAP: velocidad promedio; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de batido de la cola. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) entre las diferentes columnas para cada variable.

A su vez se observó un descenso de la MT en todas las muestras descongeladas respecto a las refrigeradas con glicerol (Tabla 1). El descenso en la movilidad espermática total fue más pronunciado en los tratamientos que utilizaron dimetilformamida (DMF) en comparación con aquellos en los que se empleó glicerol. Este patrón se observó tanto en la etapa de refrigeración como en la de descongelación, aunque no se observaron diferencias significativas entre los diferentes crioprotectores tanto en la etapa de refrigeración como de descongelación. En las muestras congeladas los porcentajes de movilidad espermática oscilaron entre 7,66% y 11,54%, lo que representó aproximadamente una quinta parte de los valores observados en el semen fresco (Tabla 1).

Los parámetros cinemáticos de movilidad (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF) se presentan también en la Tabla 1. Se observó que los valores de VCL, VAP y ALH del semen fresco incubado con papaína y de las muestras refrigeradas con glicerol al 5% y 7% fueron significativamente superiores ($p<0,05$) a los obtenidos en las muestras refrigeradas con dimetilformamida (DMF), así como en todos los tratamientos de semen descongelado.

Los índices de linealidad (LIN), rectitud (STR) y oscilación (WOB) mostraron un comportamiento similar en los tratamientos con dimetilformamida (DMF) y glicerol, tanto en semen refrigerado como en semen descongelado. En ambos casos, estos tratamientos presentaron valores

significativamente mayores ($p<0,05$) en comparación con los observados en semen fresco incubado con papaína.

La frecuencia de batido de la cola (BCF) fue significativamente más alta ($p<0,05$) en el semen fresco incubado con papaína y en las muestras refrigeradas con glicerol al 5%, en comparación a las muestras refrigeradas con glicerol al 7% y dimetilformamida (7% y 9%) y a todas las muestras descongeladas.

Espermatozoides vivos y con integridad acrosomal.

En la Figura 2 se presenta el porcentaje de espermatozoides vivos, el cual fue significativamente mayor ($p<0,05$) en el semen fresco incubado con papaína ($68,44 \pm 4,56\%$) en comparación con las muestras refrigeradas y las muestras congeladas con glicerol y DMF. En el semen refrigerado, el porcentaje de espermatozoides vivos fluctuó entre 55,28% y 59,31%, mientras que, en el semen descongelado, los valores oscilaron entre 33,20% y 37,23%. En ambos casos, los valores más bajos corresponden al tratamiento con 7% de DMF, y los valores más altos al tratamiento con 5% de glicerol. Además, se observa en la Figura que los tratamientos en la etapa de refrigerado difieren significativamente de aquellos en la etapa de descongelado. Cabe destacar que las muestras congeladas con glicerol al 5% mostraron porcentajes de espermatozoides vivos significativamente mayores al resto de las muestras congeladas (glicerol 7%, DMF 7% y DMF 9%).

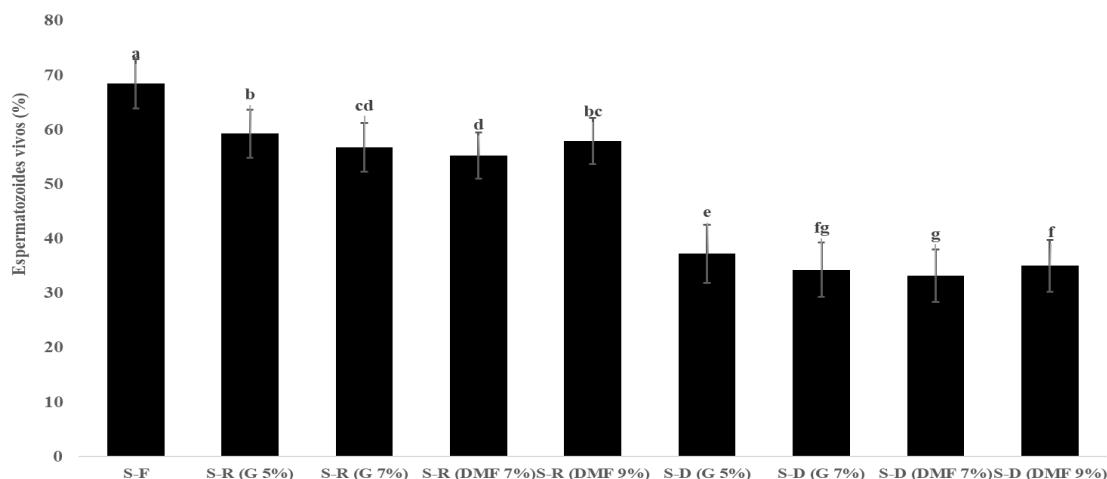


Figura 2. Porcentaje de espermatozoides vivos observados en muestras de semen fresco incubado con papaína, refrigerado con glicerol (5 y 7%), refrigerado con DMF (7 y 9%), descongelado con glicerol (5 y 7%), descongelado con DMF (7 y 9%). S-F: muestra semen fresco incubado con papaína; S-R: muestra semen refrigerado; S-D: muestra semen descongelado; G: glicerol; DMF: dimetilformamida. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las diferentes muestras evaluadas ($p<0,05$).

En la Figura 3, se presenta el porcentaje de espermatozoides con integridad acrosomal. Al igual que en las demás variables, los espermatozoides evaluados en el semen fresco incubado con papaína mostraron valores significativamente superiores ($77,31 \pm 6,13\%$; $p<0,05$) en comparación con las muestras refrigeradas y las descongeladas con glicerol y DMF. En el semen refrigerado, el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto

osciló entre 69,11% en el tratamiento con 7% de DMF y 71,38% en el tratamiento con 5% de glicerol. En el semen descongelado, los valores se encontraron entre 66,24% (7% DMF) y 68,38% (5% glicerol). Las muestras congeladas con glicerol al 5% presentaron porcentajes de espermatozoides con integridad acrosomal significativamente mayores respecto a las congeladas con glicerol al 7% y DMF al 7%.

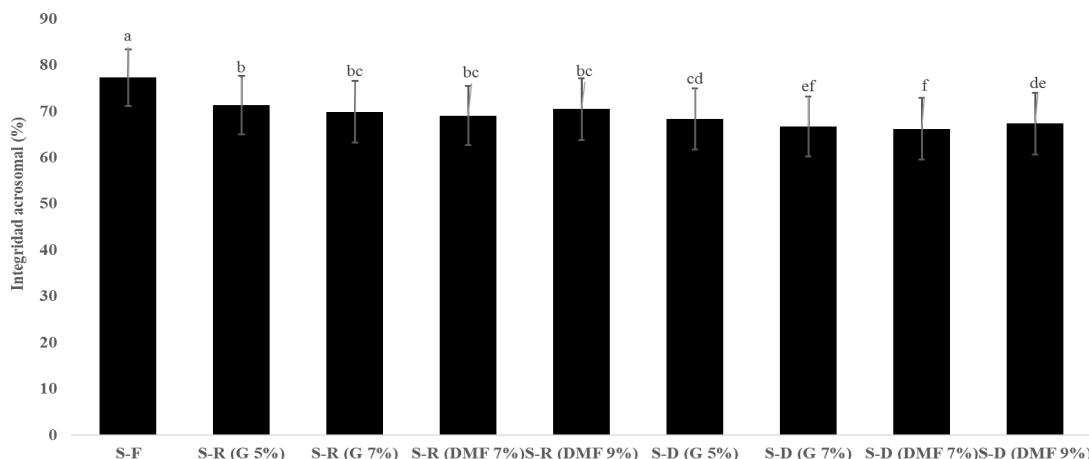


Figura 3. Porcentaje de espermatozoides con integridad acrosomal observados en muestras de semen fresco incubado con papaína, refrigerado con glicerol (5 y 7%), refrigerado con DMF (7 y 9%), descongelado con glicerol (5 y 7%), descongelado con DMF (7 y 9%). S-F: muestra semen fresco incubado con papaína; S-R: muestra semen refrigerado; S-D: muestra semen descongelado; G: glicerol; DMF: dimetilformamida. Letras diferentes indican diferencias significativas entre las diferentes muestras evaluadas ($p<0,05$).

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar dos porcentajes de glicerol (5 y 7) y de dimetilformamida (7 y 9) en los diluyentes para criopreservar semen de llama colectado por electroeyaculación. La colección de semen ($13,5 \pm 3,31$ minutos), tuvo un tiempo ligeramente inferior al reportado por Cucho et al. (2021) de 15 minutos, y mayor al descrito por Giuliano et al. (2008) de 6 - 12 minutos. El volumen seminal obtenido fue comparable al hallado por Cucho et al. (2021) también en el Centro Experimental La Raya, no obstante, fue inferior a los 4,3 mL descritos por Carretero et al. (2016) y los 3,9 mL reportados por Fumuso et al. (2018b), aunque fue mayor a los obtenidos por Giuliano et al. (2008) y Carretero et al. (2015b), todos éstos colectados por EE. Estos parámetros seminales están influenciados por la libido del macho y la estación reproductiva (Giuliano et al. 2008).

Todos los eyaculados presentaron filancia ($3,53 \pm 0,54$ cm), la cual desapareció tras el tratamiento con papaína. La concentración espermática del semen fresco fue de $72,92 \times 10^6 \pm 35,33 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} , valor similar al reportado por Casaretto et al. (2012) y Carretero et al. (2015b) en semen colectado por EE en Argentina. Sin embargo, estudios posteriores como los de Tarifa (2022) y Fumuso et al. (2018b) informaron concentraciones espermáticas superiores, de 122×10^6 y 98×10^6 espermatozoides mL^{-1} , respectivamente. El estudio de Tarifa fue realizado también en el Centro Experimental La Raya, mientras que el de Fumuso se desarrolló en Argentina. Cabe señalar que, en los estudios realizados en Argentina, la concentración espermática fue determinada utilizando una cámara hemocitométrica, método que presenta menor precisión en comparación con el sistema Spermtrack® (Crespilho et al. 2017), empleado en la presente investigación. Además, este parámetro microscópico puede estar influenciado por la libido de los machos, la cual en condiciones altoandinas suele estar asociada a la estación de lluvias, comprendida entre los meses de enero y marzo.

Tras el proceso de descongelamiento, la calidad espermática del semen de llama se redujo considerablemente en comparación con el semen fresco incubado con papaína. La movilidad total disminuyó a aproximadamente una quinta parte de los valores iniciales, mientras que el porcentaje de espermatozoides vivos se redujo a la mitad. Este deterioro post-descongelación ha sido previamente reportado por Fumuso et al. (2019, 2020, 2021), quienes también observaron una marcada disminución en los diferentes parámetros espermáticos luego de la criopreservación del semen de llama.

La movilidad total en el semen fresco incubado con papaína descendió de 43,28%, a alrededor de 20% en las muestras diluidas con glicerol en la etapa de refrigerado, y a 13% en las muestras con DMF en esa misma etapa, esta disminución también ha sido observada por Stuart et al. (2019) en semen de alpaca también tratado con papaína y usando glicerol como crioprotector. Sin embargo, Fumuso et al. (2021), utilizaron glicerol, DMF y una combinación de ambos, reportaron que la MT se preserva luego del período de refrigeración y equilibrado en todas las muestras, en este caso sin utilizar tratamiento enzimático. Carretero et al. (2015a), reportaron un incremento de la movilidad total en la etapa de refrigeración tras un tratamiento enzimático con colagenasa, en este estudio el mejor comportamiento tuvo el tratamiento con 7% de DMF. En contraste, en el presente estudio, los tratamientos con DMF presentaron el rendimiento más bajo, lo que sugiere que la interacción entre el tipo de enzima utilizada para reducir la filancia y el crioprotector empleado puede influir significativamente en la preservación de la movilidad espermática durante la refrigeración.

Luego del descongelado, la movilidad total continuó disminuyendo, alcanzando un promedio de 11% en los tratamientos con glicerol y de 8% en los tratamientos con DMF. Esta reducción progresiva de la movilidad también ha sido reportada por Stuart et al. (2019), Carretero et al. (2015a) y Fumuso et al. (2021) en espermatozoides congelados de alpaca y llama, quienes destacan la alta

susceptibilidad de los espermatozoides de camélidos sudamericanos al proceso de criopreservación. Estos resultados confirmaron las limitaciones técnicas actuales para conservar adecuadamente la funcionalidad espermática en estas especies.

Los parámetros cinemáticos de movilidad son fundamentales para la evaluación objetiva de la calidad seminal (Verstegen et al. 2002). Estos parámetros incluyen tres variables relacionadas con la velocidad del movimiento espermático: velocidad curvilínea, velocidad rectilínea y velocidad promedio; tres indicadores de la calidad del movimiento: linealidad, rectitud y oscilación; así como dos parámetros que reflejan las características oscillatorias del espermatozoide: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y frecuencia de batido de la cola (Valverde et al. 2020). En conejos, se ha reportado una alta correlación entre los parámetros obtenidos mediante sistemas de análisis computarizado de semen (CASA-Mot) y la fertilidad (Lavara et al. 2005).

En camélidos sudamericanos, estos parámetros han sido escasamente investigados debido a la alta viscosidad y filancia de los eyaculados (Crichton et al. 2015), que dificultan su análisis mediante sistemas automatizados. Para superar esta limitación se han empleado diversas enzimas proteolíticas con el objetivo de reducir la filancia del semen, entre ellas collagenasa en alpacas (Flores Huarco et al. 2021); papaína en dromedarios (Rateb et al. 2019), en alpacas (Ciprian 2019, Cucho et al. 2020), en llamas (Huayllani 2022, Tarifa 2022) y bromelina en dromedarios (El-Bahrawy et al. 2017).

Rateb et al. (2019) y El-Bahrawy et al. (2017), reportaron que en semen de dromedarios tratados con papaína y bromelina, respectivamente, los parámetros cinemáticos de movilidad aumentaron después del proceso de descongelación, como resultado del tratamiento con estas enzimas proteolíticas. En contraste, en la presente investigación, todos los parámetros cinemáticos evaluados mostraron un leve descenso durante la etapa de refrigeración y una disminución marcada tras la descongelación. Esta tendencia fue consistente en todos los tratamientos con glicerol y dimetilformamida, y también ha sido documentada previamente por Huayllani (2022) y Tarifa (2022) en llamas.

Estos resultados sugieren que los espermatozoides de llama presentan una mayor susceptibilidad a los efectos adversos del proceso de criopreservación en comparación con los de dromedario. Las diferencias observadas podrían atribuirse, además a factores específicos de especie, a variaciones en los protocolos de crioconservación utilizados, como la velocidad del descenso de temperatura, el tipo y concentración de los crioprotectores empleados, y la interacción de estos con el estado biofísico del semen post-degelificación.

Cuando los espermatozoides descongelados presentan valores de velocidad curvilínea, amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza y linealidad superiores a los observados en el semen fresco, esto suele asociarse a una mayor flexión de la pieza intermedia del espermatozoide y a un aumento en la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza de éste, lo cual sugiere un proceso de hiperactivación espermática (Peña y Linde-

Forsberg 2000). No obstante, en el presente estudio no se registraron estos patrones de hiperactivación en ninguna de las condiciones evaluadas.

En cuanto a la viabilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos fue mayor en el semen fresco tratado con papaína (68,44%), y mostró un descenso progresivo hasta alcanzar valores cercanos al 35% en las muestras descongeladas, tanto en las congeladas con glicerol como en las congeladas con dimetilformamida. Este patrón de disminución ha sido reportado también en llamas por Tarifa (2022), Huayllani (2022) y Carretero et al. (2015a); y en alpacas por Ciprian (2019) y Flores Huarco et al. (2021). En contraste, en estudios realizados con dromedarios, Rateb et al. (2019) y El-Bahrawy et al. (2017) no observaron una disminución significativa en esta variable tras la criopreservación. Estas diferencias podrían atribuirse principalmente a factores relacionados con la especie animal, como la composición bioquímica del plasma seminal y la estructura de la membrana espermática. En menor medida, también podrían influir variaciones en los protocolos de criopreservación, incluyendo el tipo de crioprotector, la tasa de enfriamiento y las condiciones de descongelación.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con integridad acrosomal, se observó una disminución desde un valor inicial de 77,31% en el semen fresco incubado con papaína hasta 66,24% en el tratamiento con 7% de dimetilformamida en la etapa post-descongelación, siendo las muestras con 5% de glicerol las que mostraron mayores porcentajes al descongelado (68,4%). Sin embargo, este descenso no fue tan pronunciado como el registrado en los parámetros de movilidad y viabilidad. Resultados similares han sido reportados por Tarifa (2022) y Huayllani (2022) en estudios con llamas, así como por Rateb et al. (2019) y El-Bahrawy et al. (2017) en investigaciones realizadas con semen de dromedario. Estos hallazgos sugieren que, a pesar de los efectos adversos del proceso de criopreservación, la estructura acrosomal de los espermatozoides de camélidos sudamericanos presenta una relativa resistencia en comparación con otros aspectos de la funcionalidad espermática.

En conclusión, ninguno de los niveles evaluados de glicerol (5% y 7%) ni DMF (7% y 9%) logró preservar adecuadamente los parámetros microscópicos espermáticos del semen de llama colectado mediante electroeyaculación y tratado con papaína ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) para reducir la filancia tras la criopreservación. Sin embargo, de los crioprotectores y concentraciones ensayadas, el glicerol al 5% presentó mejores valores de viabilidad e integridad acrosomal al descongelamiento de las muestras. Es necesario seguir optimizando los protocolos de criopreservación, considerando tanto las particularidades reproductivas de la llama como las condiciones específicas de la criopreservación.

ORCID

Ampuero, E.  <https://orcid.org/0000-0001-6159-7451>
Ordóñez, C.  <https://orcid.org/0000-0002-2955-4555>

Meza, A.  <https://orcid.org/0000-0001-8581-9987>
 Cucho, H.  <https://orcid.org/0000-0001-7170-9795>

REFERENCIAS

1. Alvarez MCL, Rola LD, Duarte JMB. Comparison Between Three Cryoprotectants in the Freezing of *Mazama americana* Semen Collected by Artificial Vagina. *Biopreserv Biobank*. 2020; 18: 351-357.
2. Amann RP, Waberski D. Computer – assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 2014; 81: 5-17.
3. Bashawat M, Hensel B, Müller K, Schulze M. Cooled storage of semen from livestock animals (Part II): Camelids, goats, and sheep. *Anim Reprod Sci*. 2021; 234: 106855.
4. Buendía P, Soler C, Paollichi F, Gago C, Urquiza B, Pérez-Sánchez F, Bustos-Obregón E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm head using the Sperm-Class Analyzer computer-assisted system. *Theriogenology*. 2002; 57: 1207-1218.
5. Carretero MI, Neild DM, Ferrante A, Caldevilla M, Arraztoa CC, Fumuso FG, Giuliano SM. Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of *Lama glama* spermatozoa. *Andrologia*. 2015a; 47(6): 685-693.
6. Carretero MI, Fumuso FG, Neild DM, Giuliano SM, Cetica P, Miragaya MH. Evaluation of the acrosomal status in *Lama glama* sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Anim Repro Sci*. 2015b; 160: 1-11.
7. Carretero MI, Giuliano SM, Arraztoa CC, Santa Cruz RC, Fumuso FG, Neild DM. Comparison of two cooling protocols for llama semen: with and without collagenase and seminal plasma in the medium. *Andrologia*. 2016; 49: e12691.
8. Casaretto C, Lombardo D, Giuliano S, Gambarotta M, Carretero M, Miragaya M. Morphometric analysis of llama (*Lama glama*) sperm head. *Andrologia*. 2012; 44: 424-430.
9. Ccalta Hancco R, Ordoñez-Rodríguez CD, Ccalta Hancco AL, Cucho Dolmos HC. Ciclodextrina cargada con colesterol en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*). Una alternativa metodológica. *J. Selva Andina Anim. Sci*. 2022; 9(2): 39-48.
10. Ciprian R. Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Ingeniero Zootecnista. Univ. Nac. San Antonio Abad del Cusco. 2019; p. 42-49.
11. Contreras W, Ruiz García L, Santiani A. Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev. Inv. Vet. Perú*. 2020; 31(1): e17548.
12. Contreras Huamani M, Olaguivel Flores C, Guillen Palomino C, Carretero MI, Fumuso FG, Laines Arcce IM. Pregnancy and birth rate outcomes in alpacas (*Vicugna pacos*) inseminated with frozen semen using two commercial extenders. *Reprod. Dom. Anim*. 2024; 59: e14514.
13. Crespilho AM, Chiaradia L, Cortez A, Dinelli M, Papa FO, Gomes GM, Peixoto Junior KC. Sensitivity evaluation of the computer-assisted sperm analysis (CASA) in the determination of frozen-thawed bull semen concentration. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2017; 54: 247-252.
14. Crichton E, Pukazhenthil BS, Billah M, Skidmore J. Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedarius*) spermatozoa. *Theriogenology*. 2015; 83: 168-174.
15. Cucho H, Ccoiso R, Gallegos M, Ccalta R, Meza A, Ampuero E, Ordóñez C, Soler C. Efecto de la papaína en la cinética de los espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Rev Inv Vet Perú*. 2020; 31(4): e19036.
16. Cucho H, Gallegos M, Ccoiso R, Meza A, Ampuero E, Ordóñez C, Valverde A. Morfometría y subpoblaciones de espermatozoides de llama (*Lama glama*) usando el sistema ISAS® CASA-Morph. *Rev Inv Vet Perú*. 2021; 32(1): e19506.
17. Curry MR. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*. 2000; 5(1):46-52.
18. Director A, Giuliano S, Carretero M, Pinto M, Trasorras V, Miragaya M. Electroejaculation and seminal characteristics in llama (*Lama glama*). *J Camel Pract Res*. 2007; 14: 203-206.
19. El-Bahrawy K, Rateb S, Khalifa M, Monaco D, Lacalandra G. Physical and kinematic properties of cryopreserved camel sperm after elimination of semen viscosity by different techniques. *Anim Reprod Sci*. 2017; 187: 100-108.
20. Flores Huarco NH, Giuliano SM, Fumuso FG, Miragaya MH, Cucho Dolmos HC, Carretero MI. Use of dimethylformamide to cryopreserve alpaca semen previously incubated with collagenase. *Reprod Domest Anim*. 2021; 56(11): 1387-1397.
21. Fumuso FG, Giménez ML, Neild DM, Giuliano SM, Chavez MG, Carretero MI. Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova*. 2014; 4: 50-53.
22. Fumuso FG, Arraztoa CC, Chaves MG, Neild DM, Giuliano SM, Miragaya MH, Carretero MI. Inseminación artificial de llamas con semen congelado. Resultados preliminares. *InVet*. 2018a; 20(1): 124.
23. Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Gambarotta MC, Carretero MI. Seminal plasma affects the survival rate and motility pattern of raw llama spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2018b; 192: 99-106.
24. Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves MG, Neild DM, Miragaya MH, Carretero MI. Evaluation of the cryoprotective effect of seminal plasma on llama (*Lama glama*) spermatozoa. *Andrologia*. 2019; 51(6): e13270.
25. Fumuso FG, Giuliano SM, Chaves G, Neild DM, Miragaya MH, Bertuzzi ML, Carretero MI. Incubation of frozen-thawed llama sperm with seminal plasma. *Andrologia*. 2020; 52(6): e13597.
26. Fumuso FG, Bertuzzi ML, Velásquez González N, Miragaya MH, Carretero MI. Cryopreservation of llama semen using a combination of permeable

- cryoprotectants. *Reprod Domest Anim.* 2021; 56(7): 958-964.
27. Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci.* 2008; 104: 359-369.
 28. Giuliano SM. Extracción y evaluación del semen de camélidos sudamericanos. *Spermova.* 2012; 2: 6-9.
 29. Huayllani F. Índice de fragmentación del ADN espermático en semen de llamas (*Lama glama*) durante el proceso de criopreservación. Tesis Ingeniero Zootecnista. Univ. Nac. San Antonio Abad del Cusco. 2022; p. 66-81.
 30. Kershaw-Young CM, Stuart C, Evans G, Maxwell WM. The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Anim Reprod Sci.* 2013; 138(3-4): 261-267.
 31. Lavara R, Mocé E, Lavara F, Viudes de Castro MP, Vicente JS. Do parameters of seminal quality correlate with the results of on-farm inseminations in rabbits? *Theriogenology.* 2005; 64(5):1130-1141.
 32. Meza A, Caldeira C, Valverde A, Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H, Soler C. Sperm kinematic characterization of alpaca (*Vicugna pacos*) during the reproductive season. *Reprod Dom Anim.* 2018; 53: 1415-1423.
 33. Mortimer S. CASA – Practical aspects. *J. Androl.* 2000; 21: 515-524.
 34. Morton KM, Evans G, Maxwell WM. Effect of glycerol concentration, Equex STM supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology.* 2010; 74(2): 311-316.
 35. Oliveira GC, Oliveira BMM, Celeghini ECC, Fernandes CB, Mattos CB. Cryopreservation of equine semen: a review. *Rev Bras Reprodução Anim.* 2013; 37(1): 23-28.
 36. Peña A, Linde-Forsberg C. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology.* 2000; 54(6): 859-875.
 37. Rateb SA, Monaco D, El-Bahrawy KA, Khalifa MA, Abd El-Hamid IS, Kamel AM, Accogli G, Lacalandra GM, Desantis S. Ramifications of protease-based liquefaction of camel semen on physical, kinematic and surface glyco-pattern of cryopreserved spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2019; 208:106121.
 38. Soler C, Sancho M, García A, Fuentes MC, Núñez J, Cucho H. Ejaculate fractioning effect on llama sperm head morphometry as assessed by the ISAS® CASA system. *Reprod Domest Anim.* 2014; 49: 71-78.
 39. Souza T. Avaliação andrológica e criopreservação de sêmen de pumas (*Puma concolor Linnaeus, 1771*) adultos. Tesis Magister. Universidad Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. 2009; p. 65-66.
 40. 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.
 41. Tarifa N, Meza A, Ampuero E, Ordoñez C, Becerra J, Huayllani F, Cutire U, Kuaquira R, Cucho H. Evaluación de tres protocolos de criopreservación sobre la vitalidad e integridad acrosomal de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *InVet.* 2021; 23(2): 58.
 42. Tarifa N. Efecto de tres curvas de congelación rápida en los parámetros microscópicos de semen de llama (*Lama glama*) empleando un equipo de criopreservación automática de semen. Tesis Ingeniero Zootecnista. Univ. Nac. San Antonio Abad del Cusco. 2022; p. 49-68.
 43. Valverde A, Barquero V, Soler C. The application of computer-assisted semen analysis (CASA) technology to optimise semen evaluation. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences.* 2020; 29(3): 189-198.
 44. Verstegen J, Igner-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 2002; 57(1): 149-179.