

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE  
HUAMANGA**

(Segunda Universidad fundada en el Perú)

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE MEDICINA**

**VETERINARIA**



**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA HORMONA  
LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH) EN LA CALIDAD  
SEMINAL DE ALPACAS (*Vicugna pacos*), CIP – QUIMSACHATA  
– Puno 2012”**

**Tesis para obtener el Título de:**

**MÉDICO VETERINARIO**

**Bach. M.V. GIUVIKA SESY CAVALCANTI NALVARTE**

**AYACUCHO – PERÚ**

**2013**

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LA HORMONA  
LIBERADORA DE GONADOTROPINAS (GnRH) EN LA CALIDAD  
SEMINAL DE ALPACAS (*Vicugna pacos*) CIP – QUIMSACHATA –  
PUNO 2012”**

**Recomendado : 05 de setiembre de 2013**  
**Aprobado : 12 de setiembre de 2013**



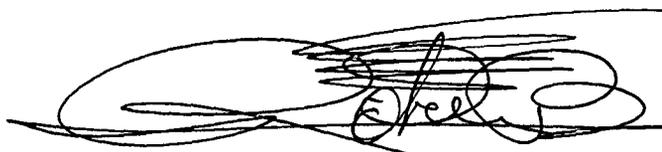
---

**Mg. CARLOS ALBERTO PISCOYA SARMIENTO**  
**Presidente del Jurado**



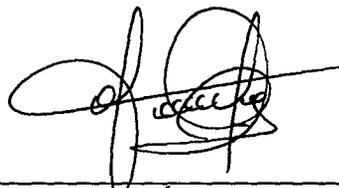
---

**Mg.Sc. CESAR AUGUSTO OLAGUIVEL FLORES**  
**Miembro del Jurado**



---

**Ing. ROGELIO SOBERO BALLARDO**  
**Miembro del Jurado**



---

**M.V.Z. MAGALY RODRÍGUEZ MONJE**  
**Miembro del Jurado**



---

**Dr. JUAN RAMIRO PALOMINO MALPARTIDA**  
**Decano (e) de la Facultad de Ciencias Agrarias**

## ÍNDICE

I. INTRODUCCION.	11
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	13
2.1. ANTECEDENTES.	13
2.2. ASPECTO TEÓRICO.	14
2.2.1. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO.	14
2.2.1.1. Testículos.	14
2.2.1.2. Epidídimo.	14
2.2.1.3. Conducto deferente.	14
2.2.1.4. Glándulas anexas.	15
2.2.1.5. Pene.	15
2.2.2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO.	16
2.2.2.1. Espermatogénesis.	16
2.2.2.2. Regulación endocrina.	17
2.2.2.3. Estacionalidad reproductiva.	18
2.2.2.4. Monta y cópula.	18
2.3. Componentes del semen.	19
2.3.1. Espermatozoides	19
2.3.2. Plasma seminal.	20
2.4. Colección de semen.	20
2.4.1. Métodos de extracción de semen de los C.S.A.	20
2.5. Características seminales del eyaculado de los C.S.A.	25
2.5.1. Características macroscópicas del semen.	26
a) Color.	26
b) Volumen de eyaculado.	26
c) Volumen de espuma.	27

d) Filancia.	27
2.5.2. Características microscópicas del semen.	27
a) Motilidad de los espermatozoides.	27
b) Concentración.	28
c) Pruebas de integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoide.	28
c.1) Endosmosis.	29
c.2) Vitalidad.	31
d) Morfología espermática.	31
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>32</b>
3.1. LUGAR Y UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.	32
3.2. LUGAR DE PROCESAMIENTO LABORATORIAL.	32
3.3. DE LOS ANIMALES.	32
3.4. DE LA ALIMENTACIÓN.	32
3.5. DURACIÓN DEL TRABAJO.	33
3.5.1. Fase pre-experimental.	33
3.5.2. Fase experimental.	33
3.6. MATERIALES.	34
3.7. METODOLOGÍA.	35
3.7.1. Procedimiento.	35
3.7.1.1. Obtención de muestras de semen.	35
3.7.1.2. Evaluación del eyaculado.	35
3.7.1.2.1. Evaluación macroscópica del eyaculado.	35
3.7.1.2.2. Evaluación microscópica del semen.	36
3.7.2. Análisis estadístico.	38
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
4.1. DEL TIEMPO DE CÓPULA.	41

<b>4.2. DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS</b>	
<b>DEL EYACULADO.</b>	<b>42</b>
4.2.1. Color (%).	42
4.2.2. Volumen de semen (ml).	43
4.2.3. Volumen de espuma (ml).	44
4.2.4. Filancia (cm).	44
<b>4.3. DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS</b>	
<b>DEL SEMEN.</b>	<b>45</b>
4.3.1. Motilidad espermática (%).	45
4.3.2. Concentración ( $\times 10^6$ /ml).	46
4.3.3. concentración promedio por eyaculado.	47
4.3.4. Endosmosis (%).	48
4.3.5. Vitalidad (%).	49
4.3.6. Anormalidades (%).	50
<b>V. CONCLUSIONES.</b>	<b>51</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.</b>	<b>52</b>
<b>VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.</b>	<b>53</b>
<b>VIII. ANEXOS.</b>	<b>60</b>

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo se la dedico:

A Dios por haberme permitido iniciar y terminar finalmente esta importante etapa de mi vida profesional.

A mis padres, Norma y Alejandro, quienes me brindaron siempre comprensión y paciencia, respaldando y respetando en todo momento mis inquietudes y anhelos y de quienes recibí todo este tiempo, lo que una hija espera siempre de sus padres, su amor.

## AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por ser mi alma mater y albergarme entre sus aulas, asimismo a los catedráticos de esta casa superior de estudios con mucho cariño.

Al Instituto Nacional De Innovación Agraria, por todo el apoyo brindado y por promover el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Sc. Teodosio Huanca Mamani, por el apoyo que me brindó para el inicio de este trabajo de investigación, en el CIP-Quimsachata del INIA-Puno.

Al Mg.Sc. Cesar A. Olaguivel Flores, asesor de este trabajo de investigación, por su gran apoyo con voluntad y disponibilidad, por sus valiosos consejos, sugerencias, así como por su comprensión.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores, co-asesora de este trabajo de investigación, por sus valiosos consejos, sugerencias, así como por su amistad y comprensión.

Al M.V.Z. Rubén H. Mamani Cato, investigador del CIP Quimsachata, quien desinteresadamente aceptó asesorarme en una parte importante del presente trabajo de investigación y de quien recibí apoyo en la ejecución de esta tesis.

Al Mg.Sc. Joel I. Pacheco Curie, por sus valiosos consejos y tiempo al asesorarme en una parte importante de este trabajo de investigación.

Al Dr. Carlos Alberto Piscocoya Sarmiento, Director de la Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria por haberme brindado el apoyo académico y las facilidades para realizar los trámites para iniciar este trabajo de investigación.

A mis compañeros y amigos, Yessenia, Salvador, Ruth, Jhon, Selery, Fernando, Adolfo, Zhenia, Edwin, David, Chris, Ronald, Hans, Dalma, Yessica, Yennifer, Daysi y muchos otros por su amistad y apoyo.

Y en forma muy especial agradezco a toda mi familia, a mis padres y a mi hermano Arhon, quienes además de apoyarme física y moralmente, sufrieron mi ausencia, durante gran parte del tiempo que dedique a la realización de este trabajo de investigación.

## RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Producción “Quimsachata” del Instituto Nacional de Innovación Agraria, ubicado en el Distrito de Santa Lucía, Provincia de Lampa, Departamento de Puno, los meses de Noviembre y Diciembre del 2012; el objetivo fue determinar el efecto de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) en la calidad seminal de alpacas (*vicugna pacos*). Se seleccionaron 6 alpacas machos de 5 a 8 años de edad de la Raza Huacaya, con peso promedio de 59 kg, la colección de semen se realizó mediante el método de vagina artificial con intervalo de un día y después de una hora de aplicar 8µg de Acetato de Buserelina (análogo de GnRH) por vía intramuscular; de un total de 68 eyaculados obtenidos de ambos grupos, se descartaron 20 eyaculados por presentar azoospermia; el porcentaje de semen del grupo GnRH fue 77.14% (27/35) y 63.64% (21/33) del grupo control y el tiempo de cópula (minutos) 17.67 y 16.29 respectivamente. Las características macroscópicas del semen para el grupo GnRH y para el grupo control fueron: volumen de semen (ml) 1.56; 1.17, volumen de espuma (ml) 2.94; 3.14, filancia (cm) 2.52; 3.17, color blanco lechoso (51.85%); (57.14%), blanco opaco (37.04%); (28.57%), respectivamente. Las características microscópicas del semen para el grupo GnRH y para el grupo control fueron: motilidad (%) 54.07; 47.14, concentración ( $\times 10^6$ ez/ml) 51.57; 65.43, concentración promedio por eyaculado ( $\times 10^6$ ez/eyaculado) 101.76; 47.52, endosmósis (%) 59.37; 42.19 ( $p < 0.01$ ), vitalidad (%) 71.11; 66.50, anormalidades (%) 24.61; 28.91, respectivamente.

## LISTA DE CUADROS

03. Tiempo de cópula.	41
04. Proporción y porcentaje de color de semen.	42
05. Volumen de semen, según tratamiento.	43
06. Volumen de espuma, según tratamiento.	44
07. Filancia, según tratamiento.	44
08. Motilidad, según tratamiento.	45
09. Concentración, según tratamiento.	46
10. Concentración promedio por eyaculado, según tratamiento.	47
11. Endosmosis, según tratamiento.	48
12. Vitalidad, según tratamiento.	49
13. Anormalidades, según tratamiento.	50

## LISTADE ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para el tiempo de cópula.	60
Anexo 2. Análisis de varianza para el volumen de semen.	60
Anexo 3. Análisis de varianza para el volumen de espuma.	60
Anexo 4. Análisis de varianza para la filancia.	61
Anexo 5. Análisis de varianza para la motilidad.	61
Anexo 6. Análisis de varianza para la concentración.	61
Anexo 7. Análisis de varianza para el concentración promedio por eyaculado.	62
Anexo 8. Análisis de varianza para endósmosis.	62
Anexo 9. Análisis de varianza para la vitalidad.	62
Anexo 10. Análisis de varianza para anormalidades.	63
Anexo 11. Resultados de grupo GnRH.	63
Anexo 12. Resultados del grupo control.	63
Anexo 13. Resultados del promedio.	64
Anexo 14. Resultados de ambos grupos y del promedio de cada macho.	64
Anexo 15. Imágenes del lugar de ejecución del presente trabajo de investigación.	68
Anexo 16. Machos reproductores seleccionados para la colección de semen, previa evaluación sanitaria.	68
Anexo 17. Materiales usados para el presente trabajo de investigación.	69
Anexo 18. Fotos del procedimiento de evaluación del semen colectado.	71
Anexo 19. Alimentación de los machos del experimento.	73

## INTRODUCCIÓN

El aspecto reproductivo es la base del crecimiento poblacional; sin embargo, las producciones alpaqueras se caracterizan por una natalidad del 50 % y excepcionalmente entre los 60 a 70 % (Sumar, 1983), por lo que es necesario atender el estudio de la capacidad reproductiva de esta especie; pero la dificultad para la colección de semen debido a las características de cópula de la hembra; así como el manejo del semen debido a su naturaleza viscosa, a los que hay que agregar la baja concentración de espermatozoides, el escaso volumen y el alto porcentaje de anormalidades; han sido los principales obstáculos para el desarrollo de las biotecnologías reproductivas (Fernández-Baca 1993).

Los reportes sobre métodos de colección de semen son diversos, desde el uso de sacos vaginales, esponjas vaginales, posteriormente se reporta el uso de una vagina artificial adaptada de ovinos (Sumar J. y Leyva V.1981), el uso de una frazadilla eléctrica cubriendo la vagina artificial, permite algunas mejoras en la colección de semen, facilitando el mantenimiento de la temperatura de este (Gaully y Leindiger, 1996), de igual forma el uso de un maniquí, sin embargo para colectar semen mediante el método de vagina artificial, se requiere un entrenamiento de los animales y no siempre todos los machos llegan a aceptar el maniquí (Sumar J. y Leyva V.1981).

La fisiología reproductiva del macho es regulada por la descarga de GnRH del Hipotálamo que ocurre en forma intermitente en el día y la noche, esta descarga de GnRH, después de 30 minutos aproximadamente causa la liberación de LH, actuando sobre las células de Leydig, que inician la producción de progesterona y

gran parte de ella es transformada en testosterona, la cual tiene una vida media (20 a 60 minutos) y es de secreción pulsátil (Senger, 2003).

Conociendo las características seminales de la alpaca se comprende que la baja calidad seminal que presentan los machos, es uno de los factores que causan la baja fertilidad en esta especie, por ello se planteó esta investigación, con el objetivo de mejorar la calidad seminal utilizando un análogo de la hormona GnRH.

Por lo tanto, el objetivo principal del presente trabajo fue determinar el efecto de la administración de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) sobre la calidad seminal de alpacas (*vicugna pacos*).

Los objetivos específicos fueron:

- Evaluar las características macroscópicas de semen de alpacas que fueron tratadas con GnRH.
- Evaluar las características microscópicas de semen de alpacas que fueron tratadas con GnRH.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

#### **2.1. ANTECEDENTES.**

Dosis repetidas de 50 µg de GnRH en carneros produjeron un incremento en la concentración de testosterona sérica y un incremento de la actividad sexual (Schambacher and Lunstra, 1977).

Dosis repetidas de 200 ng de GnRH en toros Holstein causaron un incremento de la producción seminal y las concentraciones de LH y testosterona (Miller y Amman, 1986).

Trabajos realizados en camellos tratados con GnRH, donde se vio un incremento de espermatozoides anormales en el eyaculado y en la concentración espermática, indicando que la aplicación de GnRH induce una mayor liberación de espermatozoides en el eyaculado, similar a lo reportado en camellos por (Willmen *et al.*, 1992).

Dosis de 50 µg de acetato de Buserelina, por tres oportunidades, con un intervalo de 7 días entre aplicación, se incrementaron ligeramente el pH, la concentración, la endósmosis y el porcentaje de anormales, también hubo una ligera disminución en el volumen, la vitalidad y la motilidad ( $p \geq 0.05$ ); se comprobó que los incrementos no son sostenibles pues a partir de la cuarta aplicación de la hormona, disminuye la calidad espermática hasta hacerse azoospermica (Pacheco *et al.*, 2013).

## **2.2. ASPECTO TEÓRICO.**

### **2.2.1. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO.**

#### **2.2.1.1. Testículos.**

Las gónadas masculinas o testículos son órganos sexuales primarios que tienen como funciones principales la producción de espermatozoides (función exocrina) y la producción de hormonas esteroides (función endocrina); ambas funciones están reguladas por una interrelación entre hipotálamo, hipófisis y las gónadas (Galina, 1995).

Los testículos en los camélidos tienen una forma ovoide, redondeada y están ubicados en una posición bastante particular, a la altura de la tuberosidad isquiática zona perianal, recubiertos por un escroto cuya piel no es muy flácida y el tamaño en un individuo adulto es: polo mayor 4 cm. el ancho es de aproximadamente 2,5 cm. descienden al nacimiento normalmente ambos son de igual tamaño peso promedio 18 gr. (Olarie *et al.*, 1988).

#### **2.2.1.2. Epidídimo.**

El epidídimo está dividido en 3 zonas: la cabeza, relativamente voluminosa, insertada en la parte posterior del testículo; el cuerpo, delgado y aplanado; la cola que es un ensanchamiento del cuerpo situado en la parte anterior del testículo que se continúa con el conducto deferente. Los espermatozoides almacenados en el epidídimo conservan capacidad fecundante por varias semanas; la cola del epidídimo es el principal órgano de almacenamiento, ya que contiene alrededor del 75 % de las células espermáticas totales en ella alojadas (Eckert *et al.*, 1989).

#### **2.2.1.3. Conducto deferente.**

El conducto deferente, transporta el semen hacia la uretra durante el proceso de eyaculación (Galina, 1995), se inicia en la cola del epidídimo y es sostenido por

un pliegue de peritoneo; puede separarse con facilidad del resto del cordón espermático (Hafez *et al.*, 2000); mide aproximadamente 40 cm. y presenta dos porciones: la anterior muy delgada en su inicio y una posterior, cerca de la uretra que muestra un ligero engrosamiento de aspecto glandular (OlarTE *et al.*, 1988).

#### **2.2.1.4. Glándulas anexas.**

Las glándulas anexas del aparato reproductor masculino de los camélidos son: próstata, glándulas bulbouretrales.

La próstata tiene forma de T o de "silla de montar" y las bulbouretrales son dos promontorios ubicados a la altura de la tuberosidad isquiática (OlarTE *et al.*, 1988).

La próstata se encuentra fuera del grueso musculo uretral y otra parte interna o diseminada rodea a la uretra en ubicación profunda con respecto a dicho músculo, se extiende en sentido caudal hasta los conductos de las glándulas bulbouretrales (Galina, 1995).

#### **2.2.1.5. Pene.**

Es un órgano que tiene doble función: expulsión de la orina y depósito del semen en el aparato genital de la hembra. Está alojado dentro del prepucio, que lo protege, presenta tres cuerpos cavernosos que se agrupan alrededor de la uretra peniana (Hafez *et al.*, 2000); la orientación normal del prepucio, incluso cuando orina, se proyecta hacia atrás, cuando se produce la erección del pene el prepucio se orienta hacia adelante; la flexión peniana se endereza y el pene sale del prepucio unos 15 a 25 cm. (OlarTE *et al.*, 1988).

La alpaca macho al momento de nacer tiene el pene adherido al prepucio por un tejido embrionario; estas adherencias desaparecen gradualmente a medida que el animal crece y se inicia la producción de testosterona por el testículo. El pene de la alpaca mide 35 a 40 cm. y es de tipo fibroelástico, el diámetro es relativamente delgado y no se expande apreciablemente durante la erección. La punta del pene tiene una proyección cartilaginosa firme denominada proceso peneano de 4 a 5

cm. (Galina, 1995), en forma de gancho curvado hacia la derecha, esta proyección sobrepasa la abertura de la uretra y asiste en la penetración del cérvix de la hembra durante la cópula (Olarte, 1988).

Existe variación en la edad de la pubertad en esta especie, los conductos seminíferos pueden desarrollar lumen y pueden empezar espermatogénesis en alpacas mayores de 12 meses (Galloway, 2000); sin embargo, el principio de madurez sexual es a menudo determinado por la edad en la cual las adhesiones pene-prepucio se separan y que los machos son capaces de una erección completa, en el tiempo en el cual el espermatozoide viable es producido (Smith *et al.*, 1994). En alpacas que a 1 año de edad 8 - 12 % de machos, a 2 años de edad 60 - 78 % de machos y a 3 años de edad 94 - 100 % de machos han perdido las adhesiones del pene-prepucio (Bravo *et al.*, 2000).

## **2.2.2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO.**

### **2.2.2.1. Espermatogénesis.**

El epitelio seminífero, que reviste los túbulos seminíferos, está compuesto de dos tipos básicos de células: las células de Sertoli y las células germinales en desarrollo. Estas últimas experimentan una serie continua de divisiones celulares y cambios, que comienzan en la periferia y avanzan hacia la luz del túbulo. Las células madre, llamadas espermatogonios, se dividen varias veces antes de formar espermatoцитos. Luego, éstos experimentan una meiosis que reduce su contenido de ADN a la mitad del que tienen las células somáticas. Esta serie de divisiones celulares, incluyendo la proliferación de los espermatogonios y las divisiones meióticas, se conoce como espermatocitogénesis. Las células haploides que resultan de este de este proceso son las espermátides, las cuales pasan por una serie de cambios estructurales y de desarrollo para formar los espermatozoides. Estos cambios metamórficos constituyen la espermiogénesis. Las células germinales en desarrollo están estrechamente asociadas a las grandes células de Sertoli o sustentaculares que las rodean durante el desarrollo (Hafez, 1996).

La espermatogénesis ocurre todo el año en todos los camélidos (Elwishy 1988; Arthur 1992), sin embargo las variaciones estacionales en la producción de espermatozoides se basan en el origen geográfico (Novoa, 1970), por lo tanto la nutrición, el clima y otros factores medioambientales (Elwishy 1988).

Estudios sobre el proceso espermatogénico realizado en cortes histológicos en machos prepuberales, que provenían de un centro de crianza de buena alimentación y manejo durante todos los meses del año mostraron que los primeros espermatozoides morfológicamente maduros se observan a los 18 meses de edad (Fernández-Baca, 1991).

#### **2.2.2.2. Regulación endocrina.**

La función testicular normal requiere una estimulación hormonal por las gonadotrofinas, las que a su vez están controladas por la secreción pulsátil hipotalámica de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) del hipotálamo (Hafez, 1996).

La LH, FSH y la testosterona son las hormonas clave para la regulación de la espermatogénesis en los mamíferos y funcionan sinérgicamente para producir el desarrollo de las células germinales. Durante el periodo puerperal, también se precisa de la hormona de crecimiento (GH) y de las tiroideas, con el fin de establecer cuantitativamente el número normal de células de Sertoli y consecuentemente tamaño testicular del adulto (Illera, 1994).

La GnRH estimula la secreción de LH y FSH de la hipófisis anterior; la LH actúa en las células intersticiales de Leydig y produce andrógenos principalmente testosterona, este da origen al desarrollo de las características sexuales secundarias del macho así también es segregada a los túbulos seminíferos en donde interviene en el proceso de la espermatogénesis. La FSH interactúa con receptores ubicados en las células de Sertoli y causa la producción de proteína de unión de andrógenos (ABP), la conversión de testosterona en dihidrotestosterona y andrógeno, la estimulación de la espermatogénesis, la terminación de la liberación de espermatozoides (espermiación) y la secreción de inhibina la cual tiene un efecto

de retroalimentación negativa en la secreción de FSH pero no de LH (Hafez, 1996).

Existen otros factores responsables del control de la espermatogénesis como son la temperatura eligiendo como modelo lo que ocurre en el carnero por ser el semental más representativo en cuanto a este tipo de variaciones ya que se alteran su capacidad reproductora según la estación del año (Illera, 1994).

### **2.2.2.3. Estacionalidad reproductiva.**

La longitud de la estación reproductiva, es principalmente el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales, jugando los factores ambientales un interesante rol (Lubos, 1983), estudios de observaciones de campo revelan un comportamiento sexual muy típico y especial en las alpacas (Sumar, 1983); la estacionalidad reproductiva en alpaca depende más del manejo que de influencias estacionales sobre la fisiología reproductiva.

En rebaños de comunidades campesinas cuya práctica usual es mantener hembras y machos juntos todo el año, las alpacas paren solamente de Diciembre a Marzo (Fernández-Baca *et al.*, 1972); este periodo es el más abrigado, con suficiente lluvia y abundante forraje verde (San Martín *et al.*, 1968); sin embargo, cuando machos y hembras permanecen separados y se les junta en cualquier época del año, la copulación y fecundación ocurren normalmente (Fernández-Baca *et al.*, 1972). Cuando el encuentro de machos y hembras está permitido durante un período limitado de apareamiento, los machos muestran una actividad sexual intensa en la primera parte y el segundo día (Smith *et al.*, 1994); sin embargo, la actividad sexual decrece después de un periodo de tiempo (Fernández-Baca, 1971). Estas variaciones en las características ambientales de la estación del año, donde la alimentación puede variar en forma considerable, determinan que las características reproductivas presenten interesantes fluctuaciones; durante la estación reproductiva, el peso testicular aumenta debido al desarrollo aumentado de tejido intersticial y el diámetro aumentado de conductos seminíferos (Elwishi 1988). Existe alta variabilidad en las diferentes características seminales

evaluadas entre las diferentes épocas, la época de lluvia presenta las mejores respuestas para las variables: espermatozoides normales, anormalidades de la cabeza y cola; la época seca presenta el menor porcentaje de espermatozoides con gota citoplásmica. El factor época no influye sobre el pH, volumen de semen, filancia, motilidad, concentración, recuento, vitalidad y anormalidades del cuello. Los mejores resultados fueron obtenidos durante la época de lluvia (Huanca *et al.*, 2011).

#### **2.2.2.4. Monta y cópula.**

La cópula se realiza en posición de cúbito ventral, el macho persigue a una hembra del grupo y si la hembra se echa, éste se posiciona sobre ella e introduce el pene dentro de la vagina y luego en la cérvix con movimientos de todo el cuerpo y de las extremidades anteriores; luego el macho se mueve hacia adelante y atrás tratando de acomodar el pene dentro de los cuernos uterinos de la hembra (Olarte *et al.*, 1988).

La alpaca macho es capaz de desarrollar una inmensa actividad copulatoria, esta actividad es mayor durante los primeros días pero disminuye lentamente a medida que transcurre el tiempo de permanencia junto con las hembras y es mucho menor durante la segunda mitad del empadre que dura 45 a 60 días (Olarte *et al.*, 1988).

### **2.3. Componentes del semen.**

El semen es el líquido germinativo del macho, debido a que contiene los gametos masculinos, que se deposita en la vagina de la hembra durante la cópula o puede recogerse por medios artificiales para su estudio, almacenamiento y/o en inseminación artificial (Evans, 1990).

El semen está compuesto por espermatozoides y plasma seminal; los túbulos seminíferos proveen los componentes celulares (espermatozoides) y las glándulas accesorias, que proveen la mayor parte de la porción líquida (plasma seminal)

(Evans, 1990). En alpacas, la mayor parte de los eyaculados consta de plasma seminal 88.5 % y el 11.5 % consta de espermatozoides (Garnica *et al.*, 1993).

### **2.3.1. Espermatozoides**

Los espermatozoides son los gametos masculinos que se producen en los túbulos seminíferos del testículo, un espermatozoide es una célula altamente especializada y está formada por dos partes principales: cabeza y cola. La cabeza es plana y ovoide que contiene un núcleo formado por dos cromosomas, que contienen la carga hereditaria, la parte anterior de la cabeza está envuelta por una caperuza especial, llamada acrosoma, que contiene las enzimas necesarias para el proceso de fertilización (Evans, 1990); la cola o flagelo útil para su desplazamiento, está diferenciada en tres regiones: pieza proximal, pieza principal y pieza terminal. Se realizaron trabajos de morfometría, en el que se consideraron espermatozoides normales a los que presentaban una longitud de cabeza promedio de 5.47  $\mu$ , ancho de cabeza promedio de 3.4  $\mu$ , una longitud caudal promedio de 40.94  $\mu$  y una longitud total promedio de 46.03  $\mu$  respectivamente. (Gonzales *et al.*, 2010).

### **2.3.2. Plasma seminal.**

La porción líquida es el plasma seminal, las glándulas accesorias son los contribuyentes principales; sin embargo, una pequeña porción del líquido es secretado por el conducto deferente y el epidídimo (Bearden y Fuquay, 1982 y Evans, 1990). El plasma tiene tres funciones principales: (a) transportar a los espermatozoides desde el sistema reproductor del macho, durante la eyaculación. (b) sirve de activador a los espermatozoides, previamente no móviles (c) proporcionar un medio rico en nutrientes, tamponado, que colabora en mantener la supervivencia de los espermatozoides depositados en el aparato genital de la hembra (Evans, 1990).

El plasma seminal de los CSA es filante y muy viscoso, por lo tanto, cuando el eyaculado se pipetea, se forma un hilo de extensión variable (Bravo *et al.*, 2000, Morton *et al.*, 2009). Otra característica a tener en cuenta con respecto al plasma

seminal es la presencia de espuma en el eyaculado en la colecta con vagina artificial (Aller *et al.*, 2003, Giuliano *et al.*, 2008).

#### **2.4. Colección de semen.**

La dificultad en la colección del semen es atribuido entre otras causas, a las características peculiares de monta (posición de cúbito ventral), que dura entre 20 a 30 minutos, aproximadamente; además los animales son de temperamento nervioso, lo que dificulta su manejo (Fernández-Baca y Calderón, 1966).

##### **2.4.1. Métodos de extracción de semen de los C.S.A.**

Los primeros trabajos de colección de semen en camélidos sudamericanos (CSA) se hicieron con el uso de fundas vaginales (Mogrovejo, 1952), posteriormente se empleó la electroeyaculación (Fernández-Baca y Calderón, 1966), actualmente se emplea la vagina artificial con una cervix simulada y dentro de un maniquí en posición copulatoria (Sumar y Leyva, 1981).

El interés en desarrollar biotecnologías en los C.S.A. promovió el estudio y el uso de diferentes métodos de colección de semen, los cuales están condicionados por el tipo de monta que realizan estos animales; los métodos de colección que se han practicado hasta el momento son los siguientes:

##### **a) Fundas vaginales.**

Este método consiste en colocar dentro de la vagina una funda de látex (Mogrovejo, 1952) o un guante de polipropileno; se ha observado que este método prolonga el tiempo de la monta e inhibe la libido, ya que la presencia de la funda cortaría la cadena de reflejos de la eyaculación al no permitir la introducción del pene en los cuernos uterinos, pues puede producir lesiones en el tracto genital de las hembras o en la mucosa peneana, con la consecuente contaminación con glóbulos rojos debido a las lesiones en el tracto reproductivo de la hembra o del pene (Director *et al.*, 2004).

#### **b) Esponjas intravaginales.**

Este método consiste en colocar una esponja en la parte anterior de la vagina (San Martín *et al.*, 1968), los eyaculados se contaminan con secreciones de la hembra; presenta desventajas similares al uso de las fundas vaginales ya que interfiere con los movimientos del pene y la posibilidad de obtener una preñez no deseada es alta.

#### **c) Aspiración vaginal post cópula.**

Mediante este método es posible obtener muestras de semen por aspiración del fondo de la vagina después de la cópula, ya que una pequeña cantidad de semen es eyaculada allí, al momento de llevar el pene de un cuerno a otro. Este método no es invasivo ni tedioso, sin embargo la desventaja es que este semen es incompleto, contaminado y diluido con las secreciones del tracto genital de la hembra; pero, se podría usar este método para evaluar parámetros espermáticos como motilidad, morfología y vitalidad. La utilización de este semen para evaluar la fertilidad del macho es muy cuestionada (Pacheco, 2008).

Al realizar la comparación de las características seminales del método de vagina artificial y aspiración vaginal post cópula observó que el volumen, motilidad, y el número de espermatozoides vivos fueron superiores en el semen colectado por aspiración vaginal, en tanto que la concentración espermática fue superior en el semen obtenido con vagina artificial. Asimismo, el 90% de los eyaculados colectados con vagina artificial presentaron alta viscosidad en comparación con el 10% de los eyaculados recuperados por aspiración vaginal (Alarcón *et al.*, 2012).

#### **d) Lavado de epidídimo.**

Este método tiene como objetivo la colecta de espermatozoides directamente de su reservorio, el epidídimo; consiste en la separación quirúrgica de las mencionadas gónadas y la escisión de las colas epididimarias respectivas a las que se les extrae los espermatozoides que llevan en su interior usando como medio una solución

fisiológica buferada (PBS), obteniendo finalmente una suspensión de espermatozoides que se toma como muestra. Esta técnica está orientada principalmente al rescate del germoplasma de individuos muertos súbitamente, cuyas especies se encuentren en peligro de extinción y cuyas colectas de semen sean difíciles de realizar (Anel *et al.*, 2002)

#### **e) Vagina artificial.**

Este método fue implementado por primera vez por Sumar y Leyva (1981) en alpacas, construyeron un maniquí con la forma de una hembra colocada en posición de cópula, basándose en el hecho de que los machos de camélidos montan a toda hembra que adopte la posición de decúbito esternal; a partir de este primer trabajo se realizaron varios estudios para maximizar este método de recolección, es el método con mayor consenso entre los diferentes autores que trabajaban tanto en llama como en alpaca sin embargo, presenta el inconveniente de necesitar la cooperación del macho. Consecuentemente, pueden ser altos los porcentajes de rechazo (10 al 40 %) a la maniobra de extracción de semen, por indocilidad o falta de libido del macho (Aller *et al.*, 2003, Giuliano *et al.*, 2008); por otra parte los eyaculados extraídos mediante vagina artificial suelen contener espuma y/o impurezas (pasto, semillas, tierra) arrastradas por el pene o el prepucio (Aller *et al.*, 2003, Giuliano *et al.*, 2008).

La vagina artificial fue una modificación de la vagina artificial usada para vacunos y ovinos, (Vaughan *et al.*, 2003), ésta tiene que ser mantenida a la temperatura corporal de la hembra con el apoyo de una frazadilla eléctrica (Bravo *et al.*, 1997a) para permitir que el macho no interrumpa la cópula; el uso de este método ha facilitado el estudio del semen en camélidos sud americanos y actualmente, el nivel de conocimiento de la fisiología del espermatozoide es comparable a otras especies de granja (Bravo *et al.*, 2002).

La extracción de semen con el método de vagina artificial presenta la ventaja de no necesitar un equipo de costo elevado y que puede ser llevado a cabo por

técnicos especializados. Por otra parte, mediante VA se han obtenido preñeces con semen fresco y criopreservado (Bravo *et al.*, 2000; Aller *et al.*, 2003)

#### **f) Extracción de semen mediante electroeyaculación.**

La electroeyaculación es un método alternativo de colección de semen que no necesita de la cooperación del macho y que permite obtener eyaculados sin espuma y sin impurezas, mediante esta metodología se han extraído semen de las cuatro especies de CSA (Giuliano *et al.*, 2008, Vencato *et al.*, 2008).

Fernández-Baca y Calderón (1966), reportaron el uso de la electroeyaculación para la colección de semen de alpacas, utilizando un equipo de fabricación nacional, con una intensidad máxima de 40 voltios, se obtuvieron muestras de semen con la ventaja de realizar la colección sin la necesidad de tener hembras en celo, acortar el tiempo de colección y realizarla a lo largo de todo el año; Jhonson (1989) obtuvo semen de llamas anestesiadas o sedadas, se obtuvo pequeñas cantidades (0.1 a 0.5 ml) con alta concentración pero no todos los intentos fueron exitosos.

#### **g) Fístula uretral.**

Este método requiere realizar una fistula quirúrgica en la uretra peneana entre el ano y el escroto; el semen es colectado durante la cópula natural, esta técnica se realiza utilizando anestesia epidural y anestesia local para colocar un catéter plástico en la uretra desde el pene hasta la vejiga, el cual sirve para guiar la cirugía y ayuda a identificar la uretra; la incisión se realiza en la piel, el músculo Bulbo cavernoso aislado y se separa la uretra del cuerpo cavernoso (Kubiceck, 1974).

#### **h) Desviación de los conductos deferentes.**

Con el fin de colectar espermatozoides libres de la secreción de las glándulas anexas en alpacas, se desarrollaron las técnicas de la desviación de los conductos deferentes y la extirpación de la próstata; la primera técnica intenta colectar

espermatozoides directamente de su reservorio, la cola del epidídimo, sin que estos tengan contacto con las secreciones de las glándulas anexas, desviando quirúrgicamente los conductos deferentes hacia la región ventral del animal o la cara interna del muslo, formando una fístula permanente en la piel desde donde se puedan colectar continuamente sin la necesidad de tener hembra receptiva ni someter a los espermatozoides a la acción de enzimas proteolíticas que intenten licuefactar el coágulo del eyaculado para un mejor manejo espermático (Paricahua *et al.*, 2001; Quintano, 2002).

#### **i) Bulbourectomía.**

Este método fue desarrollada con la finalidad de obtener espermatozoides sin la secreción de las glándulas bulbouretrales, las cuales, son las encargadas de producir el material viscoso del semen entero, el cual causa gran dificultad en su manipulación; las características del semen obtenido se asemejan e incluso son superiores a las características del semen entero obtenido por vagina artificial, pero se indica una gran dificultad en la técnica quirúrgica por la ubicación de dicho órgano, lo que no permitió realizar este método, optándose por realizar la prostatectomía (Paricahua *et al.*, 2001).

### **2.5. Características seminales del eyaculado de los C.S.A.**

Es necesaria la evaluación de las características del semen para implementar planes de manejo reproductivo. Sin embargo es destacable que con respecto a las características seminales del eyaculado de los camélidos sud americanos, varios autores (Bravo *et al.*, 2000, Aller *et al.*, 2003, Huanca *et al.*, 2007) han coincidido en que la implementación de métodos de evaluación tradicionales del semen se ha visto dificultada por la viscosidad del plasma seminal, la baja movilidad espermática individual y la baja concentración espermática. Por lo tanto se hizo necesario implementar nuevos test de evaluación de la calidad seminal ya que al carecer de movilidad progresiva espermática, esta característica no podría ser utilizada como indicador de la fertilidad del eyaculado de los

camélidos sud americanos, con este objetivo, se implementaron test de evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides de llama (Giuliano *et al.*, 2008).

#### **a) Tiempo de cópula.**

La cópula usualmente dura 20 - 25 minutos, con un rango de 5 - 65 minutos, el tiempo de cópula es determinada por el macho y es afectada por la raza, edad, estación y frecuencia de uso (Tibary y Memon 1999). La presencia de otros camélidos influenciará la longitud de cópula (Johnson 1989).

Los estudios diversos han mostrado apareamientos a ser más largos en el otoño que la primavera (England *et al.*, 1971; Pollard *et al.*, 1995). La duración de cópula promedio de los servicios fértiles es significativamente más prolongada que la de los servicios que no son fértiles (Condorena *et al.*, 1972).

### **2.5.1. Características macroscópicas del semen.**

#### **a) Color.**

El color va de cristalino a blanco lechoso, dependiendo mucho de la concentración espermática (Von Baer y Hellemann 1999), Pacheco *et al.* (2013) reportó los colores del eyaculado, habiendo colectado con V.A., que van de blanco cristalino, blanco lechoso y blanco opaco, ver (imagen 13), los eyaculados de alpacas extraídos mediante V.A. suelen contener impurezas del suelo (Aller *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2008).

#### **b) Volumen de eyaculado.**

El volumen de eyaculado varía de acuerdo a la técnica de obtención utilizada, a la individualidad y de una colección a otra. El volumen del eyaculado de alpaca obtenido mediante vagina artificial presentó un rango de 0,4 a 4,3 ml, con un promedio de  $1,7 \pm 0,2$  ml (Garnica *et al.*, 1993).

### **c) Volumen de espuma.**

La apariencia espumosa observada en los eyaculados podría deberse al continuo movimiento del pene en sentido cefálico caudal y con rotación simultánea del pene dentro de la vagina artificial. La abundante espuma que presenta, aun bastante tiempo después de la colección, y cuya desintegración hace disminuir a la mitad el volumen seminal medido inicialmente (Von Baer y Hellemann 1998).

Los informes previos de von Baer y Hellemann (1998) y Aller *et al.*, (2003) también reporta la colección de eyaculados con espuma al utilizar la vagina artificial, von Baer y Hellemann (1998) descartaron estos eyaculados mientras que Aller *et al.*, (2003) usaron estos en sus valoraciones. Los eyaculados extraídos mediante V.A. suelen ser muy espumosos (Giuliano *et al.*, 2008).

### **d) Filancia.**

El plasma seminal de los CSA es filante y muy viscoso. Por lo tanto, cuando el eyaculado se pipetea, se forma un hilo de extensión variable (Bravo *et al.*, 2000, Morton *et al.*, 2009); la viscosidad del plasma seminal de los CSA ha sido rutinariamente evaluada utilizando técnicas subjetivas tales como la medición del hilo formado al pipetear la muestra de semen (Bravo *et al.*, 1999; Bravo *et al.*, 2000). La formación de hilo no refleja a viscosidad del semen, sino que se está evaluando la filancia del mismo, que se define como la capacidad de formación de hilo y es por lo tanto, una característica reológica diferente a la viscosidad.

## **2.5.2. Características microscópicas del semen.**

### **a) Motilidad de los espermatozoides.**

Los métodos tradicionales de estimación de la calidad de los eyaculados de diferentes especies se han basado principalmente en la evaluación de la movilidad individual, la morfología espermática y el número total de espermatozoides; debido a que estas características han tenido una capacidad limitada para predecir la fertilidad de los eyaculados se han desarrollado métodos para la evaluación de

la integridad funcional de la membrana espermática, pues los espermatozoides de CSA no presentan movilidad progresiva fue necesario determinar si en el eyaculado existe una población de espermatozoides inmóviles con las membranas funcionales e íntegras; al realizar pruebas de asociación entre movilidad espermática, funcionalidad e integridad de membrana se determinó que en el semen de llama hay una importante población de espermatozoides inmóviles con las membranas funcionales e intactas (Giuliano *et al.*, 2008). Por lo tanto, se ha podido establecer que el porcentaje de movilidad espermática no sería un estimador de la calidad del eyaculado y que la presencia de espermatozoides inmóviles o con poca movilidad sería una condición inherente o propia de estas especies.

Es característico de los eyaculados de los camélidos sudamericanos, que los espermatozoides solo presentan movilidad en el lugar u oscilatoria, o que carezcan por completo de movilidad (Lichtenwalner *et al.*, 1996, Vaughan *et al.*, 2003, Giuliano *et al.*, 2008); la motilidad del semen de alpaca obtenida por vagina artificial es baja correspondiendo a la calificación de regular (57.29 %) con movimientos oscilatorios en el mismo lugar (Sumar, 1997; Flores, 1993; Garnica *et al.*, 1993). (Vencato *et al.*, 2008) reportaron un porcentaje (promedio  $\pm$  DE) de  $33 \pm 12$  %.

#### **b) Concentración.**

Se ha reportado una gran variabilidad en la concentración espermática del semen de CSA, se han observado rangos entre 1 y 150 millones de espermatozoides/ml (Vaughan *et al.*, 2003).

#### **c) Pruebas de integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoide.**

Las membranas biológicas de las células de mamífero están constituidas bajo un patrón común, conteniendo en su estructura proteínas, lípidos (principalmente fosfolípidos), colesterol y glúcidos, la proporción de fosfolípidos, proteínas y

glúcidos presentes en la membrana plasmática de las células espermáticas es característica de cada especie (Darnell *et al.*, 1988) y varía dependiendo del estado fisiológico en el que se encuentre (Curry y Watson, 1995; Lin y Kan, 1996).

Todos los espermatozoides de mamíferos poseen una membrana plasmática continua dividida en cabeza y cola; la membrana que rodea la porción cefálica se puede considerar a su vez a tres regiones: 1) membrana que recubre la región acrosomal, por donde dará comienzo la vesiculación y fusión durante la reacción acrosómica; 2) Zona ecuatorial, lugar donde las membranas acrosomal y plasmática se fusionan durante la reacción acrosómica; 3) región post-acrosómica. La membrana que protege el flagelo presenta dos dominios: 1) pieza intermedia; 2) pieza principal (Curry y Watson, 1995).

La membrana plasmática del espermatozoide está sujeta a cambios en su composición durante su paso por el epidídimo, en el momento de la eyaculación (interacciones específicas con compuestos procedentes de las distintas glándulas accesorias) y en el transcurso de la capacitación (Curry y Watson, 1995; Hammersted *et al.*, 1990).

La correlación tan baja entre vitalidad y endósmosis nos estaría indicando que la presencia de espermatozoides vivos no necesariamente indica que estos espermatozoides sean funcionales, por lo que es necesario realizar el Test hipoosmótico en semen de alpacas en las evaluaciones seminales rutinarias, similar a lo reportado en otras especies (Petrunkina *et al.*, 2007).

### **c.1) Endósmosis.**

La reacción acrosómica es un requisito para la penetración del espermatozoide al ovulo; ocurre la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa y resulta en la destrucción total de la membrana plasmática por su fusión con la membrana acrosomal externa, esta reacción se realiza para permitir la gradual penetración del espermatozoide en las cubiertas del ovulo (Ramalho-Santos, J. *et al.*, 2002). El test de endósmosis ha sido reportado también en espermatozoides de alpaca (Vázquez *et al.*, 2012).

Uno de los métodos que se ha empleado para evaluar la calidad de los eyaculados de diferentes especies es el test de endósmosis (Jeyendran *et al.*, 1984). La prueba de permeabilidad de membrana endósmosis está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática; la inclusión de células espermáticas en una solución hipo osmótica provoca el paso del agua a través de la membrana desde el medio extra celular hacia el interior del espermatozoide hasta alcanzar su equilibrio osmótico (Eckert *et al.*, 1989); observándose cambios morfológicos a nivel de la cola, si la membrana se encuentra dañada o se ha vuelto altamente permeable, no se observan dichos cambios. Cuando los espermatozoides son sometidos a un medio de elevada hipotonicidad y alcanzan su volumen crítico, la membrana plasmática se rompe y el flagelo se endereza bruscamente, pudiendo variar su morfología posteriormente desde recta o ligeramente curvada o totalmente simosa (Jeyendran *et al.*, 1984; Cortés *et al.*, 1993); la respuesta al Test hipoosmótico realizado en espermatozoides frescos de alpaca con solución hipo osmótica de 150 mOsmol es similar si se incuban los espermatozoides a 30 y 60 minutos y no tiene relación con la vitalidad. Así mismo la presencia de anomalías espermáticas y gotas citoplasmáticas no influyen en la respuesta endosmótica en alpacas. (Pacheco *et al.*, 2011)

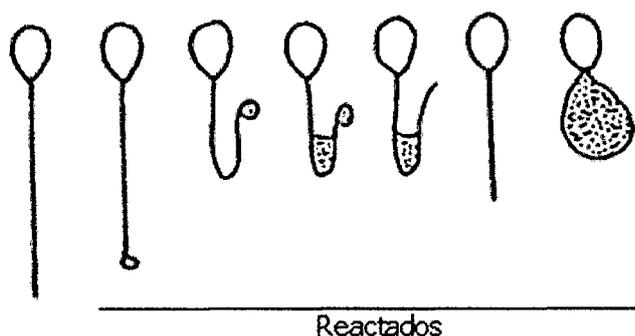


Fig. 01 se aprecia el primer espermatozoide con membrana alterada o dañada y a espermatozoides con integridad funcional de membrana intacta, reactivados al test de endósmosis.

Fuente: Jeyendran *et al.*, 1984

### **c.2) Vitalidad.**

La viabilidad espermática depende de la membrana plasmática y de la actividad biosintética del espermatozoide, actualmente existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descrito numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática como por ejemplo la eosina-nigrosina (Colas, 1980); de tal manera que si el espermatozoide está vivo la membrana celular actúa como barrera impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse (Hafez, 1996).

La menor proporción de espermatozoides vivos por el método de vagina artificial podría indicar un efecto adverso de las fundas de látex usadas en la vagina artificial; este efecto negativo ha sido sugerido en alpacas (Urquieta *et al.*, 2005).

### **d) Morfología espermática.**

Con respecto a la evaluación de la morfología espermática de los CSA, hay diferencias estadísticamente significativas entre machos en el porcentaje de espermatozoides normales y que esta variabilidad también se vio reflejada en el rango de los coeficientes de variación de cada macho (Giuliano *et al.*, 2008). Todas las anormalidades de espermatozoides encontradas en otro ganado doméstico pueden ser encontradas en camélidos; sin embargo, la frecuencia de anormalidades es superior en semen del camélido que sería considerado aceptable para otras especies domésticas (Tibary y Memon 1999). Se reporta un promedio general de 25.98 % de espermatozoides anormales de los cuales 15.76 % son anormales primarios y 10.22 % anormales secundarios (Quintano, 2002).

Cabe recordar que por definición, un defecto primario es aquel que se origina durante la espermatogénesis dentro del testículo y un defecto secundario, el que se origina dentro del epidídimo o en el laboratorio.

La coloración de eosina y nigrosina es ideal para evaluar la morfología espermática dado que al carecer de pasos de lavado, todo lo que está en el semen se descubrirá en el frotis.

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR Y UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.**

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata, del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Distrito de Santa Lucía, Provincia de Lampa, Departamento de Puno, a una altitud promedio de 4,300 msnm, en la zona agroecológica de puna seca, donde la temperatura fluctúa entre 3,8°C (época seca) y 8° C (época de lluvia), precipitación pluvial promedio de 115.80mm. (INIA, 2005). El presente trabajo se realizó durante los meses de Noviembre y Diciembre del año 2012.

#### **3.2. LUGAR DE PROCESAMIENTO LABORATORIAL.**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de biotecnología reproductiva del Centro de Investigación y Producción Quimsachata del Instituto Nacional de Innovación Agraria - Puno.

#### **3.3. DE LOS ANIMALES.**

Se utilizaron 6 alpacas machos de la raza Huacaya de edades comprendidas entre 5 a 8 años, con peso promedio de 59 kg. con las seis alpacas machos se trabajó tanto en el grupo control como en el grupo GnRH, realizando seis repeticiones en cada grupo.

#### **3.4. DE LA ALIMENTACIÓN.**

Los animales en el periodo de trabajo experimental (Noviembre y Diciembre), fueron sometidos a un sistema de alimentación mixto, durante el día fueron

alimentados en el bofedal y por las tardes se trasladaban a los corrales, en donde se suplementó con dos pacas de heno de avena (12 Kg) cada dos días.

### **3.5. DURACIÓN DEL TRABAJO.**

El presente estudio tuvo una duración de dos meses, periodo comprendido de Noviembre y Diciembre del 2012, comprendió las siguientes fases:

**3.5.1. Fase pre-experimental.-** Tuvo una duración de 1 mes y comprendió la ejecución de las siguientes actividades:

- Se seleccionaron 6 alpacas machos de 5 a 8 años de edad, de la raza Huacaya, teniendo como característica primordial el interés por el maniquí, el cual nos permitió evaluar la libido de los machos y su capacidad de servicio.
- Se realizó un examen clínico de los reproductores, evaluando aspectos de salud y principalmente una evaluación de los órganos reproductores externos, (tamaño, forma, consistencia y la elasticidad de los testículos y epidídimo), también se inspeccionó las posibles anormalidades en prepucio y pene.
- Los machos seleccionados fueron adiestrados por 15 días para la colección de semen y luego un descanso de una semana.
- La colección de semen fue mediante una vagina artificial con frazadilla eléctrica.
- La alimentación de los animales fue en base a pasturas del bofedal, complementando con pacas de heno.

**3.5.2. Fase experimental.-** Esta fase duró un mes y comprendió las siguientes actividades:

- Se colectó semen de los animales del grupo control, con seis repeticiones.
- Al grupo experimental se aplicó 8 µg de Acetato de Buserelina, una hora antes de colectar el semen.
- El semen colectado mediante vagina artificial, fue debidamente rotulado para su identificación respectiva.
- Se evaluaron las características macroscópicas (color, volumen de semen, volumen de espuma, Filancia) y microscópicas (motilidad oscilatoria, concentración espermática, concentración promedio por eyaculado, espermatozoides con endósmosis, vitalidad y morfología espermática) de los eyaculados.
- Los datos obtenidos fueron analizados mediante el paquete estadístico SAS v. 9.2.

### **3.6. MATERIALES.**

#### **3.6.1. Material biológico.**

- Semen de alpacas.

#### **3.6.2. Materiales y equipos de laboratorio.**

- Cámara de Neubauer.
- Contador manual.
- Microscopio eléctrico.
- Platina térmica.
- Baño María.

#### **3.6.3. Hormona.**

- Hormona Liberadora de las Gonadotrofinas (GnRH) – *Conceptal<sup>R</sup>*.

#### **3.6.4. Materiales para colección de eyaculado.**

- Maniquí.
- Frazadilla eléctrica.
- Vagina artificial.
- Tubos de colección graduado de 15 ml.

### **3.7. METODOLOGÍA.**

#### **3.7.1. Procedimiento.**

##### **3.7.1.1. Obtención de muestras de eyaculado.**

La colección se realizó 1 hora después de aplicar 8 µg de acetato de Buserelina, la frecuencia de colección por cada uno de los animales fue interdiaria. El método de la vagina artificial utilizado, consta de un tubo de PVC de 20 cm en longitud y 7 cm en el diámetro, la cual tiene una válvula adaptada en el exterior, por la luz del tubo se adaptó una funda de látex recta, posterior a ello se adaptó la funda de látex cónica, con un tubo colector graduado y se sujetó con las ligas de goma elásticas. Se procedió a echar agua a 45°C por el extremo opuesto a la funda cónica de la vagina artificial, posterior a ello se insufló aire por la válvula para ejercer moderada presión; el agua se mantuvo entre 38 a 39 °C, gracias a la acción de la frazadilla eléctrica, la vagina artificial fue adaptada dentro del maniquí, la cual tiene en la parte trasera un orificio circular.

Terminada la cópula se retiró la vagina artificial, envuelta por una franela y frazadilla eléctrica transportándola inmediatamente hasta el laboratorio teniendo evitando que tenga contacto con la luz; en el laboratorio se retiró la frazadilla eléctrica luego la franela y se evaluaron las características macroscópicas, posterior a ello se coloca la muestra en baño maría a 37°C y se inició con la evaluación de las características microscópicas.

##### **3.7.1.2. Evaluación del eyaculado.**

La evaluación de semen se realizó en el laboratorio de Biotecnología reproductiva del centro de investigación y producción Quimsachata, manteniendo a una temperatura promedio de 37°C en baño maría hasta su procesamiento y evaluación.

##### **3.7.1.2.1. Evaluación macroscópica del eyaculado.**

Se observó el eyaculado en el laboratorio, tratando de evitar el contacto directo con la luz y se evaluaron las siguientes características color, volumen de semen, volumen de espuma, filancia.

### **Procedimiento:**

#### **a) Color.**

- Se apreció en el mismo tubo graduado y los colores fueron clasificados como blanco lechoso, blanco opaco, blanco translúcido.

#### **b) Volumen de semen.**

- El volumen del eyaculado fue determinado comparando con la escala del tubo colector graduado.

#### **c) Volumen de espuma.**

- Se apreció directamente el tubo colector graduado.

#### **d) Filancia.**

- Con ayuda de una jeringa con aguja se absorbió y dejó caer el eyaculado y se procedió a medir la distancia de ruptura del hilo formado al pipetear el eyaculado.

### **3.7.1.2.2. Evaluación microscópica del eyaculado.**

Se determinaron las siguientes características con la ayuda de un microscopio eléctrico determinándose: motilidad oscilatoria, concentración espermática, concentración promedio por eyaculado, espermatozoides con endósmosis, vitalidad y morfología espermática.

#### **a) Motilidad.**

- La motilidad espermática fue determinada tomando 10  $\mu$ l de semen en una lámina portaobjetos, cubriéndola con una laminilla y observando en un microscopio óptico con un objetivo de 40X.
- La motilidad se calificó como porcentaje de espermatozoides con movimiento oscilatorio en un campo microscópico.

**b) Concentración espermática.**

- La concentración espermática fue evaluada usando una cámara de Neubauer, la dilución en relación de 1:10. de acuerdo a la evaluación previa de la motilidad. Luego se llenó la cámara de Neubauer y se procedió con el conteo, cuando los espermatozoides se encontraron en reposo absoluto con un aumento microscópico de 40x. se procedió a contar los espermatozoides de todos los cuadrantes de la cámara de Neubauer.
- La concentración se obtiene de la siguiente fórmula:

$$C = N \times D \times 10\ 000$$

Donde:

C = Concentración por mililitro.

N = número total de espermatozoides contados.

D = grado de dilución 1:10.

10 000= factor de multiplicación del cuadrado principal "E".

- La concentración espermática se expresó en millones de espermatozoides por mililitro.

**c) Concentración promedio por eyaculado.**

- La concentración promedio por eyaculado se obtuvo, luego de multiplicar la concentración espermática por el volumen de eyaculado obtenido y se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$E = C \times \text{volumen del eyaculado}$$

Donde:

E = concentración promedio por eyaculado.

C = concentración ml.

**d) Endósmosis.**

- La preparación de la solución hipo-osmótica se realizó mezclando 0.73 gr. con 1.35gr. en 100 ml. de agua bidestilada.

- Se añadió 0.1 ml de semen en tubos de vidrio conteniendo 1.0 ml de solución hipo-osmótica, la cual fue preparada con citrato de sodio y fructosa, ajustada a 150 mOsmol, se procedió a incubar por 30 minutos en baño maría a 37°C.
- La evaluación se realizó con un microscopio eléctrico a un objetivo de 100x, la reacción fue detenida agregando 10 µl de formaldehído al 10 % se contaron no menos de 100 espermatozoides por muestra, observándose la presencia o no de patrones de endósmosis a nivel de cola.

**e) Vitalidad.**

- Se tomó 10 µl de semen para colocarla en una lámina porta objeto previamente calentada y se añadió 10 µl de colorante eosina (0.7%) y nigrosina (1%) y se procedió a mezclar cuidadosamente e inmediatamente se realizó un frotis y se dejó secar temperatura ambiente. Se contó en un microscopio óptico a 100X un mínimo de 200 espermatozoides, considerándose espermatozoides vivos aquellos donde el colorante no penetró en la cabeza.

**f) Morfología espermática.**

- Se colocó 10 µl de semen fresco no diluido en una lámina portaobjeto a la cual se le agregó 10 µl de colorante eosina (0.7%) y nigrosina (1%), para luego ser mezclada cuidadosamente y se realizó el frotis del semen; se dejó secar para luego observar al microscopio óptico a 100X, procediendo a caracterizar espermatozoides normales y anormales.

**3.7.2. Análisis estadístico.**

Para el análisis de las variables discretas (número de machos que aceptan al maniquí, número de colectas por condición del eyaculado y número de colectas de semen por color) fueron analizados en una tabla de contingencia mediante la

prueba de chi-cuadrado con corrección por continuidad cuya fórmula de acuerdo a (Kaps and Lamberson, 2004) es:

$$x_c^2 = \sum_{i=1}^f \sum_{j=1}^c \frac{\left( |o_{ij} - e_{ij}| - \frac{1}{2} \right)^2}{e_{ij}}$$

Dónde:

- $x_c^2$  = Es el valor de chi-cuadrado calculado
- $o_{ij}$  = Es el valor observado de la i-ésima fila, j-ésima columna
- $e_{ij}$  = Es el valor esperado de la i-ésima fila, j-ésima columna
- f = número de filas
- c = número de columnas.

Para el análisis estadístico de las variables continuas (Tiempo de cópula, volumen de semen, volumen de espuma, filancia, motilidad, concentración, concentración promedio por eyaculado, endósmosis, vitalidad, anormalidades) se utilizó el modelo lineal mixto, donde el factor fijo fue el tratamiento (Control y GnRH) y el factor aleatorio fue el macho; el factor macho se considera en los modelos de análisis de datos de características del semen de alpacas, debido a que el factor macho influye en la mayoría de las características del semen (volumen de semen, filancia, motilidad, concentración, concentración promedio por eyaculado, espermatozoides normales, anormalidades de cola, Huanca *et al.*, (2011). Éste modelo en notación matemática de acuerdo a (Kaps and Lamberson, 2004) fue:

$$y_{ijk} = \mu + a_i + t_j + at_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

- $y_{ijk}$  = Son las variables respuestas (Tiempo de cópula, volumen de semen, volumen de espuma, filancia, motilidad, concentración, concentración promedio por eyaculado, endósmosis, vitalidad, anormalidades).
- $\mu$  = Media general o constante común de cada variable.
- $a_i$  = Efecto aleatorio del macho.
- $t_j$  = Efecto fijo del tratamiento (Control y GnRH).
- $at_{ij}$  = Efecto de la interacción macho x tratamiento.

$\varepsilon_{ijk}$  = Error experimental de cada variable.

Las variables: tiempo de cópula, motilidad, concentración y concentración promedio por eyaculado, antes del análisis estadístico fue transformado al  $\log_{10}$ ; sin embargo las variables volumen de semen, volumen de espuma, filancia, anormalidades, fueron transformados a  $\sqrt{x+1}$ .

Para el análisis de los datos se ha utilizado el programa estadístico SAS® (SAS 9.2, Institute. Inc., Cary, NC, USA).

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se dan a continuación:

#### 4.1. DEL TIEMPO DE CÓPULA.

**Cuadro 4.3. Tiempo de cópula (minutos).**

Grupo	N	Promedio $\pm$ D. E. (min)	Mínimo – Máximo
Control	21	$16.29 \pm 7.25$	6 – 29
GnRH	27	$17.67 \pm 8.64$	7 – 49
Total	48	$17.06 \pm 8.01$	6 – 49

Los resultados del (cuadro 4.3) demuestran que los tiempos de cópula promedio para el grupo GnRH y control fueron 17.67 y 16.29 minutos respectivamente, estos resultados demuestran que en el tiempo de cópula de alpacas, por efecto de la hormona GnRH, no existe diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ).

El resultado del efecto de la hormona GnRH en el tiempo de cópula, al contrastar con trabajos previos de colección de semen mediante vagina artificial, es similar a los reportes de Dávalos *et al.*, (2002) y Bravo *et al.*, (1997a) quienes obtuvieron  $15.9 \pm 0.6$  min y 15.3 min respectivamente, sin embargo el resultado es superior al reporte de Flores *et al.*, (2002) que obtuvieron un promedio de  $12.3 \pm 7.2$  min.

El incremento del tiempo de cópula probablemente es debido a que la hormona GnRH estimula a las células de Leydig a producir Testosterona, que estaría causando un incremento de los niveles plasmáticos en los machos; el

mantenimiento de las características sexuales secundarias y del comportamiento sexual o libido del macho es controlado por andrógenos (Hafez, 1996).

## 4.2. DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL EYACULADO.

### 4.2.1. Color (%).

**Cuadro 4.4. Proporción y porcentaje de color de semen.**

Grupo	B. translúcido	B. opaco	B. lechoso
Control	3/21 (14.29 %)	6/21 (28.57 %)	12/21 (57.14 %)
GnRH	-	10/27 (37.04 %)	17/27 (62.96 %)
Total	3/48 (6.25 %)	16/48 (33.33 %)	29/48 (60.05 %)

Los resultados (cuadro 4.4) demuestran que el eyaculado colectado por vagina artificial luego de la aplicación de GnRH, fue en mayor porcentaje el color blanco lechoso que estuvo presente en 62.96 %, seguido del color blanco opaco presentándose en 37.04 %, el color del eyaculado tanto en el grupo GnRH como en el grupo control tuvo una variación entre blanco translúcido y blanco lechoso, no existiendo diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ); el resultado del efecto de la hormona GnRH en el color de semen, al contrastar con trabajos previos de colección de semen mediante vagina artificial, es similar a los reportes de Alarcón *et al.*, (2012) y Bravo *et al.*, (1997b), quienes obtuvieron color blanco lechoso en un 60 % en semen colectado por vagina artificial; sin embargo los resultados obtenidos son contrarios al reporte de (Pacheco, *et al.*, 2013) pues las muestras de semen colectadas después de la aplicación de GnRH con una dosis de (50  $\mu$ g) obtuvieron un color blanco opaco 77.8 %, mientras que el 22.2 % de las muestras tuvieron un color blanco lechoso, esta variabilidad de color puede ser atribuida a la concentración de espermatozoides en el eyaculado (Urquieta *et al.*, 2005).

#### 4.2.2. Volumen de semen (ml).

**Cuadro 4.5. Volumen de semen, según grupo.**

Grupo	N	Promedio $\pm$ D. E. (ml).	Mínimo – Máximo
Control	21	1.17 $\pm$ 0.91	0.1 – 3
GnRH	27	1.56 $\pm$ 0.89	0.2 – 3
Total	48	1.39 $\pm$ 0.91	0.1 – 3

Los resultados (cuadro 4.5) demuestran que el volumen de eyaculado de alpacas machos tratados con GnRH fue de 1.56 ml. y el grupo control 1.17 ml., en el volumen de semen promedio en alpacas, por efecto de la hormona GnRH, no existe diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ); estos resultados obtenidos son similares al reporte de (Pacheco *et al.*, 2013), que obtuvo un promedio de 1.76 ml. de volumen de semen de machos tratados con dosis de (50  $\mu$ g) de GnRH; los resultados obtenidos son superiores al obtenido por (Castillo *et al.*, 2013) quienes reportaron 0.99 ml. en los grupos GnRH 1-5 y 1.02 ml. En el grupo GnRH-2, ellos trabajaron con diferentes dosis de GnRH en cada grupo; así mismo al comparar el resultado obtenido del volumen de semen con trabajos previos de colección con el método de vagina artificial, es similar con los reportes de Flores *et al.*, (2002), Garnica *et al.*, (1993), Alarcón *et al.*, (2012) y Bravo *et al.*, (1997a) quienes obtuvieron promedios de 1.8  $\pm$  0.8 ml; 1,7  $\pm$  0,2 ml; 1.5 ml y 1.5 ml respectivamente; el incremento del volumen de semen probablemente es debido al incremento de los niveles de Testosterona plasmática en los machos, producto de la aplicación de la hormona GnRH; que estaría promoviendo el desarrollo y actividad secretoria de los órganos sexuales accesorios, como próstata y glándulas bulbouretrales, conducto deferente y genitales externos (Hafez, 1996).

#### 4.2.3. Volumen de espuma (ml).

**Cuadro 4.6. Volumen de espuma, según grupo.**

Grupo	N	Promedio $\pm$ D. E. (ml)	Mínimo – Máximo
Control	21	3.14 $\pm$ 3.52	0 – 14
GnRH	27	2.94 $\pm$ 3.22	0 – 10
Total	48	3.03 $\pm$ 3.32	0 – 14

Los resultados (cuadro 4.6) demuestran que en el volumen de espuma promedio presente en el eyaculado de alpacas, por efecto de la hormona GnRH, no existe diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ).

Los informes previos de von Baer y Hellemann (1998) también reporta la colección de eyaculados con espuma al utilizar la vagina artificial.

#### 4.2.4. Filancia (cm).

**Cuadro 4.7. Filancia, según grupo.**

Grupo	N	Promedio $\pm$ D. E. (cm)	Mínimo – Máximo
Control	21	3.17 $\pm$ 2.34	0 – 8
GnRH	27	2.52 $\pm$ 2.41	0 – 7
Total	48	2.80 $\pm$ 2.38	0 – 8

Los resultados (cuadro 4.7) demuestran que el promedio de la filancia del eyaculado, para el grupo GnRH fue de  $2.52 \pm 2.41$  cm. y para el grupo control fue de  $3.17 \pm 2.34$  cm. en la filancia del eyaculado de alpacas, por efecto de la hormona GnRH, no existe diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ); el resultado presente trabajo, al contrastar con trabajos previos de colección de semen mediante vagina artificial, es superior a los reportes de (Huanca *et al.*, 2011) quienes reportaron un promedio de  $0,99 \pm 1,58$ cm.; sin embargo esta variabilidad de filancia difiere entre machos (Bravo *et al.*, 1997a).

### 4.3. DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL EYACULADO.

#### 4.3.1. Motilidad espermática (%).

**Cuadro 4.8. Motilidad, según grupo.**

Grupo	N	Promedio $\pm$ D. E. (%)	Mínimo – Máximo
Control	21	47.14 $\pm$ 19.91	10 – 80
GnRH	27	54.07 $\pm$ 18.14	30 – 95
Total	48	51.04 $\pm$ 19.05	10 – 95

Los resultados (cuadro 4.8) demuestran que la motilidad de semen promedio para el grupo GnRH fue **54.07 %**, y grupo control 47.14 %, en la motilidad espermática promedio en alpacas, por efecto de la hormona GnRH, no existe diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ); al comparar con reportes anteriores, el promedio es similar al de (Pacheco *et al.*, 2013) quien obtuvo un promedio de 45.22 %, luego de la aplicación de 50  $\mu$ g de GnRH; también es similar al reporte de (Castillo *et al.*, 2013) que observó 46.67 % y 41.69 % en los grupos GnRH-1 y 5, sin embargo reportaron para el grupo GnRh-2 35.50 % de motilidad que es inferior al promedio del presente trabajo; así mismo el porcentaje obtenido al contrastar con trabajos previos de colección de semen mediante vagina artificial es superior a los reportes Dávalos *et al.*, (2002) y Vencato *et al.*, (2008) quienes obtuvieron una motilidad de  $34.2 \pm 5.3$  % y  $33 \pm 12$  % respectivamente; pero es inferior a los resultados reportados por Bravo *et al.*, (1997b), Bravo *et al.*, (1997a) y Alarcón *et al.*, (2013) quienes obtuvieron promedios de motilidad de semen de alpaca de 85 %; 75.2 %; 69.0 % respectivamente; sin embargo esta baja motilidad probablemente es debido a que hubo mayor porcentaje de eyaculados viscosos, lo cual no permite una mayor motilidad y solamente se observa motilidad oscilatoria (Sumar, 1983).

### 4.3.2. Concentración ( $\times 10^6/\text{ml}$ ).

**Cuadro 4.9. Concentración, según grupo.**

Grupo	N	Promedio $\pm$ D. E. ( $10^6/\text{ml}$ )	Mínimo – Máximo
Control	21	65.43 $\pm$ 86.39	0.65 – 299.60
GnRH	27	51.57 $\pm$ 62.98	1.05 – 267.00
Total	48	57.63 $\pm$ 73.61	0.65 – 299.60

Los resultados (cuadro 4.9) demuestran que el promedio de concentración espermática en machos tratados con GnRH y control fue de **51.57** millones/ml y 65.43 millones/ml. respectivamente, en la concentración de espermatozoides por mililitro de semen promedio en alpacas, por efecto de la hormona GnRH, no existe diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ); el resultado es inferior al reporte de (Pacheco *et al.*, 2013) quien obtuvo un promedio de 110.38 millones/ml, luego de la aplicación de 50  $\mu\text{g}$  de GnRH; sin embargo el promedio obtenido es inferior al obtenido por (Castillo *et al.*, 2013) que reportan 88.33, 89.60, 74.29 millones/ml. en los grupos de GnRH 1,2 y 5 respectivamente, así mismo al comparar el promedio con trabajos de investigación previos colectando semen mediante vagina artificial, el promedio es inferior a los reportes de Huanca *et al.*, (2011) y Alarcón *et al.*, (2012), quienes encontraron valores de  $80,48 \pm 69,35$  y 80.3 millones/ml respectivamente; sin embargo es similar al reporte de (Bravo *et al.*, 1997a) quienes reportaron un promedio de 56.2 millones/ml. Pero el promedio obtenido es superior a los reportes de Flores *et al.*, (2002), Urquieta *et al.*, (1998) y Dávalos *et al.*, (2002) quienes reportaron promedios de  $17.6 \pm 26.1$ ; 8.3 y 5.8 millones/ml., respectivamente.

La concentración de espermatozoides varía aproximadamente 30,000 hasta 150 millones por ml., en alpacas de acuerdo a lo descrito por (Garnica *et al.*, 1995; Gauly y Leidinger 1996), las variaciones en la concentración de semen son atribuidas a diferencias en machos, métodos de colección de semen y frecuencia de copula según (Tibary y Memon 1999). La alpaca macho es capaz de producir eyaculados fértiles todo el año, pero al igual que en otras especies domésticas, la

calidad del semen, se ve afectado por la estación del año y la disponibilidad del alimento (Montalvo et al., 1977).

#### 4.3.3. Concentración promedio por eyaculado ( $\times 10^6$ /eyaculado).

**Cuadro 4.10. Concentración promedio por eyaculado, según grupo.**

Grupo	N	Promedio $\pm$ D. E. ( $10^6$ /eyaculado)	Mínimo – Máximo
Control	21	47.52 $\pm$ 66.61	0.07 - 270.60
GnRH	27	101.76 $\pm$ 159.53	0.79 - 667.50
Total	48	78.03 $\pm$ 129.25	0.07 - 667.50

Los resultados (cuadro 4.10) demuestran que la concentración promedio por eyaculado para el grupo GnRH fue de 101.76 millones/eyaculado, y del grupo control fue 47.52 millones/eyaculado, en la concentración promedio por eyaculado en alpacas, por efecto de la hormona GnRH, no existe diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ); el promedio fue superior al reporte de Huanca *et al.*, (2011), Bravo *et al.*, (1997a), Flores *et al.*, (2002) y Urquieta *et al.*, (1998), quienes reportaron los siguientes promedios  $87,30 \pm 96,37$ ;  $75,3$ ;  $34,0 \pm 52,2$ ;  $18,2$  millones/eyaculado respectivamente.

El incremento de la concentración promedio por eyaculado, probablemente es debido a que en el grupo GnRH se colectó un mayor volumen de eyaculado con respecto al grupo control, así como la aplicación de GnRH estaría causando el incremento de testosterona a los 60 minutos post aplicación de GnRH; evidenciando que el tratamiento con hormonas exógenas interfieren en el proceso de eyaculación y en la liberación de testosterona (Pacheco *et al.*, 2013), este incremento de los niveles de testosterona plasmática en los machos, por acción de la hormona GnRH, estimulan fases tardías de espermatogénesis y prolongan la vida de los espermatozoides epididimarios (Hafez, 1996).

#### 4.3.4. Endósmosis (%).

**Cuadro 4.11. Endósmosis, según grupo.**

Grupo	N	Promedio $\pm$ D. E. (10 <sup>6</sup> /ml)	Mínimo – Máximo
Control	21	42.19 $\pm$ 10.01	25 – 58.42
GnRH	27	59.37 $\pm$ 4.40	51.89 – 69.23
Total	48	51.85 $\pm$ 11.29	25 – 69.23

Los resultados (cuadro 4.11) demuestran que los espermatozoides con endósmosis para el grupo GnRH fue de 59.37 %, superior al grupo control 42.19 %, en los espermatozoides con endósmosis promedio en alpacas, por efecto de la hormona GnRH, fue altamente significativa ( $p < 0.01$ ); el promedio fue superior al reporte de (Pacheco *et al.*, 2013) quienes reportaron promedios de 34.4 %, luego de la aplicación de 50  $\mu$ g de GnRH; el resultado difiere con el último autor probablemente debido a la diferencia de dosis usada del análogo de GnRH. También es superior al promedio reportado por (Pacheco *et al.*, 2011) quien reportó un promedio de 23.59 % de endósmosis para los 30 minutos y 23.16 % para los 60 minutos de incubación, demostrando que no existe diferencia, si se incuba en 30 o 60 minutos. El porcentaje del presente trabajo de investigación se encuentra dentro del rango obtenido por (Giuliano *et al.*, 2010) (20 a 62 %) en semen de alpaca incubado durante 20 min.; sin embargo el porcentaje de endósmosis en el grupo GnRH es superior a lo descrito en el grupo control, probablemente es debido al incremento de la concentración de testosterona sérica tal como indica (Pacheco *et al.*, 2013), que estaría causando una alteración de la composición química de las secreciones prostáticas y bulbouretrales (Garnica *et al.*, 1993).

#### 4.3.5. Vitalidad (%).

**Cuadro 4.12. Vitalidad, según grupo.**

Grupo	N	Promedio $\pm$ D. E. (%)	Mínimo – Máximo
Control	21	66.50 $\pm$ 12.42	24.67 – 81.29
GnRH	27	71.11 $\pm$ 9.27	57.40 – 87.76
Total	48	69.09 $\pm$ 10.89	24.67 – 87.76

Los resultados (cuadro 4.12) demuestran que la vitalidad de los espermatozoides del grupo GnRH fue 71.11 %, y 66.50 % del grupo control, en los espermatozoides vitales promedio en alpacas, por efecto de la hormona GnRH, no existiendo diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ); el promedio del grupo GnRH es semejante al reporte de (Pacheco *et al.*, 2013) quien reportó un promedio de 64.4 %, luego de la aplicación de 50  $\mu$ g de GnRH. Así mismo es semejante a los reportes de Alarcón *et al.*, (2012), Bravo *et al.*, (1997b), Bravo *et al.*, (1997a) y Quintano *et al.*, (2002) quienes obtuvieron promedios de vitalidad de espermatozoides de alpaca de 70.8 %; 69.6 %; 65.3 % y 62.47 % respectivamente. Pero son superiores a los reportes de Huanca *et al.*, (2011) y Dávalos *et al.*, (2002) quienes obtuvieron una vitalidad de 52,32  $\pm$  19,18 % y 34.3  $\pm$  4.2 % respectivamente.

La menor proporción de espermatozoides vivos, podría indicar un efecto adverso de las fundas de látex usadas en la vagina artificial. Este efecto negativo ha sido sugerido en alpacas por Urquieta *et al.*, (2005) y en llamas por Giuliano *et al.*, (2008). Probablemente debido a que la presencia de espermatozoides vivos no necesariamente indican que estos espermatozoides sean funcionales (Petrunkina *et al.*, 2007).

#### 4.3.6. Anormalidades (%).

**Cuadro 4.13. Anormalidades, según grupo.**

Grupo	N	Promedio ± D. E. (%)	Mínimo – Máximo
Control	21	28.91 ± 12.41	13.61 – 58.88
GnRH	27	24.61 ± 15.36	5.79 – 62.98
Total	48	26.49 ± 14.16	5.79 – 62.98

Los resultados (cuadro 4.13) demuestran que los espermatozoides anormales promedio para el grupo GnRH fue 24.61 %, es ligeramente inferior al grupo control 28.91 %, en los espermatozoides anormales promedio en alpacas, por efecto de la hormona GnRH, no existiendo diferencia significativa ( $p \geq 0.05$ ); este promedio es similar al reporte de (Pacheco *et al.*, 2013) quienes obtuvieron un promedio de 27.2 %, luego de la aplicación de 50  $\mu\text{g}$  de GnRH; también es semejante al reporte de Huanca *et al.*, (2011), Pacheco *et al.*, (2011), Bravo *et al.*, (1997a) y Bravo *et al.*, (1997b), quienes reportaron promedios de 26.61 %; 26.378 %; 26.3 %; 24.1 % respectivamente; pero es superior al reporte de (Dávalos *et al.*, 2002), quienes reportan promedios de  $14.9 \pm 1.1$  %; a la vez es inferior al reporte de Urquieta *et al.*, (1998) y Flores *et al.*, (2002) quienes encontraron valores de 31.4 % y 49 % respectivamente; en la alpaca el porcentaje de espermatozoides normales no es afectado por la frecuencia de eyaculación (Bravo *et al.*, 1997a), la frecuencia de anormalidades es superior en semen de camélidos que sería considerado aceptable para otras especies domésticas (Tibary y Memon 1999).

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES**

1. La aplicación de 8  $\mu\text{g}$  de Acetato de Buserelina antes de realizar la colección de semen, no causa variación en los parámetros seminales macroscópicos, sin embargo tuvo efecto sobre la endósmosis, con diferencia altamente significativa; sin embargo no causa variación en el resto de los parámetros seminales microscópicos, siendo similares al grupo control.
  
2. La aplicación de 8  $\mu\text{g}$  de Acetato de Buserelina antes de realizar la colección de semen, no causa variación en los parámetros seminales macroscópicos, siendo similares al grupo control.
  
3. La aplicación de 8  $\mu\text{g}$  de Acetato de Buserelina antes de realizar la colección de semen, a la evaluación de las características microscópicas, tuvo efecto sobre la endósmosis, con diferencia altamente significativa; sin embargo no causa variación en el resto de los parámetros seminales microscópicos, siendo similares al grupo control.

## **CAPÍTULO VI**

### **RECOMENDACIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se recomienda lo siguiente:

1. Validar este trabajo en campo tanto en empadre controlado así como en trabajos de inseminación artificial.
  
2. Evaluar diferentes dosis de la hormona GnRH que permita conocer la dosis ideal con la cual se obtenga mejores resultados en las características seminales de la alpaca.
  
3. Evaluar siempre la permeabilidad de la membrana espermática, pues es muy importante en el momento de decidir si el eyaculado será útil para poder realizar una inseminación artificial.

## CAPÍTULO VII

### REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1) **Arthur, GH. 1992.** An overview of reproduction in the camelids, in. WR Allen, AJ Higgins, IG Mayhew, DH Snow and JF Wade (eds), Proc. First International Camel Conference R & W Publications Ltd, Newmarket, UK.
- 2) **Alarcón V., García W., Bravo P. W. 2012.** Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, Lima, 23(1).
- 3) **Aller J.F., Rebuffi G.E., Cancino A.K., Alberio R. H. 2003.** Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch. Zootec. 52: 15-23.
- 4) **Anel L, Gerra C, Alvarez M, Anel E, Martínez A, Boixo C, Kaabi M, Herraez P, Paz P. 2002.** Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*). Theriogenology 57: 577.
- 5) **Bearden, H.J. Y Fuquay, J. 1982.** Reproducción animal aplicada. Edit. el manual moderno. México, d. f.
- 6) **Bravo, W., Flores, D., Ordóñez, C. 1997a.** Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. Biol. Reprod. 57, 520–524.
- 7) **Bravo, W., Flores, U., Garnica, J., Ordóñez, C. 1997b.** Collection of semen and artificial insemination of alpaca. Theriogenology 47, 619–626.
- 8) **Bravo P. W., Pacheco C., Quispe G., Vilcapaza L., Ordoñez C. 1999.** Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. Arch. of androl. Vol 43:239-246.
- 9) **Bravo P. W., Callo P. Garnica J. 2000.** The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. Small ruminant research. 38: 91-95.

- 10) Bravo, W., Moscoso, R., Alarcón, V. y Ordoñez. 2002.** Ejaculatory process and related semen characteristics of llamas and alpacas. *J. of Androl.* 48:65-72.
- 11) Castillo R., Olazabal J., Evangelista S., Ruiz L., Santiani A. 2013.** Efecto de la GnRH exógena en los niveles séricos de testosterona y calidad seminal en alpacas. *Revista spermova. Lima-Perú.* 3: 91-92.
- 12) Colas, G. 1980.** Variations saisonnières de la qualité du spermachez le Bélierllede - France. 1. etude de la morfologie cellulaire et de la motilité massale. *reprod. nutr. développ.*
- 13) Condorena N, Fernández-Baca S. 1972.** Relación entre frecuencia de servicios y fertilidad en la alpaca. *Rev Inv Pec (IVITA) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.* 1: 11-19.
- 14) Cortés S, Nuñez R, Y Vásquez, I. 1993.** Capacidad de reacción del espermatozoide de macho cabrio a la prueba de la endósmosis. 5° simposium internacional reproducción animal. Luso-Potugal. Vol. II,
- 15) Curry, M; y Watson, P. 1995.** Sperm structure and function. In. *Gametes – The spermatozoon.* G, J. G. y Yovich. J.L., Ed. Cambridge University Press.
- 16) Darnell, J.; Lodish, H; y Baltimo, D. 1988.** *Biología celular y molecular.* Ed. Labor S.A.
- 17) Davalos, R y Olazabal, J. 2002.** Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 13 (2): 98-99.
- 18) Director A., Giuliano, S., Miragaya, M., 2004.** Evaluation of llama (*Lama glama*) semen obtained by electroejaculation or using an artificial vagina. In: *Proceedings of the 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*, p.216.
- 19) Eckert, R; Randall, D; y Augustine, G. 1989.** *Fisiología animal.* Ed. McGraw-Hill-Interamericana.
- 20) Elwishy, AB. 1988.** Reproduction in the male Dromedary (*Camelus dromedarius*): a review, *Anim. Reprod. Sci.* vol. 17, pp. 217-241.
- 21) England, BG, Foote, WC, Cardozo, AG, Matthews, DH, and Riera, S. 1971.** 'Oestrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). *Animal Behaviour* vol. 19, pp. 722-726.

- 22) Evans. G. 1990.** Inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed. Acriba. S.A. España.
- 23) Fernández-Baca, S. y Calderón, M. 1966.** Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev Fac Med Vet Univ Nac Mayor de San Marcos* 18–20:13-26.
- 24) Fernández-Baca, S. 1971.** La alpaca, reproducción y crianza. Centro de investigación instituto veterinario de investigaciones tropicales y de altura (IVITA). Dirección de investigación Universidad Nacional Mayor de San Marcos. boletín de divulgación No. 7, Lima, Perú, pp. 8–26
- 25) Fernández-Baca, S., Sumar, J., Novoa, C. 1972.** Comportamiento sexual de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. *Rev Inv Pec IVITA* 1(2):115-128.
- 26) Fernández-Baca, S. 1991.** Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe (Santiago, Chile).
- 27) Fernández-Baca, S., 1993.** Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 307–323.
- 28) Flores L. 1993.** Fructuosa y ácido cítrico en el plasma seminal de la alpaca. tesis universitaria. F.M.V.Z. UNA – Puno. Perú.
- 29) Flores P., García-Huidobro J., Muñoz C. B, Bustos-Obregón E., Urquieta B. A. 2002.** Alpaca semen characteristics previous to a mating period *Animal Reproduction Science* 72: 259–266.
- 30) Galloway, DB. 2000.** The development of the testicles in alpacas in Australia. Paper presented to proceedings of the Australian alpaca association conference Canberra, Australia.
- 31) Galina, C. 1995.** Reproducción de animales domésticos, ed. Limusa, S. A.; 4ª edición.
- 32) Garnica J., Achata R., Bravo W. 1993.** Physical and biochemical characteristic of alpaca semen. *Anim Reprod Sci* 32: 85-90.
- 33) Garnica, J, Flores, E., Bravo, PW. 1995.** 'Citric acid and fructose concentrations in seminal plasma of the alpaca', *Small Ruminant Res.* vol. 18, pp. 95-98.
- 34) Gauly, M and Leidinger, H. 1996.** Semen quality, characteristic volume distribution and hypo-osmotic sensitivity of spermatozoa of *Lama glama* and

Lama guanicoe. Proceedings of the 2nd European Symposium on South American camelids.

- 35) Giuliano, S.; Director, A.; Gambarotta, M.; Trasorras, V. and Miragaya, M. 2008.** Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). Anim Reprod Sci. 104, pp 359-369.
- 36) Giuliano S., Casaretto, C., Morán, M., Huanca, W. 2010.** Electroeyaculación y características seminales de alpaca .III Simposium internacional de investigaciones sobre camélidos. organizado por desco centro de estudios y promoción del desarrollo septiembre, Arequipa, Perú.
- 37) Gonzales H., Davalos R., Moína M., Mellisho E., 2010.** Obtención y criopreservación de alpacas. Scientia vol X. N° 10, pp 223-234. Perú.
- 38) Hafez, E. 1996.** Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Edit. McGraw Hill Interamericana, 6° edición. México – D.F.
- 39) Hafez E. S. E., Hafez B. 2000.** Reproduction in Farm Animals. Edit. McGraw Hill Interamericana, 7° edición. México – D.F.
- 40) Hammerstedt, R.; Graham J.; Nolan J. 1990.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J. Androl.
- 41) Huanca W., Cordero A., Huanca T., Adams G. 2007.** Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: avances y perspectivas. Arch. Latinoam. Prod. Anim.
- 42) Huanca T., Mamani R. H., Naveros M. L., Pacheco J. I, Condori N. 2011.** Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*vicugna pacos*) spermova 1(1): pp 98-100.
- 43) Illera, M. 1994.** Reproducción de los animales domésticos. ed. Aedos, 1°edición. España.
- 44) INIA. Editorial. (Publicación en línea) 2005 (Consultado: 09 de octubre del 2012) Disponible en la web: [www.inia.gob.pe/boletin/boletin0013/tecnag.htm](http://www.inia.gob.pe/boletin/boletin0013/tecnag.htm).**
- 45) Jeyendran R.S., Van Der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Grabo B.G., Zenaveld L.J. 1984.** Development of an assay to Access the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J. Reprod Fert 70: pp 219-228.

- 46) Johnson L.W. 1989.** Llama reproduction. In Johnson, L.W.(ed). Vet. Clinic of North America. Food Anim. Practice W.B. Saunders Co. Philadelphia PA.
- 47) Kaps, M. And Lamberson W. R. 2004.** Biostatistics for animal science. cabi publishing, Cambridge, USA.
- 48) Kubiceck, J. 1974.** sanementnahme beim alpaka durch eine harnrihrenfistel. Z Tierzuechtung Zuechtungsbiologie 90:335.
- 49) Lichtenwalner AB, Woods GL, Weber JA. 1996.** Ejaculatory patterns of llama during copulation. Theriogenology 46: pp 285-291.
- 50) Lin, Y: y Kan, F. 1996.** Regionalization and redistribution of membrane phospholipids and cholesterol in mouse spermatozoa during in vitro capacitation. Biol. Reprod. Edit. Diana – Madrid 2º edición.
- 51) Miller C.J.; Amman RP. 1986.** Effects of pulsatile injection of GnRH into 6-14 Weeks olds Holstein bulls. J Anim. Sci. 62, pp 1332-1339.
- 52) Mogrovejo, D. 1952.** Estudio del semen de la alpaca. tesis de bachiller. facultad de medicina veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. Lima Perú, FAO.
- 53) Montalvo c, Cevallos E, Copaira N. 1977.** Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. In: proc V Cong Nac de Cienc Veterinarias, Arequipa, Perú.
- 54) Morton KM, Thomson PC, Bailey K, Evans G, Maxwell W.M. 2009.** Quality Parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure. reprod. domest. Anim. pp 8.
- 55) Novoa, C. 1970.** Reproduction in camelidae, j. reprod. fertil. vol. 22, pp. 3-20.
- 56) Olarte, U. y Melo, M.A. 1988.** Edad, peso vivo y tamaño del testículo en el desprendimiento pene-prepucio en alpaca. VI Conv. Inter. Espec. Cam. Sud. Oruro- Bolivia.
- 57) Pacheco J. 2008.** Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. REDVET 9(4): 1-17.
- 58) Pacheco, J.I; Deza, H.W; Mamani - Cato, R, H; y Quispe, Y.E. 2011.** Evaluación de la respuesta al test hipo osmótico en espermatozoides frescos de alpaca. Resúmenes reunión científica anual de la asociación peruana de producción animal APPA. Trujillo – Perú.

- 59) Pacheco, J. I. ; Huanca, T.; Santiani, A.; Evangelista, S.S.; Mamani, R, H.; Quispe, T. L. 2013.** Efecto de La GnRH sobre las características seminales y testosterona sérica en alpacas. Revista spermova. Lima-Perú. 3: 65-66
- 60) Paricahua, E. 2001.** Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- 61) Petrunkina, A.M.; Waberski, D.; Günzel-Apel, A.R. and Tópfers-Petersen, E. 2007.** Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. Review of Reproduction. *Reprod Fert* 134:3-17.
- 62) Pollard, JC, Littlejohn, RP and Moore, GH. 1995.** 'Seasonal and other factors affecting the sexual behaviour of alpacas', *Anim. Reprod. Sci.* vol. 37: 349-56.
- 63) Quintano, J. 2002.** Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpacas (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis Universitaria. F.M.V.Z. UNA – Puno. Perú.
- 64) San Martín M, Copaira M, Zuñiga J, Rodriguez, R, Bustinza, G. Acostra, L. 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. *J Reprod Fert* 16:395-399.
- 65) Sansinena M.J., Taylor S.A., Taylor P.J., Schmidt E.E., Denniston R.S., Godke R.A. 2007.** In vitro reproduction of llama (*Lama glama*) embryos by intracytoplasmic sperm injection: effect of chemical activation treatments and culture conditions. *An. Reprod. Sci.*
- 66) SAS Institute INC. SAS/STAT<sup>®</sup> 9.2 2009.** User's Guide, Second Edition. Cary, NC.
- 67) Schambacher, BD and DD. Lunstra. 1977.** Acute and Chronic effects of gonadotropin releasing hormone on reproductive characteristic of rams during the nontesting season. *J. Anim. Sci.* 44, n° 4: 650-655.
- 68) Senger, PL. 2003.** Pathways to pregnancy and parturition. Second edition revised. Current Conceptions, inc. Pullman, Washington, USA.
- 69) Sumar J, Leyva V. 1981.** Colección de semen mediante la vagina artificial en alpaca. En: resúmenes IV Conf. Internacional en camélidos sudamericanos. Punta Arenas, Chile.

- 70) Sumar. J. 1983.** Studies on reproductive pathology in alpacas. MSc. thesis.Fac.med. vet. Swedish University of agric.Sci.Uppsala.
- 71) Sumar, J. 1997.** Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. I Symposium Internacional Avances en Reproducción de Rumiante. Lima.
- 72) Smith, C.L., Peter, A.T., Pugh, D.G. 1994.** Reproduction in llamas and alpacas: a review. Theriogenology 41, 573-592.
- 73) Tibary, A., and Memon, MA. 1999.** Reproduction in the male South American Camelidae, J. Camel Prac. Res. vol. 6, pp.235-248.
- 74) Urquieta B, Conde P, Muñoz C, Bustos- Obregón E, Garcia-Huidobro J. 2005.** Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a breeding period. Animal Reproduction Sci 90: p 329-339.
- 75) Vaughan, J., Galloway, D., Hopkins, D. 2003.** Artificial insemination in alpacas (Vicugna pacos). RIRDC rural industries research and development corporation, pub. N°03/104, Kingston, Australia.
- 76) Vencato J., Ponce D., Huamán E., Gamarra G., Vivanco W. 2008.** Comparación de tres métodos de colección de semen en alpacas. resúmenes reunión científica anual de la asociación peruana de producción animal APPA. UNALM. Lima- Perú.
- 77) Von Baer, L., Hellemann, C. 1998.** Variables seminales en llamas (*Lama glama*). Arch. Med. Vet. 30 (2). Valdivia. Chile.
- 78) Von Baer, L., Hellemann, C. 1999.** Cryopreservation of llama (*Lama glama*) semen,Reprod. Domest. Anim. vol.34, pp.95-96.
- 79) Willmen, T., H. Sieme, H. Merkt, F. Saad, HO. Hoppen and D. Wabersky. 1992.** Semen preservation and hormonal effects on semen quality in the camel. Reprod. Dom. Anim., 28, p 91-96.

## CAPITULO VIII

### ANEXOS

#### **Anexo 1. Análisis de varianza para el tiempo de cópula.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	0.82199687	0.07472699	2.56	0.0164
Macho	5	0.55078998	0.110158	3.78	0.0075
Tratamiento	1	0.03848886	0.03848886	1.32	0.2581
Macho x Tratamiento	5	0.17849137	0.03569827	1.22	0.3176
Error	36	1.04926258	0.02914618		
Total corregido	47	1.87125945			

Coef. determ.      Coefi. Var.

43.93%              14.37%

#### **Anexo 2. Análisis de varianza para el volumen de semen.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	1.90950914	0.17359174	2.78	0.0100
Macho	5	1.59445929	0.31889186	5.11	0.0012
Tratamiento	1	0.15588895	0.15588895	2.50	0.1226
Macho x Tratamiento	5	0.12836621	0.02567324	0.41	0.8374
Error	36	2.24471139	0.06235309		
Total corregido	47	4.15422052			

Coef. determ.      Coefi. Var.

0.46%              16.45%

#### **Anexo 3. Análisis de varianza para el volumen de espuma**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	17.4088564	1.58262332	5.25	<.0001
Macho	5	13.2973481	2.65946963	8.81	<.0001
Tratamiento	1	0.00963666	0.00963666	0.03	0.8592
Macho x Tratamiento	5	3.69529631	0.73905926	2.45	0.0521
Error	36	10.8619446	0.30172069		
Total corregido	47	28.2708011			

Coef. determ.      Coefi. Var.

0.62%              29.61%

**Anexo 4. Análisis de varianza para la filancia.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	5.07193393	0.46108490	1.22	0.3066
Macho	5	3.19179282	0.63835856	1.70	0.1606
Tratamiento	1	0.18036929	0.18036929	0.48	0.4932
Macho x Tratamiento	5	1.71708665	0.34341733	0.91	0.4840
Error	36	13.5507553	0.37640987		
Total corregido	47	18.6226892			

Coef. determ.      Coefi. Var.

0.27%              33.20%

**Anexo 5. Análisis de varianza para la motilidad.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	0.57927646	0.05266150	1.75	0.1006
Macho	5	0.35527169	0.07105434	2.37	0.0591
Tratamiento	1	0.06057841	0.06057841	2.02	0.1642
Macho x Tratamiento	5	0.13215307	0.02643061	0.88	0.5044
Error	36	1.08129198	0.03003589		
Total corregido	47	1.66056845			

Coef. determ.      Coefi. Var.

0.35%              10.36%

**Anexo 6. Análisis de varianza para la concentración.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	15.3610198	1.39645635	3.98	0.0008
Macho	5	7.07987000	1.41597400	4.03	0.0052
Tratamiento	1	0.11990974	0.11990974	0.34	0.5625
Macho x Tratamiento	5	9.49949626	1.89989925	5.41	0.0008
Error	36	12.6354212	0.35098392		
Total corregido	47	27.9964410			

Coef. determ.      Coefi. Var.

0.55%              8.13%

**Anexo 7. Análisis de varianza para el concentración promedio por eyaculado.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	18.4903045	1.68093678	3.77	0.0012
Macho	5	8.39908815	1.67981763	3.77	0.0076
Tratamiento	1	0.84932658	0.84932658	1.91	0.1760
Macho x Tratamiento	5	10.2591019	2.05182039	4.60	0.0024
Error	36	16.0445244	0.44568123		
Total corregido	47	34.5348289			

Coef. determ.      Coefi. Var.

0.54%              9.15%

**Anexo 8. Análisis de varianza para endósomosis.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	4474.23226	406.748387	9.63	<.0001
Macho	5	393.929166	78.785833	1.87	0.1248
Tratamiento	1	3473.12851	3473.12851	82.24	<.0001
Macho x Tratamiento	5	627.907828	125.581566	2.97	0.0239
Error	36	1520.26183	42.229495		
Total corregido	47	5994.49409			

Coef. determ.      Coefi. Var.

0.75%              12.53%

**Anexo 9. Análisis de varianza para la vitalidad.**

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	1183.78393	107.616721	0.88	0.5650
Macho	5	718.519164	143.703832	1.18	0.3389
Tratamiento	1	249.305176	249.305176	2.04	0.1614
Macho x Tratamiento	5	263.813574	52.7627149	0.43	0.8228
Error	36	4390.20271	121.950075		
Total corregido	47	5573.98664			

Coef. determ.      Coefi. Var.

0.21%              15.98%

### Anexo 10. Análisis de varianza para anomalidades.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Modelo	11	73.6647789	6.69679809	20.83	<.0001
Macho	5	61.8304899	12.3660979	38.47	<.0001
Tratamiento	1	3.31283021	3.31283021	10.31	0.0028
Macho x Tratamiento	5	1.49654002	0.29930800	0.93	0.4724
Error	36	11.5715965	0.32143324		
Total corregido	47	85.23637555			

Coef. determ.      Coefi. Var.

0.86%              11.18%

### Anexo 11. Resultados de grupo GnRH.

Variable	N	Promedio	D. E.	Variación	Mínimo	Máximo
Tiempo cópula	27	17.67	8.64	48.89	7.00	49.00
Volumen semen	27	1.56	0.89	56.82	0.20	3.00
Volumen espuma	27	2.94	3.22	109.27	0	10.00
Filancia	27	2.52	2.41	95.76	0	7.00
Motilidad	27	54.07	18.14	33.54	30.00	95.00
Concentración	27	51.57	62.98	122.13	1.05	67.00
Recuento	27	101.76	159.53	156.77	0.79	667.50
Host	27	59.37	4.40	7.41	51.89	69.23
Vitalidad	27	71.11	9.27	13.04	57.40	87.76
Anormalidades	27	24.61	15.36	62.41	5.79	62.98

### Anexo 12. Resultados del grupo control.

Variable	N	Promedio	. E	variación	Mínimo	Máximo
Tiempo cópula	21	16.29	7.25	44.50	6.00	29.00
Volumen semen	21	1.17	0.91	78.01	0.10	3.00
Volumen espuma	21	3.14	3.52	112.06	0	14.00
Filancia	21	3.17	2.34	73.95	0	8.00
Motilidad	21	47.14	19.91	42.23	10.00	80.00
Concentración	21	65.43	86.39	132.03	0.65	299.60
Recuento	21	47.52	66.61	140.16	0.07	270.60
Host	21	42.19	10.01	23.74	25.00	58.42
Vitalidad	21	66.50	12.42	18.68	24.67	81.29
Anormalidades	21	28.91	12.41	42.92	13.61	58.88

### Anexo 13. Resultados del promedio.

Variable	N	Promedio	D. E.	Variación	Máximo	Mínimo
Tiempo cópula	48	17.06	8.01	46.92	6.00	49.00
Volumen semen	48	1.39	0.91	65.46	0.10	3.00
Volumen espuma	48	3.03	3.32	109.49	0	14.00
Filancia	48	2.80	2.38	84.89	0	8.00
Motilidad	48	51.04	19.05	37.31	10.00	95.00
Concentración	48	57.63	73.61	127.72	0.65	299.60
Recuento	48	78.03	129.25	165.64	0.07	667.50
Host	48	51.85	11.29	21.78	25.00	69.23
Vitalidad	48	69.09	10.89	15.76	24.67	87.76
Anormalidades	48	26.49	14.16	53.47	5.79	62.98

### Anexo 14. Resultado de ambos grupos y del promedio de cada macho.

Tratamiento	Macho	Variable	Prom	D. E.
GnRH	000380	Tiempo cópula,	17.00	6.78
		Volumen semen	1.33	0.96
		Volumen espuma	1.50	1.22
		Filancia	2.75	3.20
		Motilidad	57.50	17.08
		Concentración	54.36	62.13
		Recuento	73.41	115.64
		Host	60.53	1.42
		Vitalidad	71.39	10.27
		Anormalidades	38.04	1.30
			24108	Tiempo cópula
Volumen semen	0.43			0.15
Volumen espuma	0.50			0.58
Filancia	3.25			2.87
Motilidad	42.50			18.93
Concentración	23.14			31.28
Recuento	11.28			15.89
Host	61.69			8.64
Vitalidad	67.54			9.82
Anormalidades	12.16			3.70
	63103			Tiempo cópula
		Volumen semen	1.68	0.78
		Volumen espuma	1.92	2.29
		Filancia	1.25	1.08

	Motilidad	56.67	16.02
	Concentración	24.99	25.73
	Recuento	47.92	54.17
	Host	57.67	2.01
	Vitalidad	67.29	11.00
	Anormalidades	18.52	5.25
153298	Tiempo cópula	24.80	13.59
	Volumen semen	2.38	0.64
	Volumen espuma	6.70	2.28
	Filancia	2.00	2.12
	Motilidad	75.00	11.73
	Concentración	143.94	80.83
	Recuento	354.82	217.31
	Host	57.72	3.82
	Vitalidad	75.98	5.64
	Anormalidades	9.38	3.69
362398	Tiempo cópula	21.50	5.00
	Volumen semen	1.90	0.78
	Volumen espuma	6.63	2.50
	Filancia	3.38	1.89
	Motilidad	50.00	10.80
	Concentración	37.11	19.53
	Recuento	69.40	55.37
	Host	58.13	4.76
	Vitalidad	71.15	9.77
	Anormalidades	26.42	4.94
A134	Tiempo cópula	8.25	1.50
	Volumen semen	1.38	0.75
	Volumen espuma	0.00	0.00
	Filancia	3.25	3.77
	Motilidad	36.25	9.46
	Concentración	16.05	25.65
	Recuento	17.39	24.92
	Host	61.70	3.69
	Vitalidad	74.00	10.32
	Anormalidades	49.98	13.02
<b>Testigo</b>			
380	Tiempo cópula	18.00	10.54
	Volumen semen	0.83	1.01
	Volumen espuma	6.17	6.90
	Filancia	0.17	0.29
	Motilidad	60.00	17.32

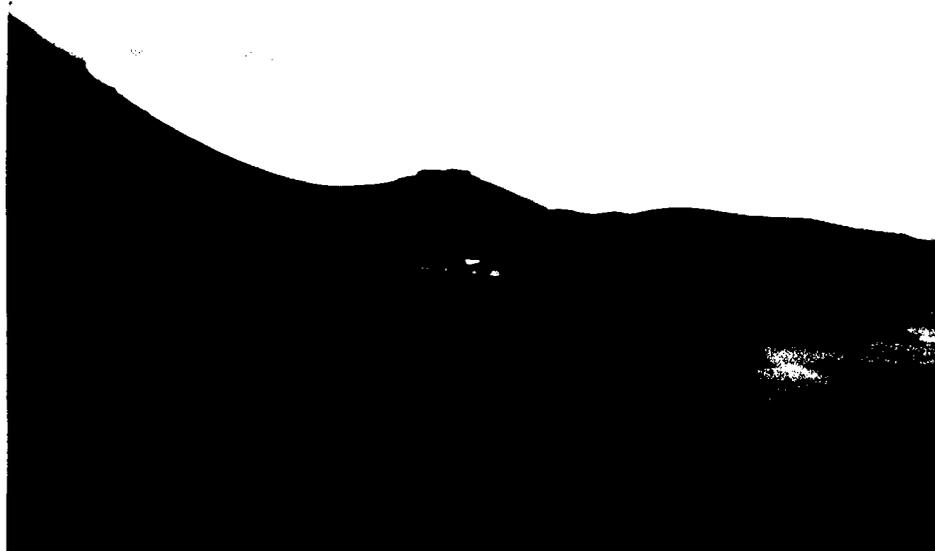
	Concentración	195.45	52.17
	Recuento	127.89	124.18
	Host	31.86	5.79
	Vitalidad	56.23	28.86
	Anormalidades	40.02	2.59
24108	Tiempo cópula	21.00	2.16
	Volumen semen	0.50	0.36
	Volumen espuma	1.50	1.68
	Filancia	4.25	2.99
	Motilidad	55.00	30.00
	Concentración	119.55	122.10
	Recuento	53.01	43.69
	Host	37.60	12.22
	Vitalidad	64.01	10.49
	Anormalidades	18.11	1.85
63103	Tiempo cópula	10.67	2.08
	Volumen semen	1.03	0.81
	Volumen espuma	0.17	0.29
	Filancia	1.83	1.26
	Motilidad	31.67	12.58
	Concentración	1.38	0.75
	Recuento	1.78	1.60
	Host	47.39	11.07
	Vitalidad	63.25	9.69
	Anormalidades	25.11	5.49
153298	Tiempo cópula	15.50	7.59
	Volumen semen	2.25	1.19
	Volumen espuma	4.63	3.86
	Filancia	4.00	1.68
	Motilidad	57.50	17.08
	Concentración	19.40	21.89
	Recuento	40.51	65.87
	Host	38.58	9.56
	Vitalidad	70.47	6.97
	Anormalidades	16.42	4.06
362398	Tiempo cópula	18.60	8.50
	Volumen semen	1.10	0.65
	Volumen espuma	4.00	1.87
	Filancia	3.90	2.38
	Motilidad	38.00	15.25
	Concentración	43.29	34.78
	Recuento	44.52	49.24

	Host	50.46	4.03
	Vitalidad	70.04	4.17
	Anormalidades	35.43	7.99
A134	Tiempo cópula	8.50	0.71
	Volumen semen	1.25	0.35
	Volumen espuma	1.25	1.06
	Filancia	4.00	2.12
	Motilidad	37.50	3.54
	Concentración	5.68	5.20
	Recuento	6.18	4.49
	Host	45.60	1.99
	Vitalidad	74.96	6.77
	Anormalidades	48.23	15.07

Recuento = concentración promedio por eyaculado

**Anexo 15. Imágenes del lugar de ejecución del presente trabajo de investigación.**

**1. Imagen del Centro de Investigación y Producción “Quimsachata” INIA – Puno.**



**Anexo 16. Machos reproductores seleccionados para la colección de semen, previa evaluación sanitaria.**

**2. Imagen de evaluación sanitaria y dentición**



**3. Imagen de las alpacas machos seleccionados**



**Anexo 17. Materiales usados para el presente trabajo de investigación.**

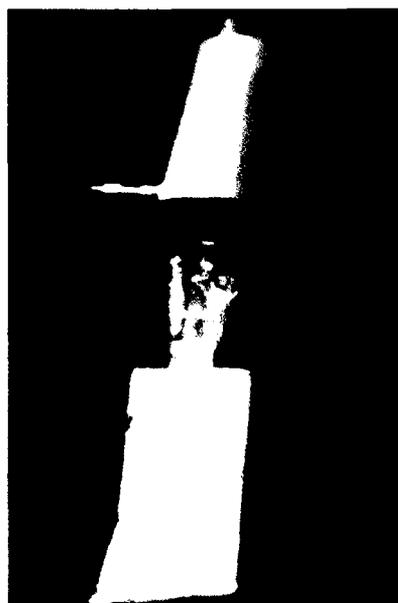
**4. Imagen de los materiales usados: maniquí, jarra eléctrica, termo, frazadilla eléctrica, vagina artificial, inflador, franelas, conos protectores del tubo colector, etc.**



**5. Imagen de los materiales para armar la vagina artificial: tubo pvc, funda de látex recta y funda cónica, tubo graduado.**



**6. Vagina artificial armado.**



7. En la Imagen se observa vertiendo agua a 45°C, en la vagina artificial.



8. En la imagen se observa, con una liga se asegura la parte superior para evitar fuga de agua y aire.



9. En la imagen se observa el insuflado de aire para brindarle presión a la vagina artificial.



10. en la imagen se puede observar el momento en que se envuelve la vagina artificial con la frazadilla eléctrica.

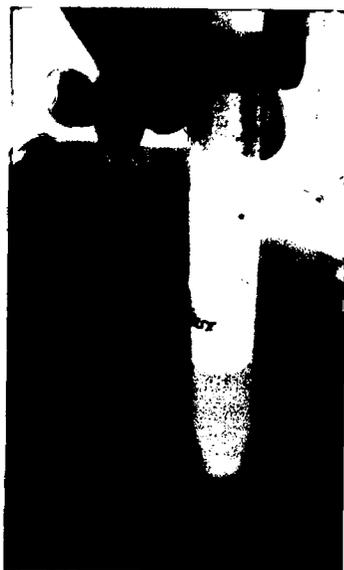


**11. Imagen muestra a la alpaca macho copulando en un maniquí, luego de una hora de aplicada la hormona GnRH.**

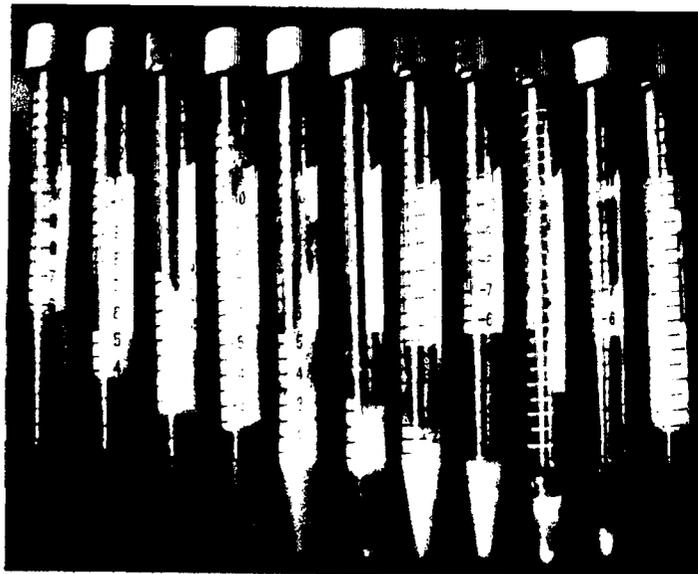


**Anexo N° 18. Fotos del procedimiento de evaluación del semen colectado.**

**12. Imagen del tubo graduado con eyaculado de alpaca.**



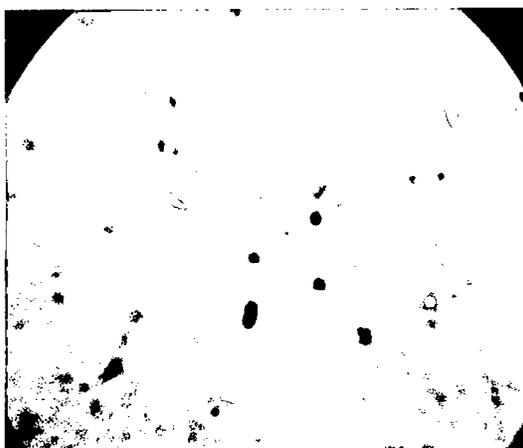
**13. Imagen muestra la variedad de los colores del eyaculado de alpacas, colectados mediante el método de vagina artificial.**



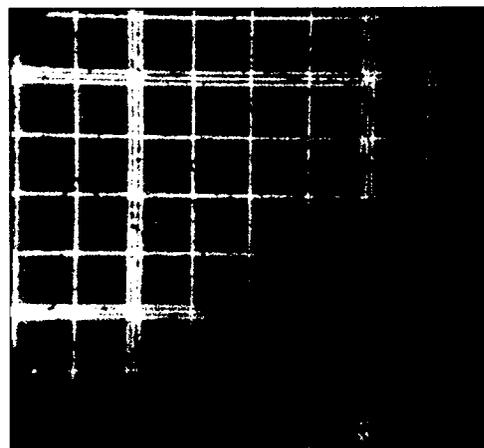
**14. Imagen de la evaluación de las características microscópicas del eyaculado, En el laboratorio de biotecnología reproductiva del CIP. Quimsachata. INIA-Puno**



**15. Tinción con eosina-nigrosina para evaluar la vitalidad espermática.**



**16. Evaluación de la concentración espermática en la cámara de Neubauer.**



**17. Se observan espermatozoides que reaccionaron al Test de Host.**

