

Dinámica subpoblacional del semen criopreservado de alpaca obtenido de conductos deferentes y post cópula

Ccalta, C.^{1,5}; Sevilla, F.^{2,4}; Araya-Zúñiga, I.³; Mata, X.⁴; Cucho, H.⁵ y Valverde, A.⁴

¹Instituto Nacional de Innovación Agraria, Estación Experimental Andenes Cusco, Cusco, Perú.

²Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE). Alajuela. Costa Rica.

³Instituto Tecnológico de Costa Rica, Área Académica del DOCINADE, Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad. Alajuela. Costa Rica.

⁴Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Centro de Investigación y Desarrollo en Agricultura Sostenible del Trópico Húmedo, Laboratorio de Reproducción Animal, Campus Tecnológico Local San Carlos. Alajuela, Costa Rica.

⁵Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Agronomía y Zootecnia, Escuela Profesional de Zootecnia, Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas, Centro Experimental La Raya – Cusco. Cusco, Perú.

PALABRAS CLAVES

Camélidos.
Conservación biológica.
Análisis de semen.
Morfometría.
Reproducción.

RESUMEN

Los camélidos suramericanos poseen una relevancia económica, biológica y cultural para estas regiones. A pesar de ello, la conservación y la utilización de tecnologías de reproducción asistida no se ha promovido lo suficiente. La caracterización y conservación de los eyaculados seminales de estas especies, pueden favorecerse con estos procesos. El objetivo de este estudio fue determinar los patrones morfométricos del semen criopreservado de alpaca recuperado mediante dos métodos de colecta sobre la dinámica subpoblacional espermática. El estudio se realizó en el distrito de Marangani de la provincia de Canchis, Cusco, Perú por el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y el Laboratorio de Reproducción Animal (AndroTEC) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Costa Rica. Se utilizaron un total de 18 eyaculados de seis alpacas adultas (6-8 años). Se utilizó un sistema computarizado de análisis seminal (módulo CASA-morph) para la determinación de la forma y tamaño de la cabeza del espermatozoide de alpaca. Se utilizaron modelos generales lineales y mixtos para evaluar las variables morfométricas de la cabeza del espermatozoide de alpaca. Hubo un efecto sobre las variables de morfometría de acuerdo con el método de colecta y el proceso de conservación del semen. Se determinaron cuatro subpoblaciones espermáticas en los eyaculados de alpaca. Los procesos de conservación seminal influyen sobre el tamaño y forma de los espermatozoides de alpaca. También, tienen efecto sobre la distribución de los espermatozoides en subpoblaciones dentro de un eyaculado. La valoración de la morfología espermática puede favorecer a seleccionar los animales para los procesos de conservación de estas especies.

Subpopulation dynamics of cryopreserved alpaca semen obtained from the deferent vas and post-copulation

SUMMARY

South American camelids have economic, biological and cultural relevance for these regions. Despite this, the conservation and use of assisted reproductive technologies have not been sufficiently promoted. The characterization and conservation of the seminal ejaculates of these species can be favored with these processes. The objective of this study was to determine the morphometric patterns of cryopreserved alpaca semen recovered by two collection methods on the sperm subpopulation dynamics. The study was carried out in the Marangani district of the province of Canchis, Cusco, Peru by the Laboratory of Reproductive Biotechnologies of the Faculty of Agronomy and Zootechnics, National University of San Antonio Abad del Cusco and the Animal Reproduction Laboratory (AndroTEC) of the Costa Rica Institute of Technology, School of Agronomy, Costa Rica. A total of 18 ejaculates from six adult alpacas (6-8 years) were used. A Computer Assisted Semen Analysis (CASA-morph module) was used to determine the shape and size of the head of the alpaca spermatozoon. General linear and mixed models were used to evaluate the morphometric variables of the alpaca sperm head. There was an effect on morphometric variables according to the collection method and the semen preservation process. Four sperm subpopulations were determined in alpaca ejaculates. Semen preservation processes influence the size and shape of alpaca sperm. Also influence the distribution of sperm in subpopulations within an ejaculate. The assessment of sperm morphology may favor the selection of animals for the conservation processes of these species.

ADDITIONAL KEYWORDS

Camelids.
Biology conservation.
Semen analysis.
Morphometry.
Reproduction.

INFORMACIÓN

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 12.03.2025
Aceptado/Accepted: 12.01.2026
On-line: 15.01.2026
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
anvalverde@tec.ac.cr

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de camélidos sudamericanos relacionados con la Alpaca (*Vicugna pacos*) tienen una relevancia económica para las zonas cercanas a la cordillera de los andes en Perú, principalmente por su adaptación a las condiciones medioambientales (Trillo Zárate et al. 2021). Estas características de adaptabilidad promueven el desarrollo de programas de conservación de este recurso zoo genético, sin embargo, las biotecnologías reproductivas utilizadas actualmente en estos animales no se han empleado a nivel comercial debido a la falta de protocolos estandarizados que permitan validar los resultados de evaluaciones andrológicas y que contribuyan a mejorar las tasas reproductivas en esta especie (Carretero et al. 2025), además de mitigar las posibles pérdidas de biodiversidad (Holt & Comizzoli 2024).

Los protocolos para la colecta del semen y el estudio de la calidad del esperma forman parte de los factores que influyen sobre los procesos de conservación de especies locales y de interés productivo (Monaco & Lacalandra 2020). La selección de los métodos de recuperación del semen de alpaca tiene influencia sobre las características seminales, incluyendo variables de forma y tamaño del espermatozoide que se pueden cuantificar mediante el análisis de la morfometría espermática (Cucho et al. 2019; Huanca-Marca et al. 2020), a través de la tecnología CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) (Soler & Valverde, 2023; Víquez et al., 2023; Yániz, Capistrós, et al., 2016). Otros trabajos en los que se ha utilizado los sistemas CASA han estudiado las variables de movilidad espermática (Meza et al. 2018).

Los estudios en morfometría del espermatozoide de alpaca sugieren que existe una variación intra e inter, respecto a la forma y el tamaño de la cabeza espermática en los eyaculados de alpaca (Buendía et al. 2002). La comprensión de los patrones morfométricos en los eyaculados, la heterogeneidad y la existencia de subpoblaciones espermáticas bien definidas a partir de las variables seminales permite estudiar la dinámica celular del gameto masculino, así como su fertilidad y podría tener una aplicación práctica en la selección de los mejores reproductores, cuyo material genético sea de alto valor (Valverde et al., 2019). Algunos estudios previos sobre la morfometría de la cabeza se han realizado en otros animales como el toro (Viquez et al. 2023), cerdo (Barquero et al. 2021), carnero (Yániz, Capistrós, et al., 2016), llama (Cucho et al. 2021) y alpaca (Buendía et al. 2002; Cucho et al. 2019; Huanca-Marca et al. 2020), pero, en esta última especie no se han determinado las subpoblaciones espermáticas de acuerdo con la forma y tamaño de la cabeza de los espermatozoides.

Aunque los camélidos sudamericanos se caracterizan por su rusticidad en zonas altoandinas, la capacidad reproductiva no es eficiente, y por esto la utilización de las técnicas de reproducción asistida adquieren relevancia en estos sistemas (Carretero et al. 2025). La criopreservación de los eyaculados de los machos de estas especies y su uso en centros de inseminación artificial, son parte de los esfuerzos realizados por

los investigadores para mejorar las tasas de fertilidad (Huamani et al. 2024). Sin embargo, la conservación del germoplasma podría estar influenciada por otros factores, como los medios de dilución (Santiani et al. 2005) y los protocolos de extracción del semen utilizados (Fumuso et al. 2021). Por esto, el objetivo de este estudio fue determinar los patrones morfométricos del semen criopreservado de alpaca recuperado mediante dos métodos de colecta sobre la dinámica subpoblacional espermática.

MATERIAL Y MÉTODOS

LUGAR Y PERIODO DE ESTUDIO

El estudio fue realizado en el distrito de Marangani de la provincia de Canchis, Cusco, Perú. El sitio de estudio está ubicado a una altitud desde los 4133 m.s.n.m, con topografía conformada por las mesetas andinas. La temperatura varía entre los 3 a 23 °C. La ubicación UTM es: 19 L0279482m E, 8398851m S. Este trabajo fue desarrollado por el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la, Facultad de Agronomía y Zootecnia en el Centro Experimental La Raya, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y el Laboratorio de Reproducción Animal (AndroTEC) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Costa Rica.

ANIMALES Y MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DEL SEMEN

La investigación se realizó utilizando un total de seis alpacas macho, sexualmente activos con edades entre 6 y 8 años. Previo al estudio, se realizó la revisión de los órganos externos de los animales y se verificó la adecuada conformación y estado sanitario de estos. Los animales tenían un peso vivo promedio de $70,67 \pm 10,15$ kg. Las alpacas macho se alimentaron con la asociación de rye grass inglés y trébol blanco, además de pasto nativo con predominancia de *Alchemilla pinnata* y *Muhlenbergia fastigiata*, y agua a libre disposición.

Se realizó el proceso de desviación de los conductos deferentes (DCD) a tres alpacas. Los conductos deferentes fueron desviados hacia la cara interna del músculo y se utilizaron fístulas que permitían realizar la colecta del esperma libre de plasma seminal. El proceso de colección se realizó junto con un masaje testicular, de las colas del epidídimo y de los conductos deferentes, también se realizó la limpieza de la zona inguinal (cara interna del músculo) utilizando una toalla y luego se realizó la colecta de los espermatozoides mediante una jeringa de tuberculina. El esperma se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL junto con un medio de dilución de base Tris y se mantuvo a una temperatura estable de 37 °C.

También, se realizó la colecta del semen post cópula (PC) de tres alpacas durante tres veces con intervalos entre recolección de una semana. Para este proceso se utilizaron hembras receptivas y un corral de empadre. Cada hembra fue sujeta y se realizó la limpieza de la vulva de cada una. Después, se realizó la colecta utilizando un espéculo vaginal que llegó hasta el cérvix, donde se recogió el semen mediante un tubo colector, y se mantuvo con el medio de dilución Tris a una temperatura estable de 37 °C. La colecta del semen se realizó

tres veces por cada alpaca bajo los diferentes métodos (DCD y PC), para un total de 18 eyaculados.

PROCESAMIENTO DEL SEMEN

Para el procesamiento del semen fue necesaria la preparación del medio de dilución de Base Tris, compuesto por 3,028 g de Tris ($C_4H_{11}NO_3$), 1,7 g de Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), 1,25 g de Fructosa ($C_6H_{12}O_6$) y 100 mL agua bidestilada. En cada tubo Eppendorf de 1,5 mL se colocó 0,3 mL del medio de dilución, que ofrecía las condiciones óptimas para mantener a los espermatozoides. Para este proceso se utilizó el medio de dilución Base Tris y yema de huevo. Para ello, se centrifugó a 600 rpm durante un periodo de 15 minutos que permitiera reducir la cantidad de cúmulos de grasa contenidos en la yema de huevo. Una vez obtenidas ambas fracciones (Tris, yema de huevo), se procedió a realizar los procesos de dilución procurando que cada muestra quedara con una concentración final de 15 millones por mililitro (M/mL).

A cada submuestra que contenía al menos 15 M/mL de espermatozoides se le añadió papaína en una proporción de 1:1 (vol:vol) y se incubó a una temperatura de 37 °C en baño maría durante 30 minutos. Luego del proceso de incubación se adicionó un inhibidor de papaína durante un periodo de 5 minutos y se mantuvo en el baño maría (37 °C). Luego de ese periodo cada muestra fue centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos.

DESCRIPCIÓN DE LOS PROCESOS DE CONSERVACIÓN DEL SEMEN

Se analizó el semen en dos etapas, una etapa de semen fresco y una etapa de semen criopreservado. Cada submuestra recuperada por el método DCD y PC se separó en tres alícuotas, que se clasificaron como control (no se añadió ciclodextrinas saturadas de colesterol), colesterol a nivel 1 (se añadió 1,5 mg de ciclodextrinas saturadas de colesterol) y colesterol a nivel 2 (se añadió 3 mg de ciclodextrinas saturadas de colesterol). Cada alícuota fue incubada durante 15 minutos en un medio oscuro con una temperatura de 37 °C, luego se sometieron a centrifugación a 1750 rpm durante un periodo de 10 minutos, después de este proceso se eliminó el sobrenadante.

El tiempo de equilibrio o de refrigeración del semen (previo a la congelación) se realizó por medio de un recipiente con agua que se encontraba a 37 °C y contenía las alícuotas preparadas, y se llevó de forma gradual hasta los 5 °C durante un periodo de 150 minutos. Todas las pajillas utilizadas fueron codificadas según la submuestra correspondiente y se realizó el llenado de las pajillas de forma manual, utilizando una jeringa que contenían un volumen de 0,5 mL. Se dejó un espacio de aire en cada pajilla previo al sellado, que se realizó con alcohol polivinílico. Estos procesos se realizaron de forma inmediata luego del tiempo de equilibrio para evitar posibles cambios de temperaturas en cada submuestra.

El proceso de criopreservación se realizó usando una caja de poliestireno expandido que contenía 3 cm de altura con nitrógeno líquido. Luego se colocó

una gradilla a 5 cm de altura del nivel de nitrógeno líquido y se colocaron las pajillas previamente selladas en posición horizontal durante 15 minutos (tiempo de exposición sobre vapores de nitrógeno). Luego se sumergieron las pajillas en el nitrógeno líquido por 10 minutos, y se trasladaron y almacenaron en canastillas dentro de un tanque de nitrógeno líquido a -196 °C.

EVALUACIÓN DE LA MORFOMETRÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES

El análisis de la morfometría se realizó utilizando una alícuota de 5 μ L de cada muestra de semen criopreservado y se hizo un frotis sobre un portaobjetos. Este frotis se dejó secar a temperatura ambiente del laboratorio (24 °C) durante al menos 5 minutos. Luego, se utilizó el kit de tinción Hemacolor® (Merck, Darmstadt, Alemania) y se siguió el protocolo estándar del fabricante. Se utilizó el sistema CASA (ISAS® v1) y el módulo de morfología (CASA-Morph). El análisis se realizó a partir de un objetivo de contraste positivo con un aumento de 100 X y la resolución de análisis fue de 0,084 μ m/pixel. Se capturaron al menos 200 células espermáticas por cada muestra teñida. El análisis de la morfometría incluyó los parámetros de la cabeza del espermatozoide y la pieza intermedia.

Las variables de tamaño de la cabeza del espermatozoide que se analizaron fueron, ancho (W), longitud (L, μ m), perímetro (P, μ m), área (A, μ m²). Las variables de forma de la cabeza fueron: elipticidad (L/W), elongación ($[L-W]/[L+W]$), regularidad ($\pi LW/4A$), rugosidad ($4\pi A/P^2$) y el porcentaje del acrosoma con respecto a la cabeza del espermatozoide. Para el caso de la pieza intermedia se analizó el ancho (μ m) y área (μ m²). Cada análisis fue revisado y depurado utilizando el factor de corrección del módulo CASA-morph.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad a través de la prueba de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Una vez probadas las hipótesis de la distribución normal y homogeneidad de varianzas, se realizó un análisis de la varianza de media repetidas. Se evaluó dentro del modelo el efecto del método de recolección del semen. Se utilizaron modelos generales lineales y mixtos para evaluar las variables morfométricas de la cabeza del espermatozoide de alpaca. Se realizaron pruebas de comparación múltiple mediante el método de mínimos cuadrados, con una corrección de Bonferroni y un nivel de significación estadística, $P < 0,05$.

ANÁLISIS MULTIVARIADO

A partir de las ocho variables morfométricas evaluadas, se generó un subconjunto de datos para la identificación de patrones de agrupamiento en función de la forma y tamaño de la cabeza del espermatozoide. Para minimizar posibles sesgos derivados de la escala de medición, todas las variables se estandarizaron previo a los análisis estadísticos. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de factores principales (PFA) con el objetivo de reducir la dimensionalidad del conjunto de datos, preservando la mayor cantidad de información de las variables originales. Las comunalidades iniciales fueron estimadas con base en el coeficiente máximo de

correlación absoluta entre cada variable y cualquier otra.

El número óptimo de factores principales (FP) a retener se determinó mediante el criterio de Kaiser. Se seleccionó únicamente aquellos con valores propios superiores a 1. Asimismo, se calculó el estadístico de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) para evaluar la idoneidad del conjunto de datos en el análisis factorial. Se aplicó el método de rotación Varimax con normalización de Kaiser para facilitar la interpretación de los factores extraídos.

Con el propósito de interpretar los factores derivados, se examinaron las correlaciones entre estos y las variables morfométricas originales. Posteriormente, se implementó un procedimiento de clasificación de los espermatozoides en grupos discretos según las puntuaciones factoriales obtenidas. Este proceso se realizó en dos etapas: primero, se efectuó un análisis de conglomerados jerárquico utilizando el método de varianza mínima de Ward; posteriormente, el número óptimo de conglomerados determinado en esta fase se empleó como referencia en un análisis de conglomerados K-medias no jerárquico.

Para evaluar diferencias significativas entre los grupos resultantes, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) sobre las variables morfométricas y se es-

tableció un umbral de significación de $P < 0,05$. En caso de detectar diferencias significativas, se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer para comparaciones por pares. Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software IBM SPSS Statistics, versión 23.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.).

RESULTADOS

El análisis de la morfometría espermática se realizó con parámetros basados en variables de forma y tamaño de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de alpaca. Se demostró un efecto sobre las variables de tamaño, longitud, ancho, área, perímetro, porcentaje del acrosoma y forma como la regularidad. Se observaron valores más altos ($P < 0,05$) para estas variables en las muestras obtenidas a partir de la desviación de los conductos deferentes (DCD) que en las muestras obtenidas por el método de extracción post cópula (PC).

Al analizar las variables de tamaño de la pieza intermedia se demostró que hubo diferencias ($P < 0,05$) entre los métodos de recuperación para las variables de ancho y área de la pieza intermedia (**Tabla 1**).

Tabla 1. Variables de morfometría (media \pm EEM) de la cabeza y pieza intermedia de espermatozoides de alpaca obtenidos por diferentes métodos de recolección (Morphometric variables (mean \pm SEM) of the head and midpiece of alpaca sperm obtained by different collection methods).

| Variable | DCD | PC |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|
| Longitud | 5,45 \pm 0,01 ^a | 5,35 \pm 0,01 ^b |
| Ancho | 3,16 \pm 0,01 ^a | 3,10 \pm 0,01 ^b |
| Área | 13,79 \pm 0,05 ^a | 13,66 \pm 0,05 ^a |
| Perímetro | 17,63 \pm 0,05 ^b | 17,81 \pm 0,05 ^a |
| Acrosoma | 60,00 \pm 0,11 ^a | 55,32 \pm 0,11 ^b |
| Ancho-mp | 1,34 \pm 0,01 ^b | 1,39 \pm 0,01 ^a |
| Área-mp | 2,88 \pm 0,02 ^a | 2,78 \pm 0,02 ^b |

EEM: error estándar de la media. DCD (Desviación de conductos deferentes), PC (Post cópula). Ancho (W, μm), longitud (L, μm), perímetro (P, μm), área (A, μm^2), área de la pieza intermedia (Área-mp, μm^2) y ancho de la pieza intermedia (Ancho-mp, μm) de la pieza intermedia. ^{a,b} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre los métodos de recuperación de semen de alpaca. $P < 0,05$.

En general, los espermatozoides obtenidos con el método DCD fueron más grandes que los obtenidos con el método PC, con la excepción del perímetro y el ancho de la pieza intermedia. Cuando se analizaron las variables de elipticidad, elongación y rugosidad de la cabeza y la distancia de la pieza intermedia no hubo diferencias ($P > 0,05$) entre los métodos de recolección del semen (**Material Suplementario 1**).

Al analizar las variables morfométricas en semen fresco y congelado, se observaron valores más altos en el tamaño de los espermatozoides que fueron sometidos al proceso de congelación respecto de los espermatozoides analizados en fresco. La longitud, ancho y área de la cabeza del espermatozoide de alpaca sometido a un proceso de congelación fue mayor ($P < 0,05$) que los espermatozoides que no se sometieron a estos procesos de conservación.

Material suplementario 1. Variables de morfometría (media ± EEM) de la cabeza y pieza intermedia de espermatozoides de alpaca obtenidos por diferentes métodos de recolección (Morphometric variables (mean ± SEM) of the head and mid-shaft of alpaca spermatozoa obtained using different collection methods).

| Variable | DCD | PC |
|-------------|-------------------------|-------------------------|
| Elipticidad | 1,74±0,01 ^a | 1,74±0,01 ^a |
| Elongación | 0,27±0,001 ^a | 0,27±0,001 ^a |
| Rugosidad | 0,58±0,13 ^a | 0,76±0,13 ^a |
| Regularidad | 0,98±0,001 ^a | 0,96±0,001 ^b |
| D-mp | 0,26±0,01 ^a | 0,25±0,01 ^a |

EEM: error estándar de la media. DCD (Desviación de conductos deferentes), PC (Post copula). Elipticidad (L/W), elongación ($(L-W)/(L+W)$), rugosidad ($4\pi A/P^2$), regularidad ($\pi LW/4A$), distancia de inserción de pieza intermedia (D-mp, μm).
^{a,b} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre los métodos de recuperación de semen de alpaca. $P < 0,05$.

De acuerdo con la forma de la cabeza del espermatozoide de alpaca, se observaron valores más altos ($P < 0,05$) para las variables de elipticidad, elongación y rugosidad en muestras congeladas que los espermatozoides de alpaca evaluados en fresco (**Material suplementario 2**).

El área de la pieza intermedia fue mayor en los espermatozoides de alpaca congelados que en los espermatozoides analizados en fresco ($P < 0,05$). No hubo diferencias para el ancho de la pieza intermedia cuando se analizaron los espermatozoides de las dosis de semen fresco y congelado ($P > 0,05$) (**Tabla 2**).

Tabla 2. Variables morfométricas (media ± SEM) de la cabeza y la pieza intermedia de los espermatozoides de alpaca en muestras frescas y congeladas (Morphometry variables (mean ± SEM) of the head and intermediate piece of Alpaca spermatozoa in fresh and frozen samples).

| Variable | Fresco | Congelado |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| Longitud | 5,35±0,01 ^b | 5,53±0,02 ^a |
| Ancho | 3,12±0,01 ^b | 3,17±0,01 ^a |
| Área | 13,57±0,04 ^b | 14,18±0,06 ^a |
| Perímetro | 17,82±0,04 ^a | 17,44±0,07 ^b |
| Acrosoma | 58,21±0,09 ^a | 56,00±0,16 ^b |
| Ancho-mp | 1,36±0,01 ^a | 1,38±0,02 ^a |
| Área-mp | 2,77±0,02 ^b | 2,99±0,26 ^a |

EEM: error estándar de la media. Ancho (W, μm), longitud (L, μm), perímetro (P, μm), área (A, μm^2), acrosoma (%), área (Área-mp, μm^2) y el ancho (Ancho-mp, μm) de la pieza intermedia. ^{a,b} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre semen fresco y congelado. $P < 0,05$.

Al analizar el efecto de la adición de colesterol al semen, las variables de longitud, perímetro, área de la cabeza de espermatozoides y el porcentaje de acrosoma fueron diferentes en el tratamiento que se adicionó 3 mg de CLC (nivel 2) con respecto a los demás tratamientos utilizados, a saber, semen fresco (control),

nivel 0 (semen congelado sin adición de CLC) y el nivel 1 (semen congelado con adición de 1,5 mg de CLC) (**Tabla 3**), y se observó una posible influencia de la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol y el proceso de congelación de los espermatozoides. (**Material Suplementario 3**).

Tabla 3. Variables de morfometría (media ± EEM) de la cabeza y pieza intermedia de espermatozoides de Alpaca en diferentes niveles de adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) en semen congelado (Morphometric variables (mean ± SEM) of the head and midpiece of alpaca spermatozoa at different levels of cholesterol-saturated cyclodextrin (CLC) addition in frozen semen).

| Variable | Control | Nivel 0 | Nivel 1 | Nivel 2 |
|-----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Longitud | 5,35±0,02 ^{bc} | 5,31±0,02 ^c | 5,4±0,02 ^b | 5,53±0,02 ^a |
| Ancho | 3,14±0,01 ^{ac} | 3,09±0,01 ^{bc} | 3,12±0,01 ^c | 3,17±0,01 ^a |
| Área | 13,75±0,07 ^c | 13,33±0,07 ^b | 13,64±0,07 ^c | 14,18±0,06 ^a |
| Perímetro | 17,75±0,07 ^a | 17,83±0,07 ^a | 17,88±0,07 ^a | 17,44±0,07 ^b |
| Ancho-mp | 1,34±0,02 ^a | 1,35±0,02 ^a | 1,39±0,02 ^a | 1,38±0,02 ^a |
| Área-mp | 2,75±0,03 ^{ab} | 2,83±0,03 ^b | 2,73±0,03 ^a | 2,99±0,03 ^c |

EEM: error estándar de la media. Control: Semen fresco y 0 mg de CLC, Nivel 0: Semen congelado y 0 mg de CLC, Nivel 1: Semen congelado y 1,5 mg de CLC, Nivel 2: Semen congelado y 3 mg de CLC. Ancho (W, μm), longitud (L, μm), perímetro (P, μm), área (A, μm^2), área (Área-mp, μm^2) y el ancho (Ancho-mp, μm) de la pieza intermedia. ^{a-d} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre semen fresco y la adición de diferentes niveles de ciclodextrinas saturadas de colesterol en semen congelado. $P < 0,05$.

Material suplementario 3. Variables de morfometría (media ± EEM) de la cabeza y pieza intermedia de espermatozoides de Alpaca en diferentes niveles de adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) en semen congelado (Morphometric variables (mean ± SEM) of the head and mid-section of alpaca sperm at different levels of cholesterol-saturated cyclodextrin (CLC) addition in frozen semen).

| Variable | Control | Nivel 0 | Nivel 1 | Nivel 2 |
|-------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Elipticidad | 1,72±0,01 ^a | 1,73±0,01 ^{ab} | 1,75±0,01 ^{bc} | 1,76±0,01 ^c |
| Elongación | 0,26±0,001 ^a | 0,26±0,001 ^{ab} | 0,27±0,001 ^{bc} | 0,27±0,001 ^c |
| Rugosidad | 0,56±0,18 ^a | 0,59±0,18 ^a | 0,57±0,18 ^a | 0,96±0,00 ^a |
| Regularidad | 0,97±0,001 ^a | 0,97±0,001 ^{ab} | 0,98±0,001 ^b | 0,97±0,001 ^b |
| D-mp | 0,25±0,01 ^{bc} | 0,26±0,01 ^{ab} | 0,28±0,01 ^a | 0,23±0,01 ^c |

EEM: error estándar de la media. Control: Semen fresco y 0 mg de CLC, Nivel 0: Semen congelado y 0 mg de CLC, Nivel 1: Semen congelado y 1,5 mg de CLC, Nivel 2: Semen congelado y 3 mg de CLC. Elipticidad (L/W), elongación ($(L-W)/[L+W]$), rugosidad ($4\pi A/P^2$), regularidad ($\pi LW/4A$), distancia de inserción de pieza intermedia (D-mp, μm). ^{a-d} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre semen fresco y la adición de diferentes niveles de ciclodextrinas saturadas de colesterol en semen congelado. $P < 0,05$.

Los análisis de componentes principales revelan cuatro factores relacionados positivamente con el tamaño, la forma de la cabeza y la pieza intermedia de los espermatozoides de alpaca. El componente principal 1 (CP1) está asociado positivamente con las variables de longitud, ancho, área y perímetro (variables de tamaño de la cabeza del espermatozoide), el componente principal 2 (CP2) está asociado positivamente con variables de forma de la cabeza, principalmente con la eliptici-

dad, elongación y la longitud (variable de tamaño), un tercer componente principal (CP3) se asocia con las variables de tamaño de la pieza intermedia como el ancho y área y el componente principal 4 (CP4) se asocia positivamente con la variable de distancia de la pieza intermedia del espermatozoide. El total de la varianza explicada por los cuatro factores analizados fue de 76,69 % (Tabla 4).

Tabla 4. Vectores de los componentes principales (CP) para las variables de morfometría de la cabeza y pieza intermedia del semen de alpaca (Principal component (PC) vectors for morphometric variables of the head and midpiece of alpaca semen).

| Variable | CP1 | CP2 | CP3 | CP4 |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| Longitud | 0,76 | 0,61 | | |
| Ancho | 0,83 | | | |
| Área | 0,96 | | | |
| Perímetro | 0,75 | | | |
| Elipticidad | | 1,00 | | |
| Elongación | | 0,99 | | |
| Ancho-mp | | | 0,87 | |
| Área-mp | | | 0,86 | |
| Distancia-mp | | | | 0,84 |
| Var exp | 27,24 | 24,18 | 14,29 | 10,99 |

Varianza total explicada: 76,69 %. Var Exp: varianza explicada para cada componente principal. mp: pieza intermedia.

Para el caso de las colectas de esperma realizadas a partir del método DCD, se observaron diferencias ($P < 0,05$) en todas las subpoblaciones para las variables de ancho, perímetro y el área de la cabeza de los espermatozoides. Al analizar la pieza intermedia, las variables de ancho y área fueron diferentes para cada una de las subpoblaciones encontradas. Se encontraron valores más altos para las SPs 1 Y 3. Los espermatozoides con valores más altos de acuerdo con el área y perímetro

de la cabeza se agruparon en las subpoblaciones 1 y 2; mientras que cuando se analizó la pieza intermedia los espermatozoides que presentaron los valores más altos estaban agrupados en la SP 3 (Tabla 5). Además, se observaron diferencias en las subpoblaciones espermáticas para la variable de forma de la cabeza del espermatozoide, rugosidad (Material Suplementario 4)

Tabla 5. Variables de morfometría de la cabeza y pieza intermedia (media \pm EEM) de subpoblaciones (SPs) de semen de alpaca recuperado a partir del método por desviación de conductos deferentes (Morphometric variables of the head and midpiece (mean \pm SEM) of subpopulations (SPs) of alpaca semen recovered using the vas deferens deviation method).

| Variable | SP1 | SP2 | SP3 | SP4 |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Longitud | 5,82 \pm 0,08 ^a | 5,68 \pm 0,02 ^a | 5,34 \pm 0,02 ^b | 5,25 \pm 0,02 ^c |
| Ancho | 3,32 \pm 0,04 ^b | 3,43 \pm 0,01 ^a | 3,14 \pm 0,01 ^c | 2,90 \pm 0,01 ^d |
| Área | 14,77 \pm 0,25 ^b | 15,48 \pm 0,05 ^a | 13,3 \pm 5 0,07 ^c | 12,31 \pm 0,05 ^d |
| Perímetro | 20,70 \pm 0,31 ^a | 18,89 \pm 0,07 ^b | 17,07 \pm 0,09 ^c | 16,53 \pm 0,06 ^d |
| Ancho-mp | 2,00 \pm 0,07 ^b | 1,11 \pm 0,02 ^c | 2,28 \pm 0,02 ^a | 1,05 \pm 0,02 ^d |
| Área-mp | 3,42 \pm 0,12 ^b | 2,74 \pm 0,03 ^c | 3,98 \pm 0,04 ^a | 2,41 \pm 0,03 ^d |

EEM: error estándar de la media. Ancho (W, μm), longitud (L, μm), perímetro (P, μm), área (A, μm^2), área de pieza intermedia (Área-mp, μm^2), el ancho de la pieza intermedia (Ancho-mp, μm). ^{a-d} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre subpoblaciones de semen de alpaca. $P < 0,05$.

Material suplementario 4. Variables de morfometría de la cabeza y pieza intermedia (media \pm EEM) de subpoblaciones (SPs) de semen de alpaca recuperado a partir del método por desviación de conductos deferentes (Head and mid-shaft morphometric variables (mean \pm SEM) of subpopulations (SPs) of alpaca semen recovered using the vas deferens diversion method).

| Variable | SP1 | SP2 | SP3 | SP4 |
|-------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Acrosoma | 60,37 \pm 0,78 ^{ab} | 60,95 \pm 0,16 ^a | 59,12 \pm 0,22 ^b | 59,55 \pm 0,16 ^b |
| Elongación | 0,26 \pm 0,01 ^b | 0,25 \pm 0,001 ^b | 0,26 \pm 0,001 ^b | 0,29 \pm 0,001 ^a |
| Rugosidad | 0,47 \pm 0,01 ^d | 0,55 \pm 0,001 ^c | 0,59 \pm 0,001 ^a | 0,57 \pm 0,001 ^b |
| Regularidad | 1,02 \pm 0,01 ^a | 0,99 \pm 0,001 ^b | 0,99 \pm 0,001 ^b | 0,97 \pm 0,001 ^c |
| D-mp | 1,28 \pm 0,03 ^a | 0,23 \pm 0,01 ^b | 0,23 \pm 0,01 ^b | 0,23 \pm 0,01 ^b |

EEM: error estándar de la media. Acrosoma (%), elipticidad (L/W), elongación ($[(L-W)/(L+W)]$), rugosidad ($4\pi A/P^2$), regularidad ($\pi LW/4A$), distancia de inserción de pieza intermedia (D-mp, μm). ^{a-d} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre subpoblaciones de semen de alpaca. $P < 0,05$.

Cuando se recuperó el eyaculado por medio del método PC, se presentó un fenómeno similar al método de recuperación por desviación de los conductos deferentes para la conformación de las subpoblaciones. Al analizar el tamaño de la cabeza (longitud, largo y ancho) de los espermatozoides para cada subpoblación determinada,

se comprobaron diferencias significativas entre todas las SPs (Tabla 6). Además, se observaron diferencias entre algunas subpoblaciones espermáticas con el método post cópula para las variables de forma de la cabeza del espermatozoide, (Material Suplementario 5).

Tabla 6. Variables de morfometría de la cabeza y pieza intermedia (media± EEM) de subpoblaciones (SPs) de semen de alpaca recuperado post copula (Morphometric variables of the head and midpiece (mean ± SEM) of subpopulations (SPs) of alpaca semen recovered post-copulation).

| Variable | SP1 | SP2 | SP3 | SP4 |
|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Longitud | 5,58 ± 0,08 ^b | 5,84 ± 0,02 ^a | 5,24 ± 0,03 ^c | 4,98 ± 0,02 ^d |
| Ancho | 3,24 ± 0,03 ^b | 3,39 ± 0,01 ^a | 3,09 ± 0,01 ^c | 2,85 ± 0,01 ^d |
| Área | 14,38 ± 0,25 ^b | 16,14 ± 0,06 ^a | 13,31 ± 0,08 ^c | 11,72 ± 0,05 ^d |
| Perímetro | 20,89 ± 0,30 ^a | 19,21 ± 0,07 ^b | 17,46 ± 0,10 ^c | 16,70 ± 0,06 ^d |
| Ancho-mp | 2,02 ± 0,07 ^b | 1,20 ± 0,02 ^c | 2,27 ± 0,02 ^a | 1,11 ± 0,01 ^d |
| Área-mp | 3,34 ± 0,10 ^b | 2,73 ± 0,02 ^c | 3,85 ± 0,03 ^a | 2,29 ± 0,02 ^d |

EEM: error estándar de la media. Ancho (W, μm), longitud (L, μm), perímetro (P, μm), área (A, μm^2), área (área-mp, μm^2) y ancho (Ancho-mp, μm) de la pieza intermedia. ^{a-d} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre subpoblaciones de semen de alpaca. $P < 0,05$.

Material suplementario 5. Variables de morfometría de la cabeza y pieza intermedia (media± EEM) de subpoblaciones (SPs) de semen de alpaca recuperado post cópula (Morphometric variables for the head and mid-body (mean ± SEM) of subpopulations (SPs) of alpaca semen collected post-mating).

| Variable | SP1 | SP2 | SP3 | SP4 |
|-------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Acrosoma | 55,17 ± 0,86 ^{ab} | 54,78 ± 0,21 ^b | 55,51 ± 0,28 ^a | 55,78 ± 0,19 ^a |
| Elipticidad | 1,73 ± 0,03 ^{ab} | 1,73 ± 0,01 ^a | 1,70 ± 0,01 ^b | 1,76 ± 0,01 ^a |
| Elongación | 0,25 ± 0,01 ^b | 0,26 ± 0,001 ^b | 0,26 ± 0,001 ^b | 0,27 ± 0,001 ^a |
| Rugosidad | 0,46 ± 0,01 ^c | 0,56 ± 0,001 ^a | 0,56 ± 0,001 ^a | 0,54 ± 0,001 ^b |
| Regularidad | 0,99 ± 0,01 ^a | 0,96 ± 0,001 ^b | 0,96 ± 0,001 ^b | 0,95 ± 0,001 ^c |
| D-mp | 1,10 ± 0,03 ^a | 0,22 ± 0,01 ^b | 0,24 ± 0,01 ^b | 0,23 ± 0,01 ^b |

EEM: error estándar de la media. Acrosoma (%), elipticidad (L/W), elongación ($[(L-W)/(L+W)]$), rugosidad ($4\pi A/P^2$), regularidad ($\pi LW/4A$), distancia de inserción de pieza intermedia (D-mp, μm). ^{a-d} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre subpoblaciones de semen de alpaca. $P < 0,05$.

En términos de la forma de la cabeza, las subpoblaciones 3 y 4 presentaron diferencias para las variables de elongación, elipticidad, rugosidad y regularidad (Material suplementario 6). En cuanto al tamaño de la pieza intermedia los valores más altos se presentaron para la SPs 3, seguido por las subpoblaciones SP 1, SP 2 y SP 4, respectivamente.

Se determinó una interacción significativa entre los métodos y las etapas de este estudio. Por esto, al analizar el semen fresco recuperado a través del mé-

todo de desviación de conductos deferentes (DCD) se observaron diferencias entre cada subpoblación para las variables de tamaño de la cabeza de los espermatozoides de alpaca. Al analizar el semen congelado y recuperado por este mismo método, se determinaron diferencias en las subpoblaciones 3 y 4 para las variables ancho y área, mostrándose menos variación de las agrupaciones determinadas, debido a que las subpoblaciones 1 y 2 no presentaron diferencias en las variables mencionadas (Figura 1).

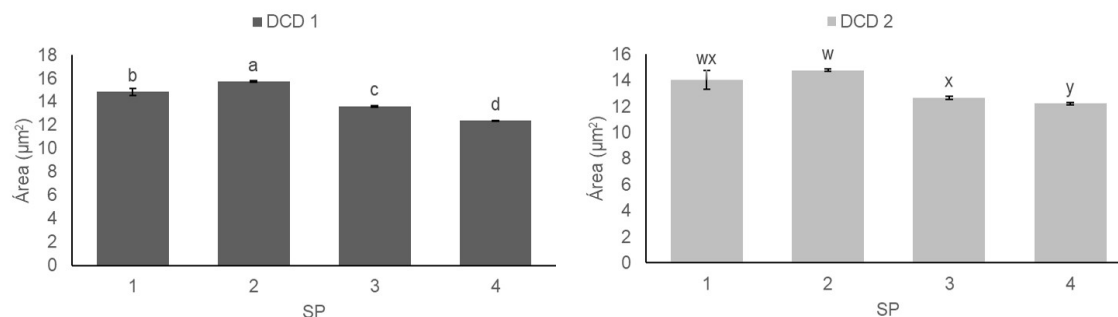
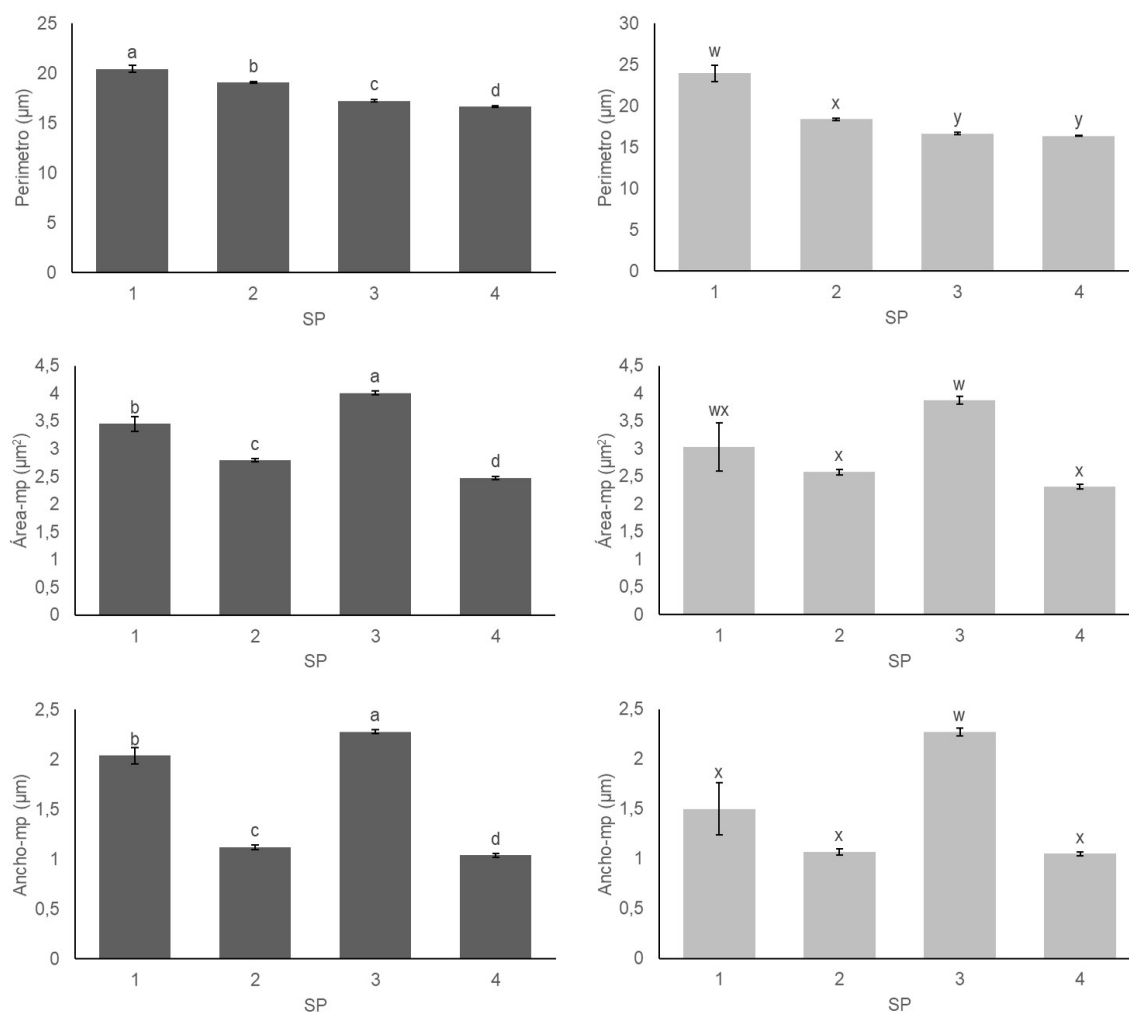


Figura 1. Variables de morfometría de la cabeza (área y perímetro) y pieza intermedia (área y ancho) (media± EEM) de subpoblaciones (SPs) de semen de alpaca recuperado por desviación de conductos deferentes en semen fresco (DCD 1) y semen congelado (DCD 2). ^{a,b,c,d} Letras diferentes indican diferencias entre subpoblaciones espermáticas en semen fresco. ^{w,x,y} Letras diferentes indican diferencias entre subpoblaciones espermáticas en semen congelado. $P < 0,05$ (Morphometric variables of the head (area and circumference) and midpiece (area and width) (mean ± SEM) of subpopulations (SPs) of alpaca semen recovered by vas deferens deviation in fresh semen (DCD 1) and frozen semen (DCD 2). ^{a,b,c,d} Different letters indicate differences between sperm subpopulations in fresh semen. ^{w,x,y} Different letters indicate differences between sperm subpopulations in frozen semen. $P < 0.05$).



Continuación. Figura 1. Variables de morfometría de la cabeza (área y perímetro) y pieza intermedia (área y ancho) (media \pm EEM) de subpoblaciones (SPs) de semen de alpaca recuperado por desviación de conductos deferentes en semen fresco (DCD 1) y semen congelado (DCD 2).^{a,b,c,d} Letras diferentes indican diferencias entre subpoblaciones espermáticas en semen fresco. ^{w,x,y} Letras diferentes indican diferencias entre subpoblaciones espermáticas en semen congelado. $P < 0,05$ (Morphometric variables of the head (area and circumference) and midpiece (area and width) (mean \pm SEM) of subpopulations (SPs) of alpaca semen recovered by vas deferens deviation in fresh semen (DCD 1) and frozen semen (DCD 2). ^{a,b,c,d} Different letters indicate differences between sperm subpopulations in fresh semen. ^{w,x,y} Different letters indicate differences between sperm subpopulations in frozen semen. $P < 0.05$).

Para la forma de los espermatozoides se determinó diferencias entre las SP 2 y las demás SPs para las variables elipticidad, elongación y rugosidad en semen fresco, mientras que en semen congelado se presentaron mayor variación entre las subpoblaciones determinadas, donde las SP 1, SP 2 y SP4 fueron diferentes para esas mismas variables (**Material suplementario 6**).

Los espermatozoides recuperados a través del método post cópula presentaron diferencias en la mayoría de las subpoblaciones determinadas tanto en semen fresco, como en semen congelado para las variables

de área y perímetro. El ancho y área de la pieza intermedia presentó diferencias significativas para las SPs determinadas bajo este método de recuperación, tanto en semen fresco como en semen congelado (**Figura 2**). No se presentaron diferencias en las SPs 1 y 2 del método post cópula y semen congelado en las variables de longitud y área. Por este método el porcentaje de acrosoma determinado no presentó variación entre la mayoría de SPs analizadas bajo este método de recuperación y etapa (**Material suplementario 7**).

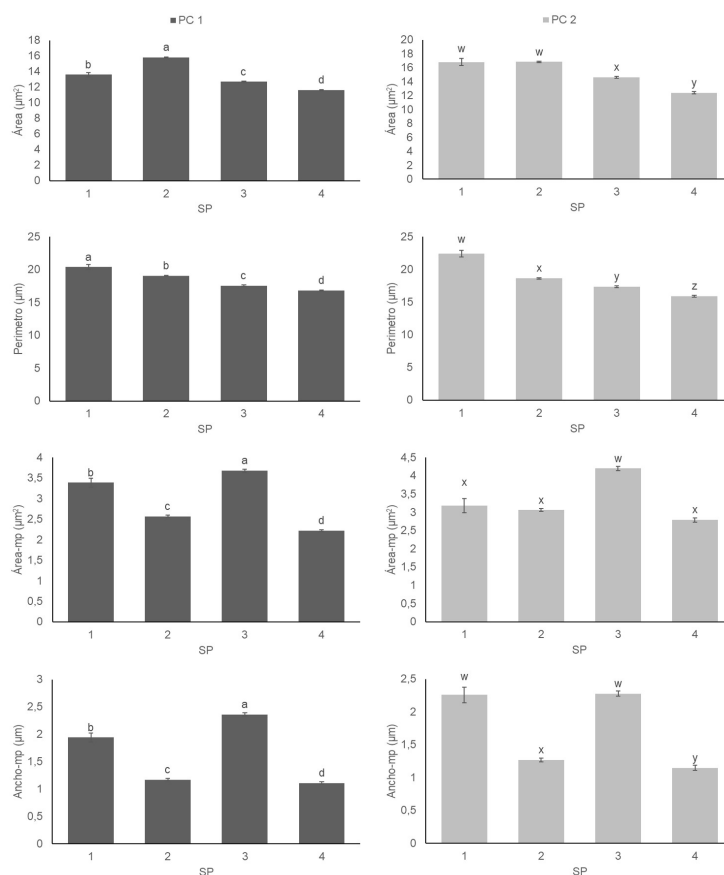


Figura 2. Variables de morfometría de la cabeza (área y perímetro) y pieza intermedia (área y ancho) (media± EEM) de subpoblaciones (SPs) de semen de alpaca recuperado post cópula en semen fresco (PC 1) y semen congelado (PC 2). ^{a,b,c,d} Letras diferentes indican diferencias entre subpoblaciones espermáticas en semen fresco. ^{w,x,y,z} Letras diferentes indican diferencias entre subpoblaciones espermáticas en semen congelado. P < 0,05 (Morphometric variables of the head (area and circumference) and midpiece (area and width) (mean ± SEM) of subpopulations (SPs) of alpaca semen recovered post-copulation in fresh semen (PC 1) and frozen semen (PC 2). ^{a,b,c,d} Different letters indicate differences between sperm subpopulations in fresh semen. ^{w,x,y,z} Different letters indicate differences between sperm subpopulations in frozen semen. P < 0.05).

Material suplementario 6. Variables de morfometría de la cabeza y pieza intermedia (media± EEM) de subpoblaciones (SPs) de semen de alpaca recuperado por desviación de conductos deferentes en semen fresco y semen congelado (Morphometric variables of the head and mid-section (mean ± SEM) of subpopulations (SPs) of alpaca semen recovered via vas deferens diversion in fresh and frozen semen).

| | DCD 1 | | | | DCD 2 | | | |
|-------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | SP1 | SP2 | SP3 | SP4 | SP1 | SP2 | SP3 | SP4 |
| Longitud | 5,93±0,09 ^a | 5,70±0,02 ^b | 5,37±0,03 ^c | 5,27±0,02 ^d | 4,56±0,25 ^y | 5,63±0,03 ^w | 5,23±0,04 ^x | 5,21±0,02 ^x |
| Ancho | 3,31±0,05 ^b | 3,46±0,01 ^a | 3,16±0,01 ^c | 2,90±0,01 ^d | 3,48±0,13 ^w | 3,33±0,02 ^w | 3,06±0,02 ^x | 2,91±0,01 ^y |
| Acrosoma | 60,08±0,78 ^{ab} | 61,09±0,18 ^a | 59,64±0,25 ^b | 59,72±0,19 ^b | 63,88±3,06 ^w | 60,51±0,37 ^w | 57,58±0,48 ^x | 59,23±0,29 ^w |
| Elipticidad | 1,85±0,04 ^a | 1,66±0,01 ^c | 1,71±0,01 ^b | 1,83±0,01 ^a | 1,32±0,12 ^y | 1,70±0,01 ^x | 1,72±0,02 ^x | 1,80±0,01 ^w |
| Elongación | 0,27±0,01 ^{ab} | 0,24±0,001 ^c | 0,26±0,001 ^b | 0,29±0,001 ^a | 0,13±0,03 ^y | 0,26±0,001 ^x | 0,26±0,001 ^x | 0,28±0,001 ^w |
| Rugosidad | 0,48±0,01 ^d | 0,55±0,001 ^c | 0,59±0,001 ^a | 0,57±0,001 ^b | 0,35±0,05 ^y | 0,56±0,01 ^x | 0,59±0,01 ^w | 0,58±0,001 ^w |
| Regularidad | 1,03±0,01 ^a | 0,99±0,001 ^b | 0,98±0,001 ^b | 0,97±0,001 ^c | 0,89±0,03 ^y | 1 ±0,001 ^w | 1 ±0,001 ^w | 0,97±0,001 ^x |
| D-mp | 1,29±0,03 ^a | 0,25±0,01 ^b | 0,24±0,01 ^b | 0,24±0,01 ^b | 1,23±0,09 ^w | 0,18±0,01 ^y | 0,21±0,01 ^{xy} | 0,21±0,01 ^x |

EEM: error estándar de la media. DCD 1: Semen fresco recuperado por desviación de conducto deferente, DCD 2: Semen congelado recuperado por desviación de conducto deferente. Longitud (L, µm), ancho (W, µm), acrosoma (%), elipticidad (L/W), elongación ([L-W]/[L+W]), rugosidad (4πA/P²), regularidad (πLW/4A), distancia de inserción de pieza intermedia (D-mp, µm). ^{a-d} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre subpoblaciones de semen de alpaca en semen fresco. P < 0.05. ^{w-y} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre subpoblaciones de semen de alpaca en semen congelado. P < 0,05.

Material suplementario 7. Variables de morfometría de la cabeza y pieza intermedia (media± EEM) de subpoblaciones (SPs) de semen de alpaca recuperado post copula en semen fresco y semen congelado (Morphometric variables for the head and mid-section (mean ± SEM) of subpopulations (SPs) of alpaca semen collected post-mating from fresh and frozen semen).

| | PC 1 | | | | PC 2 | | | |
|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | SP1 | SP2 | SP3 | SP4 | SP1 | SP2 | SP3 | SP4 |
| Longitud | 5,42±0,09 ^b | 5,75±0,02 ^a | 5,10±0,03 ^c | 4,94±0,02 ^d | 6,08 ± 0,16 ^w | 6,02 ± 0,03 ^w | 5,52 ± 0,05 ^x | 5,24 ± 0,05 ^y |
| Ancho | 3,11±0,04 ^b | 3,36±0,01 ^a | 3,02±0,01 ^c | 2,85±0,01 ^d | 3,63 ± 0,07 ^w | 3,43 ± 0,01 ^x | 3,23 ± 0,02 ^y | 2,88 ± 0,02 ^z |
| Acrosoma | 56,45±0,94 ^{ab} | 55,93±0,24 ^b | 56,79±0,33 ^a | 56,16±0,19 ^{ab} | 51,23 ± 1,77 ^w | 52,51 ± 0,37 ^w | 52,82 ± 0,51 ^w | 53,06 ± 0,54 ^w |
| Elipticidad | 1,74±0,03 ^{ab} | 1,72±0,01 ^b | 1,70±0,01 ^b | 1,75±0,01 ^a | 1,69 ± 0,06 ^x | 1,76 ± 0,01 ^x | 1,72 ± 0,02 ^x | 1,83 ± 0,02 ^w |
| Elongación | 0,26±0,01 ^{ab} | 0,26±0,001 ^{ab} | 0,25±0,001 ^b | 0,27±0,001 ^a | 0,24 ± 0,02 ^x | 0,27 ± 0,001 ^w | 0,26 ± 0,001 ^w | 0,29 ± 0,001 ^w |
| Rugosidad | 0,46±0,02 ^a | 0,54±0,001 ^a | 0,53±0,01 ^a | 0,53±0,001 ^a | 0,45 ± 0,02 ^x | 0,62 ± 0,01 ^w | 0,62 ± 0,01 ^w | 0,63 ± 0,01 ^w |
| Regularidad | 0,98±0,01 ^a | 0,96±0,001 ^{ab} | 0,96±0,001 ^{bc} | 0,95±0,001 ^c | 1,03 ± 0,02 ^w | 0,97 ± 0,001 ^x | 0,96 ± 0,001 ^{xy} | 0,95 ± 0,001 ^y |
| D-mp | 1,12±0,03 ^a | 0,22±0,01 ^b | 0,24±0,01 ^b | 0,22±0,01 ^b | 1,04 ± 0,06 ^w | 0,22 ± 0,01 ^x | 0,23 ± 0,02 ^x | 0,23 ± 0,02 ^x |

EEM: error estándar de la media. PC 1: Semen fresco recuperado post copula, PC 2: Semen congelado recuperado post copula. Longitud (L, μm), ancho (W, μm), acrosoma (%), elipticidad (L/W), elongación ($[(L-W)/(L+W)]$), rugosidad ($4\pi A/P^2$), regularidad ($\pi LW/4A$), distancia de inserción de pieza intermedia (D-mp, μm). ^{a-d} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre subpoblaciones de semen de alpaca en semen fresco. $P < 0.05$. ^{w-y} Letras en superíndice diferentes indican diferencias entre subpoblaciones de semen de alpaca en semen congelado. $P < 0,05$.

DISCUSIÓN

La caracterización del semen y la utilización en procesos de reproducción asistida permite mejorar los procesos de conservación de estas especies (Carretero et al. 2025; Morrell & Abraham 2020). Los procesos de colecta y evaluación del semen de esta especie presentan variaciones y no se han estandarizado (Brown 2000). Este estudio demostró diferencias entre los dos métodos de colecta para las variables de forma y tamaño de los espermatozoides de alpaca. Los resultados del presente trabajo coinciden con lo reportado por otros investigadores que analizaron tres métodos de colecta (desviación de conductos deferentes, aspiración vaginal y electroeyaculación) y encontraron diferencias para las variables de ancho, área, perímetro y el porcentaje de acrosoma del espermatozoide de alpaca (Huanca-Marca et al. 2020).

Los métodos de colecta influyen sobre la composición del semen de alpaca, relacionado con la viscosidad de este según el método de colecta utilizado y pueden limitar el desarrollo de biotecnologías reproductivas (Abraham et al. 2017; Anderson 2023). Estos métodos de colecta pueden influir sobre otras características seminales como el volumen obtenido, la concentración espermática y la morfología normal del espermatozoide, lo que afecta las tasas de concepción en esta especie (Bravo et al. 1997; Morton et al. 2009).

La composición del semen, en términos de la viscosidad (Tibary & Vaughan 2006) y la calidad baja del semen de alpaca (San-Martin et al., 1968), son consideradas limitaciones para el desarrollo adecuado de las técnicas de criopreservación. Los procesos de conservación seminal, refrigerados o congelados deben estandarizarse para estas especies de interés biológico

(Holt & Comizzoli 2024) y la valoración de los materiales obtenidos se realice mediante sistemas objetivos (Mortimer & De Jonge 2018). En este estudio se realizó la valoración seminal a la descongelación y en fresco a partir de sistemas automatizados de análisis seminal y se determinó la morfometría de los espermatozoides de alpaca en semen fresco y posterior a los procesos de criopreservación.

Se determinó que hubo diferencias en la valoración de la forma y tamaño de las cabezas y la pieza intermedia de los espermatozoides asociadas a los procesos de crio preservación. De acuerdo con otros trabajos, la forma y el tamaño de los espermatozoides de alpaca pueden categorizarse en células pequeñas, piriformes, redondeadas, largas o normales, al utilizar criterios como valores para el área inferiores a 14,65 μm^2 para células pequeñas, para células normales valores entre 14,65 μm^2 y 16,38 μm^2 , y para células categorizadas como largas con valores superiores a 17,38 μm^2 (Buendía et al. 2002). Los valores obtenidos para el área de la cabeza de los espermatozoides en este trabajo permiten clasificar a los espermatozoides como de categoría normal y pequeña.

La adición de ciclodextrinas de colesterol en el semen influyó sobre el tamaño y forma de la cabeza y pieza intermedia de los espermatozoides de alpaca. En otras especies, como carnero (Batissaco et al. 2020; Konyali et al. 2013) y caballo (Contreras et al. 2022), y en estudios previos se ha determinado que una influencia del uso del colesterol puede provocar una mejoría para los parámetros de movilidad, cinética espermática y la calidad seminal a la descongelación (Matthews et al. 2024), pero no se reporta los efectos sobre la morfometría. Se han sugerido algunos mecanismos de acción que provocan esas mejoras, asociados a la capacidad

que tienen las ciclodextrinas sobre la membrana plasmática y la regulación del nivel de colesterol de estas estructuras (Lone 2018).

El estudio de la morfometría espermática es relevante para la valoración y predicción de la fertilidad de los machos (Yániz et al., 2015). A pesar de que los sistemas computarizados de análisis seminal permiten estudiar cada célula individual, se necesita de un análisis más robusto, mediante metodologías de análisis multivariante de datos para la determinación de patrones morfométricos del semen y analizar detalladamente las estimaciones derivadas de los sistemas CASA (Martínez-Pastor 2022).

Algunos estudios previos han demostrado una heterogeneidad en los eyaculados de alpaca que se asocia con variación inter e intra-individuo (Buendía et al. 2002; Valverde Abarca et al. 2019). En el presente trabajo se demuestra la heterogeneidad a nivel morfométrico de los espermatozoides y se ha demostrado mediante la existencia de patrones establecidos en cuatro subpoblaciones que se determinaron analizando el método de colecta y el proceso de criopreservación del semen. En otras investigaciones se han comprobado la presencia de subpoblaciones de acuerdo con la morfología espermática en especies como el toro (Valverde et al. 2016), verracos (Thurston et al. 2001), llama (Cucho et al. 2021), venado de cola blanca (Cucho et al. 2022) y humano (Yániz, Vicente-Fiel, et al., 2016). Las variaciones entre métodos de recolección de seminal podrían asociarse al efecto sobre la viscosidad del semen que tiene la utilización de diferentes métodos de colecta en esta especie (Abraham et al. 2017; Bravo et al. 1997; Morton et al. 2009). También, el proceso de recuperación a partir de los conductos deferentes se ha utilizado como una alternativa para mejorar la utilización de tecnologías reproductivas en camélidos (Aisen et al. 2021), debido al control que se puede tener sobre el plasma seminal y la viscosidad de los eyaculados de los camélidos (Kershaw-Young & Maxwell 2012).

CONCLUSIÓN

El análisis de la morfometría espermática permitió identificar la presencia de distintas subpoblaciones de acuerdo con el semen fresco y congelado recuperado mediante dos métodos de colecta en alpacas. Las variaciones encontradas podrían favorecer a la caracterización de los eyaculados y los reproductores de estas especies para potenciar los programas de conservación y la utilización de tecnologías de reproducción asistida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión (VIE) del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por financiar el proyecto de investigación VIE-5402-2151-1016 "Protaminas: Evolución y papel en la protección del ADN espermático, formación de la cabeza y funcionamiento celular (PROTASPERM)", del que formó parte este trabajo. F.S., e I.A-Z., agradecen a la Dirección de Posgrados del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, MC, de Verdier, K, Båge, R, & Morrell, JM 2017, 'Semen collection methods in alpacas', *Veterinary Record*, vol. 180, no. 25, pp. 613–614.
- Aisen, EG, Huanca López, W, Pérez Durand, MG, Torres Mamani, E, Villanueva Mori, JC, Ousset, MJ, Medina, VH, Pérez Guerra, UH, & Huanca Mamani, T 2021, 'Spermatozoa Obtained From Alpaca vas deferens. Effects of Seminal Plasma Added at Post-thawing', *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 8.
- Anderson, DE 2023, 'Semen Collection and Evaluation', in, *Veterinary Techniques in Llamas and Alpacas*, pp.267–271. Wiley.
- Barquero, V, Roldan, ERS, Soler, C, Yániz, JL, Camacho, M, & Valverde, A 2021, 'Predictive Capacity of Boar Sperm Morphometry and Morphometric Sub-Populations on Reproductive Success after Artificial Insemination', *Animals*, vol. 11, no. 4, p. 920.
- Batissaco, L, Arruda, RP de, Alves, MBR, Torres, MA, Lemes, KM, Prado-Filho, RR, Almeida, TG de, Andrade, AFC, & Celeghini, ECC 2020, 'Cholesterol-loaded cyclodextrin is efficient in preserving sperm quality of cryopreserved ram semen with low freezability', *Reproductive Biology*, vol. 20, no. 1, pp. 14–24.
- Bravo, PW, Flores, U, Garnica, J, & Ordoñez, C 1997, 'Collection of semen and artificial insemination of alpacas', *Theriogenology*, vol. 47, no. 3, pp. 619–626.
- Brown, BW 2000, 'A review on reproduction in South American camelids', *Animal Reproduction Science*, vol. 58, no. 3–4, pp. 169–195.
- Buendía, P, Soler, C, Paolicchi, F, Gago, G, Urquieta, B, Pérez-Sánchez, F, & Bustos-Obregón, E 2002, 'Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer-assisted system', *Theriogenology*, vol. 57, no. 4, pp. 1207–1218.
- Carretero, MI, Neild, DM, Bertuzzi, ML, & Giuliano, SM 2025, 'Male reproductive biotechnologies in South American Camelids Part II: Semen dilution, cryopreservation and artificial insemination', *Animal Reproduction Science*, vol. 272, p. 107646.
- Contreras, MJ, Arias, ME, Silva, M, Cabrera, P, & Felmer, R 2022, 'Effect of cholestanol and cholesterol-loaded cyclodextrin on stallion sperm function and capacitation post-cryopreservation', *Theriogenology*, vol. 189, pp. 1–10.
- Cucho, H, Gallegos, M, Ccoiso, R, Meza, A, Ampuero, E, Ordóñez, C, & Valverde, A 2021, 'Morfometría y subpoblaciones de espermatozoides de llama (Lama glama) usando el sistema ISAS® CASA-Morph', *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, vol. 32, no. 1, p. e19506.
- Cucho, H, López, Y, Caldeira, C, Valverde, A, Ordóñez, C, & Soler, C 2019, 'Comparison of three different staining methods for the morphometric characterization of Alpaca (Vicugna pacos) sperm, using ISAS® CASA-Morph system', *Nova Biologica Reperta*, vol. 6, no. 3, pp. 284–291.
- Cucho, H, Nina, G, Meza, A, Ccalta, R, Ordóñez, C, & Valverde Abarca, A 2022, 'Subpoblaciones morfométricas de espermatozoides epididimarios del venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus peruvianus*)', *Agronomía Mesoamericana*, p. 46938.
- Fumuso, FG, Bertuzzi, ML, Velásquez González, N, Miragaya, MH, & Carretero, MI 2021, 'Cryopreservation of llama semen using a combination of permeable cryoprotectants', *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 56, no. 7, pp. 958–964.
- Holt, W & Comizzoli, P 2024, 'Cryobiology, wildlife conservation and reality; an ongoing dilemma!', *Cryobiology*, vol. 117, p. 105009.
- Huamani, MC, Olaguivel Flores, CA, Palomino, CYG, Carretero, MI, Fumuso, FG, & Arcce, IML 2024, 'Pregnancy and birth rate outcomes in alpacas (Vicugna pacos) inseminated with frozen semen using two commercial extenders', *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 59, no. 1.
- Huanca-Marca, NF, Ordoñez-Rodríguez, CD, Quispe-Ccasa, HA, Antezana-Julian, WO, Jordan-Misme, LA, Ampuero-Casquino, E, & Cucho-Dolmos, HC 2020, 'Parámetros morfométricos del espermatozoide de alpaca (Vicugna pacos), obtenidos por tres métodos de colección', *Journal of the Selva Andina Animal Science*, vol. 7, no. 2, pp. 50–62.
- Kershaw-Young, C & Maxwell, W 2012, 'Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species', *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 47, no. s4, pp. 369–375.

- Konyali, C, Tomás, C, Blanch, E, Gómez, EA, Graham, JK, & Mocé, E 2013, 'Optimizing conditions for treating goat semen with cholesterol-loaded cyclodextrins prior to freezing to improve cryosurvival', *Cryobiology*, vol. 67, no. 2, pp. 124–131.
- Lone, SA 2018, 'Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation', *Animal Reproduction Science*, vol. 192, pp. 1–5.
- Martínez-Pastor, F 2022, 'What is the importance of sperm subpopulations?', *Animal Reproduction Science*, vol. 246, p. 106844.
- Matthews, JL, Murphy, JM, & Varga, ZM 2024, 'Cholesterol-loaded cyclodextrin improves motility and survival of cryopreserved zebrafish (*Danio rerio*) sperm', *Cryobiology*, vol. 116, p. 104909.
- 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', *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 53, no. 6, pp. 1415–1423.
- Monaco, D & Lacalandra, GM 2020, 'Considerations for the development of a dromedary camel (*Camelus dromedarius*) semen collection centre', *Animal Reproduction Science*, vol. 212, p. 106239.
- Morrell, JM & Abraham, MC 2020, 'Semen Handling in South American Camelids: State of the Art', *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 7.
- Mortimer, ST & De Jonge, CJ 2018, 'CASA—Computer-Aided Sperm Analysis', *Encyclopedia of Reproduction*, pp. 59–63.
- Morton, K, Thomson, P, Bailey, K, Evans, G, & Maxwell, W 2009, 'Quality Parameters for Alpaca (*Vicugna pacos*) Semen are Affected by Semen Collection Procedure', *Reproduction in Domestic Animals*.
- San-Martin, M, Copaira, M, Zuniga, J, Rodreguez, R, Bustinza, G, & Acosta, L 1968, 'Aspects of reproduction in the alpaca', *Reproduction*, vol. 16, no. 3, pp. 395–399.
- Santiani, A, Huanca, W, Sapana, R, Huanca, T, Sepulveda, N, & Sanchez, R 2005, 'Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders', *Asian Journal of Andrology*, vol. 7, no. 3, pp. 303–309.
- Soler, C & Valverde, A 2023, 'El análisis seminal en la agricultura de precisión en el siglo XXI', *Agronomía Mesoamericana*, p. 51957.
- Thurston, LM, Watson, PF, Mileham, AJ, & Holt, WV 2001, 'Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation', *Journal of andrology*, vol. 22, no. 3, pp. 382–94.
- Tibary, A & Vaughan, J 2006, 'Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations', *Small Ruminant Research*, vol. 61, no. 2–3, pp. 283–298.
- Trillo Zárate, F, Calcina Condori, J, Barrantes Campos, C, & Aliaga Gutiérrez, J 2021, 'Influencia del sexo, edad, año y efectos maternos aditivos y permanentes sobre características de importancia económica en alpacas Huacaya', *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, vol. 32, no. 1, p. e18493.
- Valverde, A, Arenán, H, Sancho, M, Contell, J, Yániz, J, Fernández, A, & Soler, C 2016, 'Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws', *Asian Journal of Andrology*, vol. 18, no. 6, p. 851.
- Valverde Abarca, A, Castro-Morales, O, & Mdrigal-Valverde, M 2019, 'Sperm kinematics and morphometric subpopulations analysis with CASA systems: a review', *Revista de Biología Tropical*, vol. 67, no. 6.
- Viquez, L, Sevilla, F, Araya-Zúñiga, I, Soler, C, Barquero, V, Roldan, ERS, & Valverde, A 2023, 'Morphometric assessment of cryopreserved livestock bull spermatozoa in the tropics', *Reproduction in Domestic Animals*, vol. 58, no. 10, pp. 1439–1447.
- Yániz, J, Capistrós, S, Vicente-Fiel, S, Hidalgo, C, & Santolaria, P 2016, 'A comparative study of the morphometry of sperm head components in cattle, sheep, and pigs with a computer-assisted fluorescence method', *Asian Journal of Andrology*, vol. 18, no. 6, p. 840.
- Yániz, J, Vicente-Fiel, S, Soler, C, Recreo, P, Carretero, T, Bono, A, Berné, J, & Santolaria, P 2016, 'Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in men', *Asian Journal of Andrology*, vol. 18, no. 6, p. 819.
- Yániz, JL, Soler, C, & Santolaria, P 2015, 'Computer assisted sperm morphometry in mammals: A review', *Animal Reproduction Science*, vol. 156, pp. 1–12.