

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE MEDICINA
VETERINARIA**



**“EFECTO DE DOS DILUTORES EN LA REFRIGERACIÓN DE SEMEN DE
ALPACA (*Vicugna pacos*)”. EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN
Y PRODUCCIÓN QUIMSACHATA – INIA – DISTRITO DE SANTA
LUCIA-PUNO 4,200 msnm. 2008.**

Tesis para Obtener el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO

Presentado por:
DANIEL MEZA NÚÑEZ

AYACUCHO-PERÚ

2012

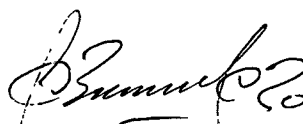
**“EFECTO DE DOS DILUTORES EN LA REFRIGERACIÓN DE SEMEN
DE ALPACA (*Vicugna pacos*) EN EL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y
PRODUCCIÓN QUIMSACHATA – INIA – DISTRITO DE
SANTA LUCIA – PUNO 4,200 msnm. 2008”**

Recomendado : 13 de marzo de 2012
Aprobado : 16 de marzo de 2012

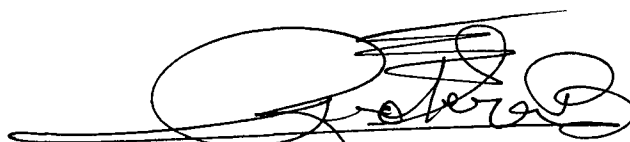


M.Sc. FELIPE ESCOBAR RAMÍREZ
Presidente del Jurado

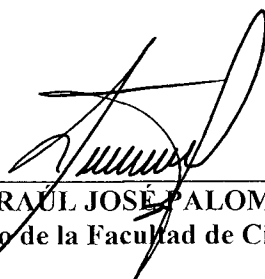
Mg. CARLOS ALBERTO PISCOYA SARMIENTO
Miembro del Jurado



ING. RAÚL ROBERTO CABALLA LEÓN
Miembro del Jurado



ING. ROGELIO SOBERO BALLARDO
Miembro del Jurado



M.Sc. ING. RAUL JOSÉ PALOMINO MARCATOMA
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

DEDICATORIAS.

Dedicatoria:

*A mis padres,
hermanos, tíos y
primos por su
abnegada labor de
apoyo durante el
proceso de mi
formación profesional*

Dedicatoria:

*A mi tío Andrés (Q.E.P.D), por su
valioso apoyo y símbolo de
exigencia, constancia y carácter de
competencia.*

Dedicatoria:

*A mis amigos en especial a Clifor
Q.E.P.D. por la contagiosa labor
de entusiasmo, carisma y humor
durante el proceso de la labor
estudiantil.*

Dedicatoria:

*A Sinthia, por compartir su,
cariño y como símbolo de
exigencia, constancia y sus
reniegos hacen posible el
logro de mi formación
profesional.*

AGRADECIMIENTOS

- Quiero agradecer sinceramente a todas las personas e instituciones que me han ofrecido su valiosa ayuda durante el desarrollo de la presente tesis.
- A la **Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga**, por ser mi Alma Mater y fuente de mis conocimientos y madures personal.
- A la **Facultad de Ciencias Agrarias**, por su prestigiosa labor histórica en el proceso de la formación profesional de las tres especialidades.
- A la **Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria**, por ser el centro de mi formación profesional y ética.
- Al Centro de Investigación y Producción Quimsachata **INIA – Puno**, por haberme brindado todas las facilidades logísticas necesaria para posibilitar la concretización del presente estudio.
- A los MV. Manuel Palomino Cano, Wilfredo Huanca MVZ. Teodosio Huanca, y Mariolino Gonzales por sus valiosos aportes durante el desarrollo experimental de la presente tesis.
- A mi asesor MV. Carlos, A. Piscoya Sarmiento por su apertura y orientación durante la redacción de mi trabajo de investigación.
- A todos mis profesores de la Escuela de Formación Profesional de **Medicina Veterinaria** por su disposición y desprendimiento para transmitir sus conocimientos y consejos que contribuyeron a mi formación profesional.
- A todos mis compañeros de la E.F.P. Medicina Veterinaria con quienes compartí gratas experiencias y convivencia fraterna durante mis años como estudiante.
- A mis compañeros de Prácticas de las diversas universidades del país y el extranjero, en la Estación Experimental Quimsachata-INIA-Puno, durante el trabajo experimental de la presente tesis, por sus valiosos aportes a través de opiniones e intercambio de experiencias.
- Al personal de trabajo de la estación Quimsachata-INIA-Puno, por su valiosa predisposición a la colaboración y aporte en el desarrollo de la presente investigación.

ÍNDICE

CONTENIDO	Página.
Dedicatorias	
Agradecimientos	
INTRODUCCIÓN	8
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
1.1. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO	10
1.1.1. Testículos	11
1.1.2. Epidídimo	11
1.1.3. Conducto Deferente	12
1.1.4. Próstata	12
1.1.5. Bulbo uretral	12
1.1.6. Pene	12
1.2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO	13
1.2.1. Regulación Endocrina	13
1.2.2. Estacionalidad Reproductiva	14
1.2.3. Monta y Cópula	15
1.3. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN	16
1.3.1. Color	16
1.3.2. Volumen	16
1.3.3. Concentración	15
1.3.4. Motilidad	17
1.3.5. pH	17
1.3.6. Anormales	17
1.4. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN	19
1.4.1. Funda Vaginal	19
1.4.2. Esponja intravaginal	20
1.4.3. Electro eyaculación	20
1.4.4. Fistula uretral	21
1.4.5. Desviación de los Conductos Deferentes	21
1.4.6. Vagina artificial	21

1.5. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL PLASMA SEMINAL	23
1.6. PROCESAMIENTO DEL SEMEN	23
1.6.1. Dilutores	23
1.6.2. Componentes de los Dilutores.	25
1.6.2.1. Fuentes de energía	25
1.6.2.2. Sustancias orgánicas	26
1.6.2.3. Amortiguadores	26
1.6.3. Dilutores Comúnmente Usados	27
1.7. EXPERIENCIAS EN LA CONSERVACIÓN Y DE SEMEN DE ALPACA	28
II. MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.1. LUGAR	30
2.2. MATERIALES Y RECURSOS	31
2.3. PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO	34
2.3.1. Entrenamiento de Machos	34
2.3.2. Colección de semen.	36
2.3.3. Evaluación del semen fresco	36
2.3.4. Preparación de los Dilutores	40
2.3.5. Dilución del Semen	41
2.3.6. Refrigeración y Evaluación del Semen Diluido	41
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	44
3.1. Características Seminales Macroscópicas	44
3.1.1. Tiempo de copula	45
3.1.2. Volumen de Semen	46
3.1.3. Viscosidad	47
3.1.4. Motilidad	48
3.1.5. Concentración	49
3.2. Motilidad espermática a Diferentes Tiempos de Refrigeración Y Según Tipo de Dilutor.	50
3.3. Relación entre Características Seminales Evaluadas	57
3.3.1. Tiempo de Colección vs. Volumen de eyaculado	57
3.3.2. Tiempo de Colección vs. Viscosidad	58

3.3.3. Tiempo de Colección vs. Motilidad	59
3.3.4. Tiempo de Colección vs. Concentración	59
3.3.5. Volumen vs. Viscosidad	60
3.3.6. Volumen vs. Motilidad	62
3.3.7. Volumen vs. Concentración	63
3.3.8. Viscosidad vs. Motilidad	63
3.3.9. Viscosidad vs. Concentración	64
3.3.10. Motilidad vs. Concentración	65
IV. CONCLUSIONES	67
RECOMENDACIONES	68
RESUMEN	69
BIBLIOGRAFÍA	71
IX. ANEXOS	

ABREVIATURAS.

IA.	Inseminación Artificial
TRIZ.	Hidroximetil Amono Metano
BSA	Suero de Albúmina Bovina
LH.	Hormona Luteinizante
FSH.	Hormona Folículo Estimulante
GnRH.	Hormona Liberadora de Gonadotropinas
Vol.	Volumen
H ² O,	Agua
Mot.	Motilidad

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1.1. Características Macroscópicas del semen de Camélidos sudamericanos	18
Cuadro 1.2. Características Microscópicas del Semen de Camélidos Sudamericanos.	19
Cuadro N° 3.1. Características seminales de 08 alpacas Huacaya, todas en edades reproductivas de color blanco, obtenidas por vagina artificial en el CIP. Quimsachata, INIA-Puno. 2008.	44
Cuadro N° 3.2. Promedio de Características Seminales de Alpacas Huacaya obtenidas por Vagina Artificial en el CIP. Quimsachata, INIA-Puno. 2008.	45
Cuadro N° 3.3. Valores Máximos y Mínimos de las Características Seminales de 08 Alpacas Huacaya, de Colores Blanco obtenidas por Vagina Artificial en el CIP. Quimsachata del INIA-Puno.	45
Cuadro 3.4. Promedios de motilidad espermática a diferentes tiempos de refrigeración y según tipo de Dilutor.	51
Cuadro 3.5. Relación de regresión y correlación entre las características Seminales evaluadas.	56

LISTA DE GRÁFICOS.

Gráfica 3.1. Porcentaje de motilidad espermática (%) Según tiempo de refrigeración y tipo de dilutor	53
Grafico 3.2. Relación de regresión lineal entre el volumen de eyaculado (ml) y el tiempo de cópula (min.)	57
Grafico 3.3. Relación de regresión lineal entre el nivel de viscosidad y el tiempo de cópula (min.)	58
Grafico 3.4. Relación de regresión lineal entre la motilidad espermática y el tiempo de cópula (min.)	59
Grafico 3.5. Relación de regresión lineal entre la Concentración espermática ($\times 10^3/\text{ml}$) y el tiempo de copula (min.)	60
Grafico 3.6. Relación de regresión lineal entre la viscosidad Espermática y el volumen de semen (ml.)	61
Grafico 4.7. Relación de regresión lineal entre la motilidad Espermática (%) y el volumen de semen (ml.)	62
Grafico 3.8. Relación de regresión lineal entre la concentración Espermática ($\times 10^3/\text{ml}$) y el volumen de semen (ml.)	63
Grafico 3.9. Relación de regresión lineal entre la motilidad Espermática (%) y el volumen de semen (ml.)	64
Grafico 3.10. Relación de regresión lineal entre la concentración Espermática ($\times 10^3/\text{ml}$) y su viscosidad	65
Grafico 3.11. Relación de regresión lineal entre la motilidad y la concentración espermática ($\times 10^3/\text{ml}$)	66

INTRODUCCIÓN.

La crianza de camélidos sudamericanos domésticos es una de las principales actividades pecuarias que provee de productos como la fibra, carne y pieles que contribuyen al sustento económico de muchas familias ubicadas en el ande peruano. La alpaca es una de las cuatro especies de camélidos sudamericanos, que posee singular importancia económica puesto que produce una fibra de excelente calidad textil, además de producir carne con características organolépticas y físico-químicas superiores al resto de otros productos.

En contraste, los actuales sistemas de producción alpaquera del país, suelen reportar bajos niveles de producción y productividad, puesto que gran parte de la población de alpacas pasan por un serio proceso de erosión genética y promiscuidad de crianza. Ello, insta a la necesidad de desarrollar y/o mejorar las prácticas biotecnológicas orientadas a optimizar la tasa reproductiva con el fin de elevar la producción y la productividad de esta especie.

El uso de la inseminación artificial representa un importante aspecto a ser considerado por las iniciativas de mejora genética de nuestras alpacas, puesto que permite optimizar el uso de reproductores de alta calidad genética; sin embargo, aun existen inconvenientes técnicos que no permiten optimizar su uso, tales como la colección de semen, la falta de conocimiento específico de las características bioquímicas del plasma seminal, productos de las glándulas accesorias del macho, y del uso de dilutores apropiados para el semen de las alpacas (Bustinza, V. 2001).

Los aspectos técnicos y/o procedimentales que tendrían que ser afinadas y validadas para hacer un correcto uso de la inseminación artificial como medio para lograr un mayor impacto de mejoramiento sería el uso correcto de la técnica de la colección de semen, el uso adecuado y eficiente de los dilutores para semen de alpaca, así como encontrar un adecuado método de conservación del material seminal. Asimismo, se debe tener presente que los camélidos domésticos y silvestres ofrecen ventajas sobre otras especies animales en lo que respecta a la técnica de inseminación propiamente dicha, puesto que las hembras están en un estro (celo) continuo durante la temporada de reproducción (Hafez, E. 2002).

La dilución y conservación del semen (espermatozoides) son dos aspectos de máximo interés que deberían ser tomados muy en cuenta para posibilitar el correcto uso de la inseminación artificial con miras a elevar la productividad animal por medio del mejoramiento genético. Al respecto, cabe mencionar que la refrigeración del semen de las

alpacas se ve supeditada al uso de dilutores adecuados que permita mantener por mayor tiempo su viabilidad y fertilidad espermática. La identificación de un buen dilutor podría conducir el uso frecuente y óptimo del semen refrigerado en la inseminación artificial de alpacas (Chipana, 1997).

Los dilutores aportan al semen elementos nutritivos para los procesos metabólicos, protección contra el choque térmico, efecto amortiguador contra el ácido láctico producto del metabolismo de los espermatozoides, una sustancia reductora para la protección frente a determinadas enzimas y anhídrido carbónico que pone en alto a la motilidad y disminuye el metabolismo de los espermatozoides (Hafez, E. 2002). Para tal efecto se suelen utilizar tanto yema de huevo como leche y BSA (albúmina de suero bovino) para proteger las células espermáticas contra el choque térmico cuando son enfriados y/o refrigerados desde la temperatura corporal promedio 37°C, hasta los 5 - 8°C. Dichas sustancias también contienen nutrientes usados por los espermatozoides; para inhibir la proliferación de microorganismos en el semen se agregan Penicilina, Estreptomina, Polimixina B, u otras combinaciones de antibióticos, además de agregarse la glucosa y/o fructosa como medio energético metabólico (Hafez, E. 2002).

El presente trabajo tuvo como objetivo, evaluar el efecto de dos dilutores sobre la motilidad espermática de semen de alpaca puestos a refrigeración.

Los objetivos de éste trabajo de investigación han sido:

Generales

Evaluar la eficiencia de uso de los dilutores **Suero de Albúmina Bovina-BSA + glucosa e Hidroximetil Amino Metano-TRIS + Yema de Huevo**, sobre la refrigeración de semen de alpaca, basándose en la motilidad espermática medido en diferentes tiempos de refrigeración.

Específicos

- Determinar las características macroscópicas y microscópicas de semen fresco en alpacas, obtenidos mediante la vagina artificial incorporada dentro de un maniquí.
- Determinar las relaciones de correlación lineal entre las variables seminales estudiadas en semen fresco.

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

1.1.1. Testículos

Se ubican en la región perineal a 10 cm. del ano aprox., sujetos por el escroto y el cordón espermático, sin un cuello definido, y son del mismo tamaño (Háfez, E. 2002). El tamaño testicular así como las dimensiones se incrementan con la edad, no existiendo diferencia por raza, se encuentran una alta relación de tamaño testicular con peso vivo y volumen testicular con el peso vivo (Jaen, J. 1999) se aclara además que en la alpaca los testículos del lado del derecho e izquierdo tienen dimensiones similares en todas sus medidas (largo, ancho, volumen), tampoco son diferentes por raza (Bustanza, V. 2001).

Los testículos segregan las hormonas sexuales y producen las células germinativas cumpliendo de esta manera en la reproducción una tarea muy importante (Holy, L. 1983). Los testículos son los principales órganos de la reproducción en los machos, pues producen gametos masculinos (espermatozoides) y hormonas sexuales, las células germinales localizadas en los túbulos seminíferos sufren divisiones celulares continuas formando así nuevos espermatozoides durante toda la vida normal del macho (Bearden y Fuquan, 1982).

La imagen histológica del testículo de la alpaca, en términos generales es similar a la descrita para otras especies de mamíferos (Casa, J. y col. 1967). El tubo seminífero de la alpaca posee un diámetro promedio de 200 micras. Las diferencias encontradas en las células de Leydig pueden representar diversos momentos funcionales (Bustanza, V. 2001)

El parénquima testicular está formado principalmente por túbulos seminíferos de forma más o menos cilíndrica que se hallan ubicados en paquetes dejando pequeños espacios entre ellos. Los espermatozoides se producen en los túbulos seminíferos para luego colectarse en lo que se denomina *red de testis* y finalmente se une al canal eferente que va hasta la cabeza del epidídimo (Bustinza, V. 2001).

Los testículos están incluidos dentro de la bolsa testicular o escroto que es un divertículo del abdomen que se forma por una modificación de la piel; tiene la forma ovalada y está dividida por un tabique, en medio de las cavidades las cuales están ocupadas por los testículos. El exterior del testículo es untuoso al tacto por la presencia de secreciones sebáceas y está cubierto por abundantes pelos finos y presenta un surco sagital que es el rafe escrotal (Bustinza, V. 2001).

1.1.2. Epidídimo

Tiene la forma de una jota (j) , la cabeza es de forma cónica y ligeramente contorneada, se continua con el cuerpo cuya forma es cinta alargada y termina en la cola que es un pequeño abultamiento el cual se encorva para dar origen al conducto deferente (Obando y col, 1992). Las características histológicas del epidídimo de la alpaca son similares a las de otros animales domésticos (Osorio y col, 1966).

La función del epidídimo es la maduración de los espermatozoides, recientemente formados entran en la cabeza a partir de los conductos eferentes, no tienen la capacidad de motilidad ni fertilidad. Durante su paso por el epidídimo adquieren la capacidad para moverse y se tornan fértiles parece que los espermatozoides adquieren la capacidad para fertilizar en la cola y después empiezan a envejecer y deteriorarse si no son utilizadas. Mientras están en el epidídimo los espermatozoides pierden la gota citoplasmática que se forma en el cuello de cada espermatozoide durante la espermatogénesis; no se conoce el significado fisiológico de la gota citoplasmática pero es considerado como el indicador de la maduración suficiente de los espermatozoides del epidídimo (Bearden y col, 1982).

1.1.3. Conducto Deferente.

Son conductos muy delgados que se originan en la cola del epidídimo es delgado y largo, lo que no facilita la vasectomía. Se inicia con una estructura flexuosa cráneo medial del epidídimo, asciende por el canal inguinal y se dirige hacia la cavidad pelviana, alcanzando el pliegue genital donde sufre un pequeño ensanchamiento dorsal a la altura de la vejiga, lo que sería la ampolla del conducto deferente (Holy, L. 1983). El cordón espermático es una estructura par de forma alargada y angosta que se extiende desde el anillo inguinal externo hasta la extremidad craneal del testículo con una longitud de 40 cm. (Bustinza, V. 2001). Los espermatozoides se encuentran en el conducto deferente a partir de los 18 meses de edad (Carpio, M. 1989).

1.1.4. Próstata.

Situado dentro del tejido conectivo y está cubierto por el músculo uretral, que se encuentra en el suelo de la cavidad pelviana (Alanocca, H. 1978). Tiene la forma de H y se encuentra dorsal y lateralmente sobre el cuello de la vejiga. Está formada por el cuerpo prostático, que comprende dos lóbulos unidos entre sí y situados en el primer segmento de la uretra y por la porción diseminada por la próstata que penetra en el músculo uretral (Sumar, J. 1991).

1.1.5. Bulbo uretral

Son ovoides y pequeños a unos 7.5 cm. de la próstata, se ubican lateralmente a la uretra en la cavidad pélvica y tiene cada uno diámetros aproximados de 1 cm. La alpaca y la llama así como los camélidos silvestres carecen de glándulas seminales (Sumar, J. 1991).

1.1.6 Pene

Es fibro-elástico llegando a medir en la alpaca de 30 a 40 cm, describe como en el toro la forma de “S” peneana, con la primera y segunda inflexión localizada delante de los testículos. El diámetro es relativamente delgado y no se expande apreciablemente durante la erección (Sumar, J. 1991).

1.2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

1.2.1. Regulación Endocrina

La función testicular normal requiere una estimulación normal por las gonadotropinas las que a su vez están controladas por la secreción pulsátil hipotalámicas de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH) del hipotálamo (Hafez, E.S.E. 2001).

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

La GnRH estimula la secreción de la LH y FSH de la hipófisis anterior. La LH estimula a las células intersticiales de leyding y produce andrógenos principalmente testosterona, esto da origen al desarrollo de las características sexuales secundarias del macho así también al desarrollo y mantenimiento del aparato reproductor masculino. La testosterona también es segregada a los túbulos seminíferos en donde interviene en los procesos de la espermatogenesis. La FSH interactúa con receptores ubicados en las células de sértoli y causa la producción de proteína de unión de andrógenos (ABP), la conversión de testosterona en Di-hidro-testosterona y estrógeno, estimulación de la espermatocitogenesis, la terminación de la liberación de Espermatozoides (espermación) la secreción de inhibían la cual tiene un efecto de retroalimentación negativa en la secreción de FSH pero no de LH (Háfez, E. 2002).

Existen otros factores responsables del control de la espermatogenesis 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 altera su capacidad reproductora según la estación del año (Illera, M. 1994).

1.2.2. Estacionalidad Reproductiva

La alpaca es considerada como una especie de actividad reproductiva estacional bajo las condiciones alto andinas de nuestro país. Las pariciones se circunscriben solamente al periodo comprendido entre diciembre a marzo (época de lluvias), aun en condiciones en que los machos y las hembras son mantenidos juntas durante todo el año esto puede interpretarse como que la actividad reproductiva efectiva de las alpacas tiene lugar solamente en los meses lluviosos de enero a abril (Bustinza, V. 2001). Esta marcada estacionalidad en la reproducción también se observa en las especies silvestres de camélidos, Vicuña y Guanaco (Franklin, W. 1983).

Trabajos realizados a campo muestran que machos alpaca y llama presentan un incremento de la libido a medida que se acerca el periodo comprendido entre enero a abril (época de lluvias) para luego disminuir notablemente en época seca mayo – noviembre. En aquellas explotaciones donde por razones de manejo se mantiene separado de los machos y las hembras, al iniciarse la época de lluvias y mejoran las condiciones ambientales (especialmente la disponibilidad de forrajes), los machos se tornan inquietos escapan de su rebaño en busca de hembras se exagera la libido y se incrementa notablemente la actividad homosexual, que paulatinamente desaparece en la época seca y fría (mayo a noviembre) (Sumar, J. 1991).

El reinicio de la actividad copuladora de los machos después de la etapa de la inactividad sexual estacional se debería al cambio de estación, con el consiguiente cambio de la disponibilidad alimenticia y en la presencia de un mayor número de hembras receptivas como consecuencia de los partos (Fernández, B. 1993). Existe una importante variación en las características reproductivas de los machos debido probablemente a factores estacionales o nutricionales (Huanca, W. y Gaully, M. 1998).

Sin embargo, cabe mencionar que observaciones realizadas en diferentes zoológicos del mundo especialmente en el hemisferio norte, indican que los camélidos sudamericanos en general, no tienen estacionalidad reproductiva (Schmidt, C.1973). En los Estados Unidos donde las alpacas y llamas son mantenidas en las mejores condiciones alimenticias y

ambientales durante todo el año las hembras paren en cualquier época del año, aunque muestran un mayor tipo de pariciones en los meses de verano (mayo a agosto) (Sumar, J. 1997).

Los factores responsables del inicio de cesación de la actividad reproductiva en condiciones de crianza en los altiplanos, no son bien conocidos. Es posible que factores ambientales, tales como mejoramiento de la temperatura y mejoramiento de la nutrición junto a estímulos visuales olfatorios, tenga gran influencia (vía el sistema nervioso central) en la reproducción de estos mamíferos (Sumar, J. 1997).

1.2.3. Monta y Cópula

La alpaca presenta características muy peculiares en cuanto a la realización de la monta. La cópula se realiza en posición de cubito ventral siendo su duración relativamente largo, entre 15 a 30 minutos aproximadamente (Fernández, B. 1993).

La fase de cortejo o exploratoria, se inicia cuando el macho al ser introducido en el rebaño de hembras, persigue a ellas, embistiéndola por lo general y tratando de montarlas, esta decisión parece tomarse al azar. En este punto señales o indicaciones visuales, olfativas o auditivas, parecen no jugar un rol importante (Fernández, B. y Novoa, C. 1968).

Si la hembra está receptiva, se dejara montar en pie, para luego sentarse o adoptar la posición decumbente o prona, y lograr la intromisión del pene. Luego se observa una gran aproximación de la pelvis del macho sobre la hembra quedando la grupa del macho suspendida unos centímetros sobre el suelo. En este momento se considera que el macho ha logrado la completa intromisión peneana. La cópula resulta dificultosa cuando el macho es de menor peso y talla que la hembra (Sumar, J. 1991).

1.3. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN

El semen es la suspensión celular líquida o semigelatinosa que contiene los gametos masculinos – los espermatozoides – y las secreciones del aparato reproductor masculino. La porción líquida de dicha suspensión que se forma durante la eyaculación, se conoce como plasma seminal (Háñez, E.S.E. 2001). Es particularmente rico en enzimas contiene fosfatasa (ácidas y alcalinas), oxidasas específicas de muchos ácidos aminados, Hialuronidasa Citocromo transaminasa (Flores, C. 1999).

El semen de la alpaca es altamente viscoso lo que hace difícil su manejo en el laboratorio. También es de notar, debido a la viscosidad del plasma seminal no existe lo que se aprecia en el ovino por ejemplo, la motilidad masal y la motilidad individual es ciertamente muy lenta (Sumar, J. 1997).

1.3.1. Color

Varía del blanco lechoso opaco al blanco cristalino, según la concentración de espermatozoides y el grado de contaminación con otros fluidos orgánicos. Cabe mencionar que en base a los trabajos desarrollados por Raymundo, F. y col. (2006), se ha podido determinar que el color que más predomina en el semen de alpaca, es el blanco opaco.

1.3.2. Volumen

Es muy variable, se logra un mayor volumen con la vagina artificial y la fístula uretral; con las fundas vaginales, da un promedio de 1,98 ml (0,4-6,6 ml) (Mogrovejo, D. 1952) y con la electro eyaculación señalan un volumen de 0,2 a 3,5 ml., Fernández Baca y Calderón (1966), mientras que Sumar, J. y Leyva, V. (1981) dan rangos de 3,7 a 12,5 ml. A su vez, usando vagina artificial Raymundo, F. Huanca L. (2006) encontraron un volumen promedio de 2.7 ± 0.8 ml y una viscosidad de 1.04 ± 0.3 .

1.3.3. Concentración

La alta viscosidad del plasma seminal de la alpaca hace difícil el adecuado llenado y distribución del semen en el hemocitómetro, además existe una amplia variación en las concentraciones debido al método de colección (Sumar, J. 1991). Se reportaron promedios de 33,320 espermatozoides/ml al usar fundas vaginales (Mogrovejo, D. 1952). Al usar electro eyaculación, Fernández. Baca, (1966) reportó un promedio de 48,159 espermatozoides/ml. Quispe. F, (1987), da un promedio de 145,000 espermatozoides/ml al usar vagina artificial. Sin embargo, Leyva (1984) al usar vagina artificial encuentra un promedio de 192, 000 +/- 84,000 espermatozoides/ml. Por otro lado, Raymundo et al (2006) encontró una concentración de 248,100 espermatozoides/ml.

1.3.4 Motilidad

No existe la motilidad masal por la baja concentración relativa de espermatozoides y por una motilidad progresiva individual poca vigorosa (Sumar, J. 1981). Esto último obedece a que el plasma seminal es altamente viscoso (parecido a la clara del huevo), por lo que el movimiento de los espermatozoides es lento, comparado al de ovino y vacuno. La motilidad progresiva de los espermatozoides de las alpacas y llamas es lenta lineal y oscilatoria. Raymundo y col (2006), usando vagina artificial encontraron una motilidad promedio en semen fresco de $54.0 \pm 8.0\%$

1.3.5 pH.

Oscilan en promedios de 7.2 a 7.4 reportándose valores cercanos a la neutralidad (Fernández Baca y Calderón (1966).

1.3.6 Anormales

Mogrovejo, D. (1952) reportó un 41.23% de formas anormales siendo las más frecuentes: cabezas solas, colas torcidas, microcabezas, pieza intermedia engrosada, colas rotas, cabezas alargadas, macro-cabezas, gota citoplasmática, entre otras. Dado que el semen fue obtenido mediante funda vaginal. Palomino, H. (1962) da un promedio de 11,65 %de formas anormales. Por otro lado, Sumar, J. (1991) encontró las siguientes anomalías más frecuentes en semen de alpaca obtenido por vagina artificial: gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal, colas torcidas, colas enrolladas, doble cabeza y cabezas pequeñas.

El porcentaje de anomalías se incrementa en relación a la frecuencia de eyaculaciones (Galindo, W. 1995).

Cuadro 1.1. Características Macroscópicas del semen de Camélidos sudamericanos.

AUTOR	ESPECIE	METODO DE COLECCION	VOLUMEN ml	COLOR	pH
Mogrovejo, D. 1952	Alpaca	Funda v.	0.4-6.6	Blanco cristalino	7.15-8.8
Fernandez Baca y Calderon 1966	alpaca	Funda v.	0.2-3.5	Blanco cristalino	7.5
San Martin y Col. 1968	Alpaca	Esponja v.	0.5-2.0	-	-
Sumar y Leyva 1981	Alpaca	V.A.	3.7-12.5	Blanco lechoso	-
Quispe, F. 1987	Alpaca	V.A	0.4-2.7	Blanco cristalino	-
Leyva y Col. 1984	Alpaca	V.A	2.8	-	-
Achata, R. 1989	Alpaca	V.A	0.35-4.3	Blanco cristalino	-
Garnica y Col. 1993	Alpaca	V.A	0.35-1.25	Blanco cristalino	-
Flores, E. 1993	Alpaca	V.A	0.64-2.65	Blanco lechoso	-
Galindo, W. 1995	Alpaca	V.A	1.64-1.80	Blanco cremoso	-
Perez, G. 1997	Alpaca	V.A	0.4-4.5	Blanco cristalino	-
Bravo, W. 1997	Alpaca	V.A	1.0-1.2	Blanco cristalino	-
Baca, L. 1998	Alpaca	V.A	0.5-3.2	-	-
Rivera, E. 1998	Alpaca	V.A	0.5-3.2	-	7.91
Verastegui, J. 2001	Alpaca	V.A	1.51	-	-
Mendoza, C. 2000	Alpaca	V.A	0.5-5.0-	Blanco lechoso	-
Cuba, Y. 2000	Alpaca	V.A	0.1-4.3	-	-
Paricahua, E. 2000	Alpaca	D.C.D	0.2-1.0	Blanco cristalino	7.88
Quintano, J. 2001	Alpaca	D.C.D.	0.2-1.0	Blanco transparente	-
Huanca, T, y Gaulty, 2001	Alpaca	V.A	2.09-1.4	-	-
Von Baer y Helleman. 1998	llama	V.A	3.5	-	8.6
Moscoso, R y Col. 1999	llama	V.A	0.3-3.0	Blanco cremoso	-
Aller, y Col. 2003	llama	V.A	2.2	-	7.4
Gonzales, y col. 2003	llama	V.A	0.55	Blanco cristalino	7.5
Fernandez, R y Col 2003	llama	V.A	0.1-3.2	Blanco cristalino	8.26
Delgado, P y Col. 2003	llama	V.A	0.5-3.2	-	-
Kubisceck, 1974	alpaca	F. uretral	1-21	-	-

Pacheco, J. 2008.

Cuadro 1.2. Características Microscópicas del Semen de Camélidos Sudamericanos.

AUTOR	METODO DE COLECCION	CONCENTRACION (ESP/mm ³)	MOTILIDAD (%)	VITALIDAD	ANORMALIDADES
Mogrovejo 1952	Funda v	63 000-107 600	-	-	41.23
Fernandez baca y Calderon 1966	Funda v	1000-225000	-	-	-
Kuviceck 1974	f. uretral	60000-600000	-	-	-
Sumar y leyva 1981	V.A.	600000	-	-	-
Leyva y col 1984	V.A.	292 900	-	-	-
Cardenas y col 1987	V.A.	843 230	30.6	-	-
Quispe 1987	V.A.	5000 – 472500	51.57	62.4	-
Galindo 1995	V.A.	9211-107000	-	51.57	18.5
De la vega 1996	V.A.	17200	62.78	-	-
Pacheco 1996	V.A.	77832	-	-	-
Perez 1997	V.A.	267700	64.91	-	-
Bravo y col 1997	V.A.	11800-72400	80.0	72.05	26.03
Rivera 1998	V.A.	163300	53.92	44.15	-
Verastegui 2001	V.A.	52375	-	40.38	-
Mendoza 2000	V.A.	264700	20.18	-	19.90
Cuba 2000	V.A.	75000	-	87.84	-
Moscoso y col 1999	V.A.	131000	52.3	16.6	-
Paricahua 2001	D.C.D	5150000	-	94.25	-
Quintano 2002	D.C.D.	2387000	64.81	62.47	-
Huanca y Gaulty 2001	V.A.	80000	-	-	-
Von Baer y helleman 1998	V.A.	8470000	25.5	-	32.5
Aller y col 2003	V.A.	7520000	54.3	68.5	-
Gonzales y col 2003	V.A.	2870000	25.7	31.8	-
Fernandez y col 2003	V.A.	4650000	32.5	70.04	-

Pacheco, J. 2008

1.4. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN

Una de las dificultades para el estudio del semen de ésta especie es precisamente su colección por presentar características peculiares en cuanto a la monta y el tiempo de cópula. Son de temperamento sumamente nervioso lo que dificulta su manejo. Estas circunstancias hacen que la obtención del semen de la alpaca presente dificultades (Fernández B. y Novoa, C. 1968). Algunos de los métodos empleados se describen a continuación.

1.4.1. Funda Vaginal.

Mogrovejo (1952) realizó uno de los primeros trabajos para coleccionar semen mediante una funda de jebe colocada intravaginalmente antes de la cópula en hembras receptoras. Obtuvo muestras de 50 machos de 3 a 7 años con las características siguientes: volumen 0.4 a 6.6 ml con una media de 1.98 ± 0.26 ml, color blanco variando del cristalino al lechoso. La motilidad fue baja con un grado 2 (escala del 0 al 5). Concentración de espermatozoides

mínima fue de 6,300/ mm³ y la máxima de 107,600/ mm³, los valores de pH estuvieron en rango de 7,15 a 7,8 con una media de 8,32±1,18. Las formas patológicas variaron de 21 a 59,7% con una media de 44,23%.

1.4.2. Esponja intravaginal

San Martín (1961) diseña un método de colección que consistía en fracciones de esponjas que fueron colocadas en la parte anterior de la vagina de alpacas receptoras y que al momento de la cópula absorbían semen además de fluidos vaginales.

1.4.3. Electro eyaculación

Fernández B. y col. (1966) describieron la técnica de electro-eyaculación, usando un electrodo bipolar que se introduce en el recto en una longitud no mayor de 10 cm. El trabajo se inicia aplicando una asociación de 10 a 15 estímulos de corta duración (2 a 3 segundos a intervalos similares) hasta llegar a unos 15 a 20 voltios, con esta primera serie se consigue la erección del pene.

Fernández, B. y col. (1966), usando este método encontró las siguientes características: color del semen de blanco cristalino a blanco lechoso, aspecto viscoso, volumen muy variable de 0.2 a 3.5 ml, concentración muy variable de 1000 a 255,000/ mm³ y la motilidad llegó hasta 3 (escala del 0 al 5).

Este método ofrece ventajas porque se obvia el uso de hembras en celo, se acorta el tiempo de colección y es aplicable en cualquier época del año. Sin embargo, presentan serias dificultades debido al elevado número de impulsos eléctricos y a la contaminación frecuente del semen con la orina que era emitido al momento de la aplicación de los estímulos (Bravo. C. y Ordoñez, C. 1997).

1.4.4 Fístula uretral

Kubicek, J. (1974) practicó una fístula uretral en 7 alpacas, de las cuales solo 3 mantuvieron funcionales por varias semanas, obteniendo volumen de 1 a 2.1 ml de semen con una concentración que varía de 60,000 a 600,000 espermatozoides / ml, reportando además que el intervalo entre montas afecta la calidad del semen. Esta técnica tiene el inconveniente que la operación es dificultosa, además la fístula se obstruye e infecta con frecuencia e inutiliza al animal. Esta técnica no puede usarse para la evaluación de reproductores.

1.4.5. 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 ó 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 la mejor manipulación espermática (Paricahua, 2001 y Quintano, 2002 Citado por Pacheco, J. 2008).

1.4.6. Vagina artificial

Sumar, J. y Leyva, C. (1981), desarrollaron esta técnica mediante la simulación de la cópula normal para lo que se construye un maniquí en la forma de hembra sentada en posición de cópula. La vagina artificial se construyó de un tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 cm de largo con una funda interna de látex. El agua a 45°C se colocaba por una válvula lo mismo que el aire. Los machos aceptaron el maniquí después de un entrenamiento corto. La cópula se interrumpía cada 10 minutos para renovar el agua de la vagina artificial. El volumen de semen colectado varió, obtuvieron semen con volúmenes de 3,7 a 12,5 ml. de volumen y concentración promedio de 292, 000 ±84, 000 espermatozoides/ml.

Raymundo *y col.* (2006), usando el método de vagina artificial, obtuvo un tiempo promedio de cópula de 26.5 ± 3.8 minutos, un volumen de 2.7 ± 0.8 ml, viscosidad de 1.04 ± 0.3 , motilidad de $54.0 \pm 8.0\%$, pH con tendencia a la alcalinidad, concentración de 248,100 espermatozoides/ml, y el color que predominó fue el blanco lechoso

Quispe, F. y Olarte, P. (1988), usando el mismo método de colección evaluaron a 10 alpacas machos de 3 y 4 años de edad observando en el semen de color blanco y lechoso, consistencia viscosa, motilidad lenta, volúmenes de 0.4 a 0.5 ml. con variaciones de 0.1 a 2.7 ml, concentración de 145, 000 a 97, 997 espermatozoides/mm³, y de 37,6% a 38,6% espermatozoides muertos.

Bravo, W. (1998) y Dávalos, R y Olazabal (1998), usando una hembra en celo colocada en posición de cópula en vez de un maniquí para coleccionar semen con vagina artificial, obtuvo un volumen de 2.3 ± 0.9 ml., una concentración de $339,040 \pm 163, 120$ espermatozoides/mm³, y una motilidad de $30.6 \pm 13.1 \%$. Por su parte, Dávalos (1998) obtuvo un tiempo de copula de 16.8 ± 0.7 minutos, un volumen de 1.73 ± 0.09 ml, una motilidad de $68.9 \pm 4.9 \%$, y una concentración espermática de $57,5 \pm 8.3 \times 10^4$ espermatozoides/mm³.

Chipana (1997) aplicó el método de vagina artificial en alpacas hembras sin importar que tengan receptividad sexual. Las características de semen encontrado fue de color blanco cristalino a lechoso, aspecto viscoso, pH de 7,5 a 7,8 Volumen de 0,4 a 3 ml concentración de 223, 281 espermatozoides/ mm³.

Ferré, L. Werkmesiter, A. (1996) desarrolló una vagina artificial cuya finalidad fue mantener una temperatura similar al de la vagina de la hembra, permitiendo además que el eyaculado no sufra ningún tipo de alteraciones fisiológica y/o funcionales, esto se logró gracias a un sensor de temperatura de precisión y un termostato.

En resumen, los reportes sobre métodos de colección de semen son diversos, desde el uso de sacos vaginales (Mogrovejo *y col.* 1952), esponjas vaginales (San Martín, F. 1961) y electro eyaculación (Fernández-Baca y Calderón 1965; Calderón W. 1968); con las consiguientes dificultades para los machos durante la cópula y la calidad del semen. Posteriormente se reporta el uso de una vagina artificial adaptada de ovinos (Sumar, J. y Leyva, C. 1981), que

si bien mejora la técnica de colección aún presenta dificultades para mantener una temperatura adecuada durante el largo de la cópula.

El uso de una frazadilla eléctrica cubriendo la vagina Artificial, permite algunas mejoras en la técnica de colección, facilitando el mantenimiento de la temperatura (Gauly, M. and Leindiger, J. 1996). Igualmente, el uso de un maniquí (Sumar y Leyva, 1981) o la colección con hembra receptiva (Gauly and Leindiger. 1996) se presentan como alternativas para la colección de una muestra de semen fisiológicamente normal; sin embargo, se requiere un entrenamiento de los animales y no siempre todos los machos llegan a aceptar el maniquí; mientras que el uso de hembra receptiva genera incomodidades en el operador.

1.5. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL PLASMA SEMINAL

Garnica, J. y Achata, A. (1989), estudiaron la composición química del plasma seminal de 10 alpacas. Las muestras se obtuvieron empleando vagina artificial y se centrifugaron después de 10 horas de incubación a 37°C en promedio. Los resultados fueron materia seca $7,029.87 \pm 437.78$ mg/dl, cenizas 605.49 ± 24.72 mg/dl, fructosa $5,61 \pm 1,11$ mg/dl, ácido cítrico 6.87 ± 1.51 mg/dl, fósforo inorgánico 9.62 ± 0.99 mg/dl, glucosa 6.16 ± 0.39 mg/dl, fosfolípidos 28.74 ± 0.53 mg/dl, lípidos totales 90.51 ± 7.09 mg/dl, nitrógeno total $597.38 \pm 32,35$ mg/dl, proteína total 3.73 ± 0.20 mg/dl, albúmina 2.12 ± 0.19 mg/dl, globulinas 1.62 ± 0.18 mg/dl, urea 50.57 ± 2.86 mg/dl, ácido úrico 0.69 ± 0.09 mg/dl, cloro 376.06 ± 23.72 mg/dl, calcio 17.89 ± 1.61 mg/dl.

1.6. PROCESAMIENTO DEL SEMEN

1.6.1. Dilutores

La principal función de los diluyentes es la de proveer de nutrientes y conservar la fertilidad de las células espermáticas, además de aumentar el volumen total; teniendo estas sustancias medios isotónicos con pH neutro (Salisbury, G. y Dermark, V. 1982).

El plasma seminal solamente proporciona limitada protección a los espermatozoides contra los cambios en la temperatura para almacenar una temperatura baja es necesario diluir el semen en diluyentes especiales (Salomón, S. Maxwell, W. 1985).

Los dilutores aportan al semen elementos nutritivos para los procesos metabólicos, protección contra el choque frío, efecto amortiguador contra el ácido láctico producido por el metabolismo de los espermatozoides, una sustancia reductoras para la protección frente a determinadas enzimas y anhídrido carbónico que pone un alto a la motilidad y disminuye el metabolismo de los espermatozoides (Hafez, E. 2002).

La conservación de las células espermáticas, se basan esencialmente en ofrecer nutrientes adecuados, que tengan además la propiedad de neutralizar los cambios de pH, consecuente al ácido láctico producido por el metabolismo de los azúcares (efecto tampón), que otorgue protección a las células espermáticas frente al descenso de temperatura (yema de huevo), necesario para inhibir el metabolismo, impidiendo el desgaste prematuro de las células (Hafez, E. 2002).

La literatura menciona que los dilutores deben cumplir con las siguientes propiedades:

- Que tengan presión osmótica como el semen en su estado normal y que sea capaz de conservarla durante el almacenamiento
- Que proporcionen nutrientes a los espermatozoides tanto en los procesos metabólicos aerobios como anaerobios
- Brinden glicoproteínas, lecitinas o ambas para proteger a los espermatozoides del choque térmico.
- Tenga propiedad tampón para evitar cambios nocivos de pH en cuanto se forme ácido láctico.
- Que no contengan bacterias o microorganismos patógenos para las células reproductoras; el aparato reproductor de la hembra; procesos de fecundación; implantación y desarrollo del huevo fecundo (Herrera, E. 1986).

Muchos dilutores para semen han sido utilizados en programas de inseminación artificial en muchas especies domésticas; se ensayó varios dilutores para semen de alpacas, entre ellos leche descremada, PBS, glucosa-citrato, yema-glucosa-citrato, triladyl, tris, de todos estos el mejor dilutor encontrado fue el Hidroximetil amino metano (tris); en un estudio para probar la acción de tres dilutores y su evaluación después de 2 horas, se utilizaron PBS, leche descremada y glucosa-yema-citrato, obteniéndose 61.1, 60.8 y 64.0 % de espermatozoides vivos respectivamente en el momento de la colección, estos porcentajes disminuyeron después de dos horas de incubación en agua a 37 °C a 22.2, 15.6 y 35.4% respectivamente y

al evaluarlos después de 24 horas, la glucosa-yema-citrato obtuvo 70 % de espermatozoides vivos, leche descremada tuvo 68% y glucosa citrato 60% (Bravo, W. 2002).

Otros dilutores probados en semen de alpaca colectado por vagina artificial fueron el PBS, citrato, tris y lardy + yema, la sobrevivencia de espermatozoides fue de 5, 4.48, 0.0 y 16.62% respectivamente, el lardy + yema disminuyó a 10.35 % a los 45 minutos (Mendoza, 2000; citado por Pacheco, 2008).

El tiempo de sobrevivencia de espermatozoides colectados por vagina artificial es importante por lo cual se evaluó la acción de la yema de huevo en la conservación y la glicerina en la congelación, usados en diferentes concentraciones, encontrándose que la mejor proporción de yema de huevo es de 20 % ya que la glicerina a diferentes concentraciones no representa diferencia significativa, a las 18 horas se tuvo una sobrevivencia de 21.78%, con un porcentaje inicial de 56.66% (Rivera, E. 1998)

1.6.2 Componentes de los Dilutores.

Los componentes básicos de los dilutores para el semen son: agua destilada como solvente, sustancias iónicas y no iónicas para mantener la osmolaridad y el pH del medio, sustancias orgánicas (yema de huevo o leche) para impedir el choque de frío, azúcares simples como fuente de energía, aditivos como enzimas que mejoren la fertilidad y antibióticos (penicilina, estreptomicina) para controlar el crecimiento bacteriano (Salisbury, S. Dermark, V. 1982).

1.6.2.1. Fuentes de energía

Los principales sustratos de energía son: fructosa, sorbitol y glicerilfosforilcolina, los cuales se encuentran en el plasma seminal (Bearden, J. 1982).

La fructosa no es la única azúcar que puede ser metabolizado por los espermatozoides, de modo similar pueden ser aprovechados la glucosa, manosa, maltosa; y algunas otras que a veces se añaden a los diluyentes, cumpliendo las tareas de fuentes de energía y protección de espermatozoides (Pérez, F. 1985).

1.6.2.2. Sustancias orgánicas

La yema de huevo contiene un factor protector espermáticos, siendo este mayor cuando se trata de huevos frescos y sobre todo, en los procedentes de aves salvajes como la perdiz, faisán, etc. Las lecitinas constituyen un factor importante de la acción beneficiosa que la yema de huevo posee sobre los espermatozoides, que se manifiesta durante la conservación (Pérez, F. 1985).

Por otro lado, la leche al igual que el líquido espermático contiene fosfatos, citratos y azúcares, siendo también preconizado como un medio de dilución por muchos autores (Derivaux, J. 1982). Cabe mencionar que se usó exitosamente la lactosa como principal componente de los dilutores a base de leche para el congelamiento del semen de toro. Esto estimuló su aplicación en el semen de carnero, encontrándose que la leche es un medio adecuado para suplir las necesidades energéticas y protectores a los espermatozoides; sin embargo, es necesario ser calentado a 92-95°C por espacio de 10 minutos para destruir las enzimas que dañan a los espermatozoides (Salomón, S. Maxwell, W. 1985).

Prácticamente, todos los diluyentes para semen líquido o congelado tienen yema de huevo o leche descremada o una combinación de estas dos, como componentes básicos. Es posible que el suero sanguíneo al igual que la yema de huevo ofrezca una protección a la membrana de los espermatozoides durante el proceso de refrigeración y congelamiento (Pacheco, J. 1996).

1.6.2.3. Amortiguadores

La capacidad tampón que proporciona el citrato, permite una extensión en la conservación de la fertilidad de los espermatozoides al evitar cambios en el pH, así como al neutralizar el ácido producido por la actividad metabólica de los espermatozoides (Cole, H. y Cups. 1984). El ácido cítrico segregado también por las vesículas seminales no es metabolizado por los espermatozoides y, probablemente sirve como fuente tampón, además mediante la fijación de calcio, mantiene junto con los iones sodio y potasio el equilibrio osmótico (Holy, L. 1983).

El uso de Hidroximetil amino metano (Tris) en los diluyentes para congelamiento de semen de carnero fue reportado por muchos investigadores en los inicios de 1970, puesto que

poseía una capacidad amortiguadora y actividad osmótica, además de su baja toxicidades a altas concentraciones (Salomón, S. Maxwell, W. 1985).

Los diluyentes a base de Hidroximetil amino metano (tris) son del tipo amino – orgánicos y, durante el periodo de refrigeración protegen el acrosoma de los espermatozoides de manera más efectiva (Cortez, Montero, 1995).

1.6.3 Dilutores Comúnmente Usados

A la fecha se han usado varios dilutores en semen de alpaca, entre ellos se encuentran: Leche descremada, fosfato salino tamponado, glucosa- citrato, yema de huevo-glucosa-citrato, Tryladil, Suero de Albúmina Bovina (BSA), y tris tamponado. El mejor dilutor para semen de alpaca parece ser el Hidroximetil amino metano (Tris) tamponado (Bravo, W. 1989).

Las causas de muerte espermática en el semen diluido en medios a base de leche y yema de huevo se deben a un particular acumulo de acido láctico y pirúvico, fenómeno que está relacionado con el metabolismo de los carbohidratos y que, se potencia bajo el efecto de la yema de huevo, hecho que justifica la necesidad de asociar la yema de huevo y soluciones buffer a fin de mantener cierta estabilidad biológica en lo que se refiere a la acidosis (Pérez, F. 1985).

Experiencias realizadas en semen ovino, usando dilutores a base de Tris-glucosa-yema de huevo y leche-yema-fructuosa, lograron registrar una motilidad post congelamiento de 36.9 y 24,9% respectivamente (Quispe, F. Olarte, P. 1998). Por otro lado, trabajos realizados en semen de caprino, dan como mejor dilutor al compuesto por citrato-yema frente a la leche descremada-yema (Palomino, H. 2000).

De igual manera, Alarcón (1984), obtuvo un promedio de 62.7% de motilidad para dos horas de equilibrio, con el diluyente compuesto por tris, acido cítrico, fructuosa, yema de huevo y 12.8% de glicerol. Por otro lado, Cortez, S. (1995), reporto 59,3% y 46,2% de motilidad espermática, para 2 y 24 horas de equilibrio a 5°C respectivamente, utilizando un diluyente a base de leche descremada.

Por otro lado, se midieron los porcentajes de sobrevivencia de semen diluido en PBS mas 40% de suero fetal mas 5% de yema de huevo y 5% de glicerina bajo tres sistemas de

conservación: refrigerado, congelado, y fresco, los cuales fueron de 44.71%, 33.52%, 46.32%, respectivamente. La descongelación del semen se realizó a 35°C por espacio de 30 segundos (Pérez, G. 1996).

1.7. EXPERIENCIAS EN LA CONSERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA

Los estudios sobre conservación de semen no son totalmente satisfactorios, particularidades como la alta viscosidad del semen de alpacas y llamas (Lichtenwalner, A. y Weber, 1996) se constituyen en factores que dificultan el desarrollo de las técnicas de conservación, dificultando la determinación de la concentración, morfología y motilidad espermática, además del alto porcentaje de espermatozoides anormales (Fernández Baca, 1993) y una motilidad oscilatoria (Garnica, J. 1993; Sumar, J. 1997). Intentos para reducir la alta viscosidad ha sido reportada, mediante el uso de enzimas como la colagenasa, hyaluronidasa y tripsina (Bravo W. y col, 2000) o mediante una acción mecánica (Valdivia, y col. 1999). Los resultados observados son variables y si bien con el uso de la enzima se observa motilidad espermática, esta característica no siempre se ha reflejado en mejoras en la tasa de preñez. Igualmente existe poca información sobre el uso de dilutores, reportándose el uso de Yema – citrato (Pacheco, J. 1998), solución de Suero de Albúmina Bovina (BSA) y Glucosa (Huanca W. y Gaulty, M. 2001), Tris – Glucosa – Yema de Huevo (Raymundo, F. 2006).

Los reportes sobre semen congelado son muy escasos; así tenemos que un estudio realizado con semen obtenido por electro eyaculación y diluido con Tris – Yema huevo – Glicerol, solo se observó un 10% de motilidad post descongelamiento (McEvoy, T. Kyle, C. 1992); así mismo otro estudio con semen tratado con colagenasa y posteriormente diluido con citrato de Sodio – Yema huevo – Glicerol (7 %) permite obtener una motilidad entre el 30 – 40 % (Bravo, P y col. 1997).

(Pacheco, J. 2008) realizaron la comparación de tres dilutores en la refrigeración de espermatozoides epididimales, utilizando los dilutores: tris +fructosa + ácido cítrico + yema (20 %), leche descremada + glucosa y leche descremada + sales, realizando la colección de espermatozoides post-mortem desde el epidídimo, se realizó el lavado de estos en solución TALP y centrifugados, se realizó el enfriamiento lento hasta 5°C y se mantuvo así por 72 horas, luego se calentaron en baño María por 3 minutos y fueron evaluados, el segundo dilutor fue el mejor ya que solo disminuyó su motilidad solo cerca de 10%, el primer dilutor

causa una gran caída de la motilidad entre las 48 y 72 horas, mientras que el último dilutor causó una disminución de la motilidad en cerca de 50 %, se recomienda el uso del dilutor Kenney (leche descremada + glucosa) para ser utilizado en la conservación de espermatozoides colectados del epidídimo.

El uso de Etilenglicol como agente crioprotector ha sido reportado, permitiendo una tasa de motilidad post descongelamiento del 20 % (Pacheco, J. 2008). A pesar de estos resultados a la fecha no se ha reportado estudios que nos permitan señalar la factibilidad de congelar semen de camélidos. Posiblemente, como sucede con otras especies, no va a ser fácil congelar semen, más aún si a las dificultades de contar con un dilutor apropiado, hay que considerar los altos porcentajes de anomalías presentes en los eyaculados.

El proceso de congelación necesita estabilizar la integridad de las células espermáticas para que no sean destruidas durante el transcurso de la congelación, es así que se evaluaron diversos dilutores para ser usados en la criopreservación de espermatozoides, encontrándose que el mejor dilutor para este fin es el Hidroximetil Amino Metano (TRIS) (Bravo, W. 1998). En un intento por mejorar las características seminales a la congelación/descongelación, se evaluó la acción de diferentes concentraciones de yema de huevo y de la glicerina, encontrando motilidad individual en semen conservado a 5°C de 72.3, 73.1, 64.7 % con 10, 20 y 30 de yema de huevo respectivamente en alpacas. Estos valores a la descongelación fueron para alpacas diluido con el 10 % de yema de huevo más 2.5, 5.0 y 7.5 % de glicerina fue de 22.5, 27.7 y 34.4 % respectivamente, con 20 % de yema fue de 31.4, 39.2 y 41.0 respectivamente y con 30 % de glicerina fue de 32.4, 36.2 y 38.7% respectivamente.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. LUGAR

El presente estudio se realizó en la subestación experimental Quimsachata perteneciente al Instituto Nacional de Investigación Agraria - INIA-PUNO.

- Región : Puno
- Provincia : Lampa
- Distrito : Santa Lucía
- Altitud : 4,200 m.s.n.m.
- Lugar : Centro de Investigación y Producción
Quimsachata

El C.I.P. Quimsachata se encuentra a 15° 04'00" de Latitud Sur y a 70° 18'00" Longitud Oeste con una área 6,282.50 has, el acceso es por trocha carrozable del Distrito Santa Lucía a 12 Km., la temperatura promedio es de 2,7°C media anual, la precipitación pluvial media anual es de 688, 23 ml/m².

2.2. PERIODO Y TIEMPO DE EJECUCIÓN DEL TRABAJO.

El desarrollo del trabajo se desarrolló entre los meses de enero, Febrero, Marzo y Abril, época en que la sierra peruana como el C.I.P Quimsachata, está en plena lluvia, lo que permite tener pastizales en abundancia, a demás de ello es un periodo en que las alpacas están en pleno proceso de lividez sexual.

Los análisis de datos se realizaron en el laboratorio de producción y Reproducción animal de la E.F.P. de Medicina Veterinaria de la U.N.S.C.H.

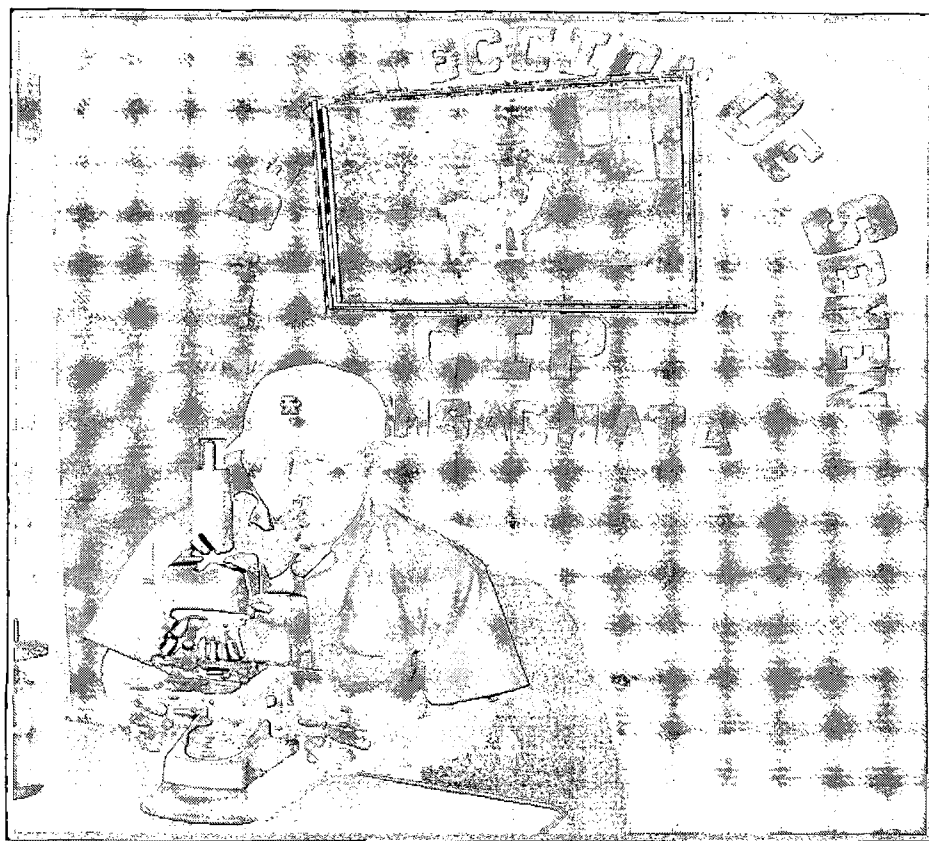


Foto 01: Laboratorio CIP. Quimsachata-INIA-Puno

2.3. MATERIALES Y RECURSOS

A) SEMOVIENTES (Alpacas)

8 reproductores machos adultos en edades reproductivas de **03 a 05 años** de edad, todos de **Raza Huacaya, color Blanco**, en perfecto estado de salud y buena condición corporal, preparados y entrenados como donadores de semen

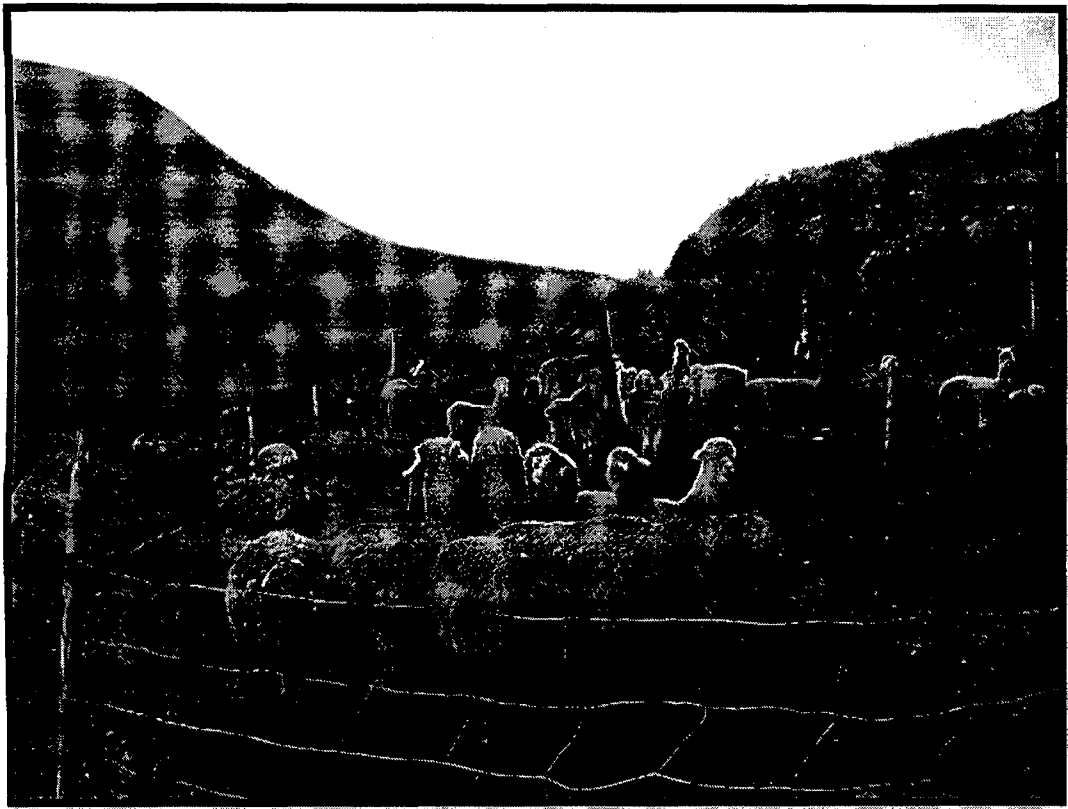


Foto 02: las 8 Alpacas Donadoras de Semen del CIP Quimsachata para la presente investigación

B) MATERIALES E IMPLEMENTOS

- Maniquí.
- Vagina artificial.
- Tuvo colector graduado de 15 ml.
- Tubo Falcon
- Fundas vaginales para vacuno, ovino.
- Preservativo (condones)
- Bolsas de polietileno
- Insuflador de aire.
- Protectores de esponja.
- Alfombra.
- Caja térmica de tecnopor.
- Sogas.
- Botas de jebe.
- Franela.
- Cámara fotográfica
- Rollo para fotografías
- Termos para agua caliente.

- Toalla y algodón.
- Baldes.
- Jabón desinfectante.
- Ligas y soguillas de goma.
- Jeringas descartables de 1ml, 5ml, 10ml, 20ml.
- Viales(caps. de 2ml)
- Cubre objetos.
- Porta objetos.
- Cámara de Neubauer.
- Pipetas.
- Gradilla.
- Gotero.
- Masking.
- Rotulador.
- Vasos de precipitación.
- Alcohol desinfectante.
- Guantes quirúrgicos.
- Antibióticos: Gentamicina, kanamicina, o penicilina - estreptomicina.
- Glucosa.
- TRIS
- BSA (albúmina de suero bovino)
- Acido cítrico
- Fructosa
- Huevo fresco
- Colorantes: Eosina, nigrosina.
- Tubos de ensayo.
- Detergente.
- Libreta de campo

C) EQUIPOS

- Microscopio eléctrico.
- Cocina a gas.
- Balón de gas.
- Generador de luz.

- Estabilizador.
- Termómetro digital.
- Balanza de precisión.
- Frazadilla eléctrica.
- Refrigeradora
- Cables y Extensión eléctrica.



Foto 03: Materiales Utilizados para el trabajo experimental.

2.4. PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO

2.3.1. Entrenamiento de Machos

Los animales fueron entrenados cuatro veces por semana durante las cinco semanas antes del periodo experimental, tiempo que sirvió para el acostumbramiento de los animales a la presencia humana, y las constantes manipulaciones, ya que estos manifestaban cierto nerviosismo al momento de acercárselas. En este proceso se les entrenó a la postura correcta sobre el maniquí y la eyaculación sin dificultades en la vagina artificial preparada a la

temperatura interna de 40° C. Cabe señalar que las alpacas todas han sido en edad adulta y con capacidades reproductivas de 03 a 05 años, todos de raza Huancaya y de color blanco.

Las muestras de semen obtenido durante esta etapa fueron llevadas al laboratorio del mismo centro de investigación, donde se realizaron análisis de semen como motilidad, viscosidad, color, volumen.

2.3.1. Colección de semen.

La colección se realizó utilizando una vagina artificial colocada en el interior de un maniquí el cual tiene la posición de una hembra en celo. La vagina artificial consta de un tubo de PVC de 18 cm de largo por 5 cm de diámetro, al cual se le adaptó una válvula en la parte media.

Para el armado de la vagina artificial se colocó internamente una funda de látex usada para colección de semen en vacuno, luego esta funda es doblada y asegurada en un extremo para poder introducir agua a 42° C. en el espacio entre la funda y el tubo hasta la mitad de este espacio, para luego asegurar el extremo libre. Una vez asegurada la funda se insufla aire para simular una presión similar al medio interno de la vagina permitiendo así una fácil penetración del pene.

Posteriormente en uno de los extremos se colocó una funda cónica de polietileno y en el extremo un tubo graduado recubierto con una esponja para aislar de posibles riesgos de ruptura u otras causas como los golpes, entre otros, posteriormente la vagina artificial fue cubierto con una frazadilla eléctrica con el propósito de conservar la temperatura constante, una vez preparada la vagina artificial envuelta con la frazadilla eléctrica como medio de mantener una temperatura constante fue colocada en el interior del maniquí, sujeto por medio de fajas. En ambos extremos.

Las muestras de semen colectadas para el trabajo corresponden a las obtenidas por una monta sin interrupciones, es decir hasta que el animal se levante voluntariamente del maniquí, como signo de haber dado por terminado el proceso de eyaculación.

Terminada la cópula se retiró la vagina artificial envuelta por la frazadilla, transportándola hasta el laboratorio, teniendo cuidado de exponer a la luz solar. En el laboratorio se retiró la frazadilla e inmediatamente se colocó la muestra en baño maría a 37 °C; para evitar el choque térmico ambiental.

- Los machos fueron sometidos a la colecta cada 3 días, esto para evitar el sobre uso y la pérdida de condición del animal.



Foto 04: Alpaca en plena posición Copulatoria sobre el maniquí

2.3.2 Evaluación del semen fresco.

La colección de semen se realizó en el laboratorio de la Estación Experimental Quimsachata, a una temperatura promedio de 37°C, esto con el fin de mantener una temperatura constante y evitar cambios bruscos de temperatura esta tarea de mantener la temperatura constante será hasta llevarlo a la refrigeradora.

- **Volumen.-** Posterior al retiro de la vagina artificial del maniquí fue colocada en posición vertical para permitir una deposición total del semen en el tubo graduado facilitando así la medida del volumen total evacuado.

- **Color.-** La evaluación del color se realizó de manera macroscópica, considerando un rango de variación entre claro cristalino a blanco lechoso.

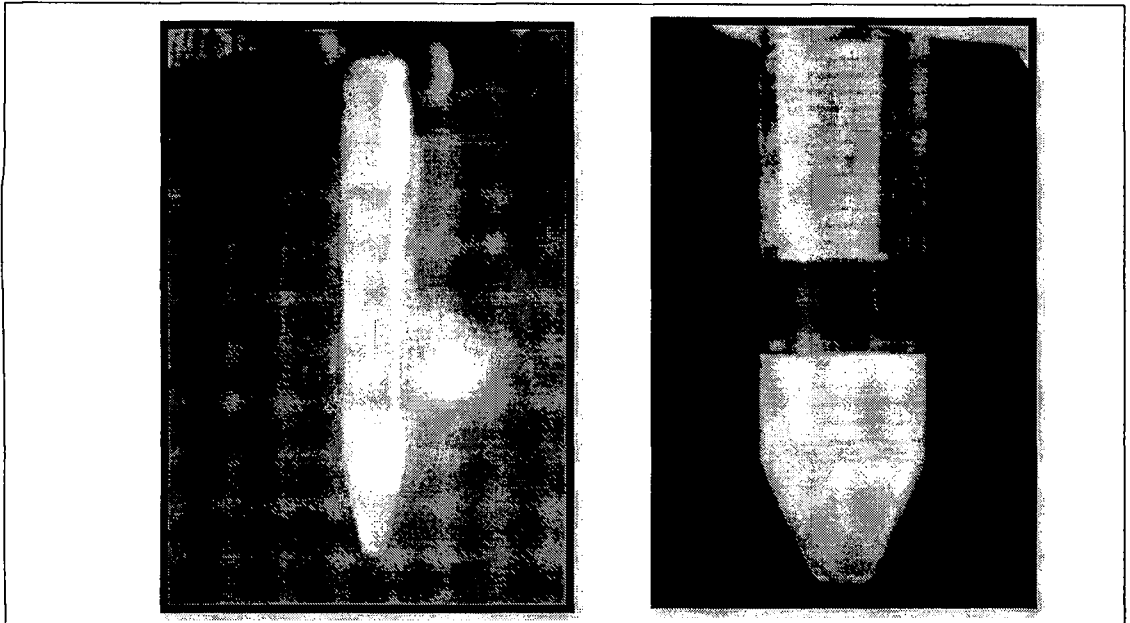


Foto 05: Volumen y Color de Semen de Alpaca colectado mediante la Vagina Artificial en la presente investigación.

- **Viscosidad.-** Para la determinación de la viscosidad se colocó en un portaobjetos aproximadamente una gota de semen, adhiriendo en un extremo con una aguja hipodérmica. Para posteriormente levantarla y considerarla como medida de la viscosidad, la extensión del semen justo antes de romperse.



Foto 07: Muestra fotográfica de la Medida de la Viscosidad del semen evaluado

- **Motilidad.-** Se determinó con la ayuda de un microscopio utilizando un objetivo de microscopio de 40X. Se colocó una alícuota de semen en un portaobjeto para evitar el choque de frío se usó una platina precalentada para mantener una temperatura adecuada.

El porcentaje de motilidad fue determinada mediante un conteo de 5 campos diferentes del total espermatozoides en cada campo, y en base a ello se contabilizó el número de espermatozoides vivos y el número de espermatozoides muertos, se repitió este proceso en los 5 campos de conteo; lográndose sumar el total de espermatozoides entre vivos y muertos, desde allí entonces, se logró contabilizar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

$$\text{Motilidad. \%} = \frac{\text{N}^\circ \text{ Espermatozoides móviles (M)}}{\text{N}^\circ \text{ Espermatozoides contados (N)}} \times 100$$

N= Número total de espermatozoides contabilizados.
M=Número de total de espermatozoides vivos (móviles).

- **Concentración.-** La concentración se expresa como el número de espermatozoides por milímetro y se determinó con la ayuda de un hemocitómetro o cámara de Neubauer a una dilución de 1:100.

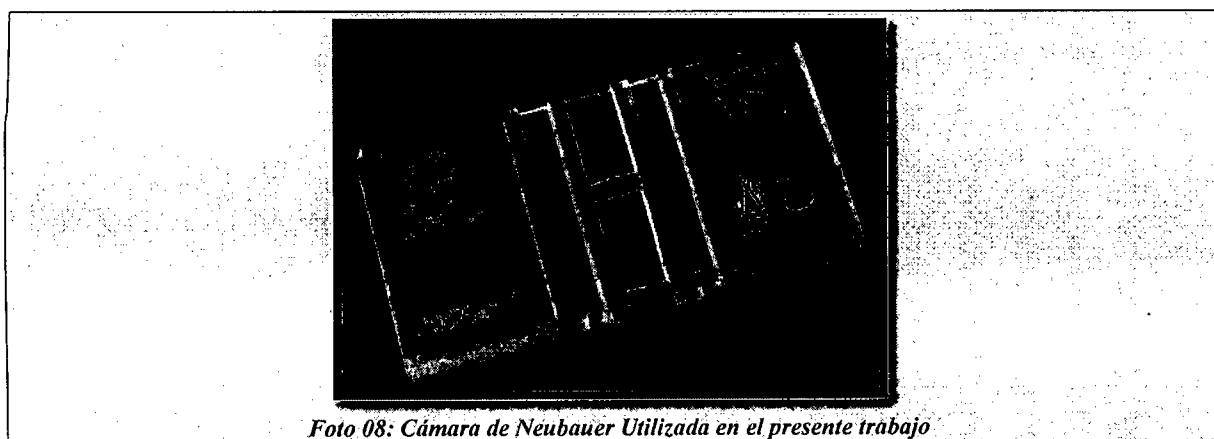


Foto 08: Cámara de Neubauer Utilizada en el presente trabajo

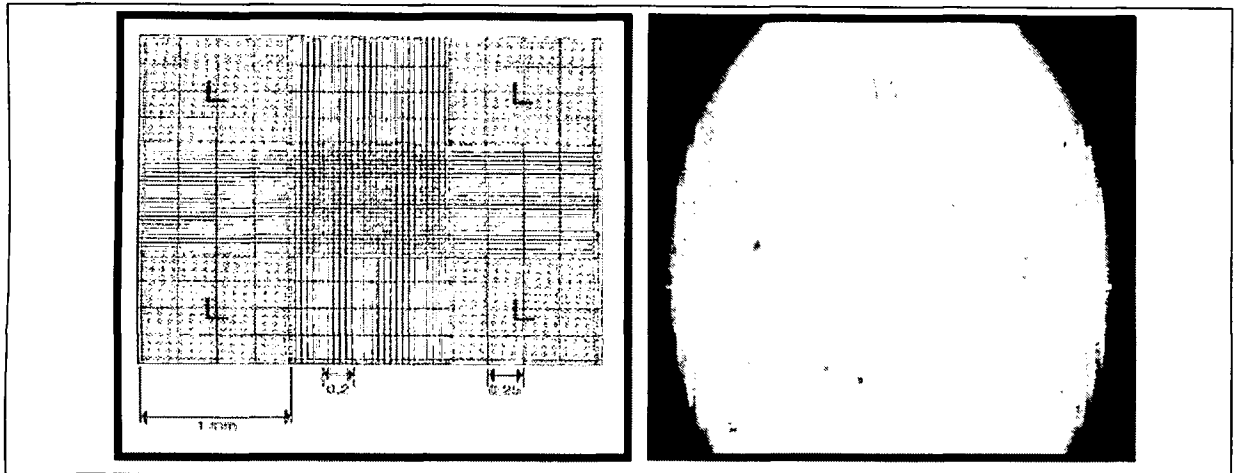


Foto 09: Muestra Fotográfica a cerca del proceso de conteo, para determinar la concentración espermática de semen de alpaca

Para disminuir la viscosidad del semen se dejó en baño María por un tiempo promedio de 10 min. Luego se aspiró semen con la jeringa de tuberculina, hasta la marca de 0.1 ml décima parte de 1 ml, y se completó hasta la marca de 1 ml con agua bi-destilada (solución fisiológica de cloruro de sodio) se mezcló la muestra agitándolo suavemente y luego se le colocó en un una muestra en ambos lados del hemocitómetro, se dejó sedimentar por 5 minutos. El recuento se practicó a 40X, se contó 5 de los cuadrantes, 4 de los extremos y uno del centro de ambos campos para luego obtener el promedio.

- **Porcentaje de espermatozoides vivos, y porcentaje de anormales.-** Mediante la coloración de Nigrosina (10%) y eosina (5%) se tomó una alícuota de semen y se colocó en el extremo de lámina portaobjetos previamente calentada, esta fue mezclada con una gota de colorante a temperatura de 37°C, luego con la ayuda de otro portaobjetos se procedió a realizar el frotis, cabe señalar las dificultades para preparar el extendido, es debido a la naturaleza viscosa del semen por lo que no se obtiene una buena coloración.

2.3.3 Preparación de los Dilutores.

Los dilutores usados para el presente trabajo tuvieron la siguiente composición.

a) TRIS-GLUCOSA

- ✓ Ácido cítrico 1.36 gr.
- ✓ Glucosa 0.82 gr.
- ✓ TRIS 2.44 gr.
- ✓ Yema de huevo 20 ml (20 % del volumen del dilutor)
- ✓ Penicilina 10 000 UI.
- ✓ Estreptomicina 100 mg.

b) BSA-GLUCOSA

- ✓ BSA 3 gr.
- ✓ Glucosa 6 gr.
- ✓ Penicilina 10 000 UI.
- ✓ Estreptomicina 100 mg.

Los dilutores Tris-glucosa y BSA-glucosa fueron llevados a 100 ml agua des ionizada y bidestilada. La yema de huevo componente del primer dilutor fue recolectada el mismo día de la preparación del dilutor, estos se mantuvieron en baño María a 36°C, para que al momento de la dilución se encuentre a la misma temperatura que el semen. El dilutor fue agregado en forma lenta por las paredes del tubo, teniendo cuidado de agregar el dilutor lentamente y no formar burbujas ni provocar daños a las células espermáticas con el choque térmico.



Foto 10: dilutores Usados en el presente trabajo de investigación

2.3.4 Dilución del Semen.

Antes de la dilución el semen fue aspirada por una jeringa de manera cuidadosa y depositado en un tubo de prueba se usó una aguja fina con la finalidad de reducir la viscosidad de manera mecánica; posterior a ello se realizó la dilución con una parte de semen y dos de los dilutores mencionados.

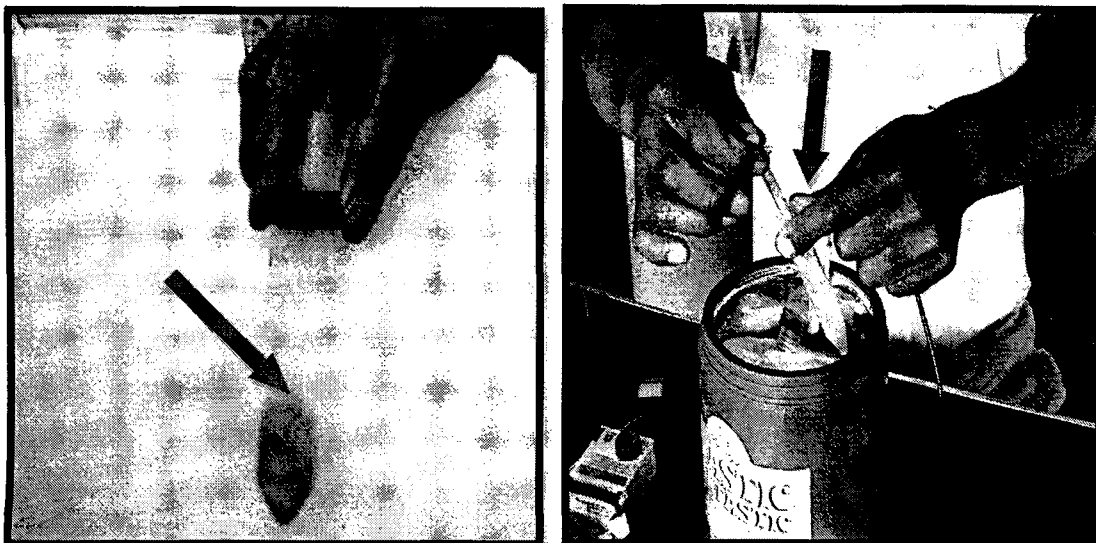


Foto 11a y 11b, dilutor Preparado, 11b, plena dilución del semen con el dilutor, mantenida en baño maría a 37°C.

2.3.5 Refrigeración y Evaluación del Semen Diluido

Después de realizado las diluciones se procedió a refrigerar; para la disminución de la temperatura ambiental de 37°C, a la temperatura de refrigeración de 4.6 – 5.1 °C, ha sido de manera gradual con método tradicional que consistió en dejar la muestra del semen diluido a en la parte baja de la refrigeradora por un tiempo de 90 minutos, luego de este tiempo es ubicado la muestra de semen en la parte media de la refrigeradora este proceso tuvo una respuesta de descenso de temperatura a razón de -1°C/2 min. El proceso de la evaluación del semen refrigerado ha sido con intervalos de: primero a las 0 horas inmediata a la post dilución, segundo a las 6 horas una cosa que se detalla en esta evaluación es que la muestra de semen ya estaba en refrigerada, tercero a las 12 horas, cuarto a las 24 horas, quinto a las 36 horas, sexto a las 48 horas, séptimo a las 72 horas. Tal como se muestra en la parte de resultados y discusión.

La viabilidad espermática del semen diluido se evaluó considerando como única variable la motilidad individual, porque la lectura del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos solo eran al momento de ver la motilidad de un número de (n) espermatozoides de cada 5 campos visuales del microscopio llegando promediarlas, este proceso se desarrolló post dilución del semen.

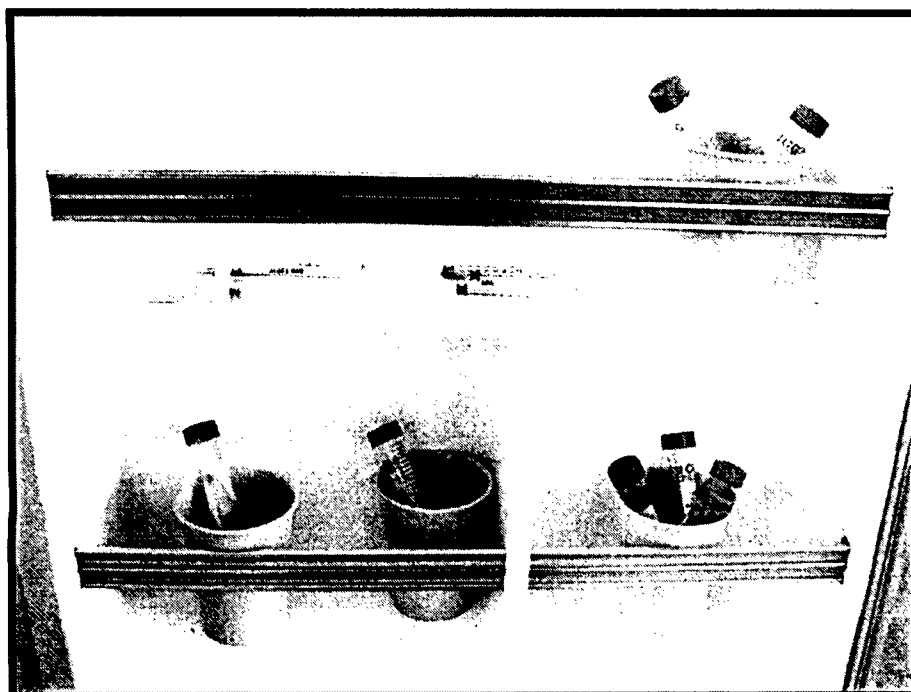


Foto 13: Semen de alpaca diluido, en pleno proceso refrigeración a una T° de 5 °C promedio.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos del semen fresco volumen, motilidad, concentración espermática, viscosidad, fueron analizados usando estadística descriptiva básica, lo cual permitió estimar el promedio y desviación estándar. Asimismo, se realizó análisis de correlación de Pearson y regresión simple entre las variables observadas, a fin de establecer el grado de asociación y dependencia entre las mismas.

Coefficiente de correlación:

$$r_{xy} = \frac{\frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{n}}{\sqrt{\frac{\sum x - (\frac{\sum x}{n}) \cdot \sum y - (\frac{\sum y}{n})}{n}}}$$

Coefficiente de regresión:

$$b_{xy} = \frac{\frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{n}}{\frac{\sum x - (\frac{\sum x}{n})}{n}}$$

La prueba de t-estudent fue usada para establecer la significancia estadística o no entre los promedios de motilidad obtenidos entre los diferentes tiempos de refrigeración con los 02 dilutores.

$$T = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2 - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{\hat{S}^2_c}{n_1} + \frac{\hat{S}^2_c}{n_2}}}$$

$$\hat{S}^2_c = \frac{(n_1 - 1)S^2_1 + (n_2 - 1)S^2_2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Donde:

X_1 = Promedio muestral del primer grupo comparativo (BSA +glucosa)

X_2 = Promedio muestral del segundo grupo comparativo (Tris+ glucosa)

S^2_c = Varianza muestral ponderada

S^2_1 = Varianza muestral del primer grupo comparativo (BSA +glucosa)

S^2_2 = Varianza muestral del segundo grupo comparativo (Tris+ glucosa)

n_1 = Tamaño de muestra del primer grupo comparativo (BSA +glucosa)

n_2 = Tamaño de muestra del segundo grupo comparativo (Tris+ glucosa)

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Características Seminales Macroscópicas

En el cuadro 3.1 se presenta los promedios y desviaciones estándar de las características seminales de las alpacas raza Huacaya colectados por el método de vagina artificial.

Cuadro N° 3.1. Características seminales de 08 alpacas Huacaya, todas en edades reproductivas de color balnco, obtenidas por vagina artificial en el CIP. Quimsachata, INIA-Puno. 2008.

Muestreo N°	T. Cópula Min	Vol. Semen ml.	Semen Color	Viscosidad (cm)	Semen Motilidad (%)	Concentración Esperm/mm ³ (x 10 ⁶).
1	34	2.0	B. opaco	6.0	50	76,000,000.0
2	12	2.0	B. opaco	4.0	50	4,500,000.0
3	26	1.0	B. opaco	4.0	60	98,000,000.0
4	16	1.5	B. opaco	0.8	60	210,000,000.0
5	27	2.0	Cristalino	0.2	70	188,000,000.0
6	31	2.5	Cristalino	0.1	50	160,000,000.0
7	26	2.0	cristalino	2.5	60	150,000,000.0
8	22	2.0	B. opaco	2.5	70	30,000,000.0
9	15	0.8	B. opaco	0.2	60	57,000,000.0
10	26	4.5	B. opaco	2.0	45	141,000,000.0
11	18	1.5	B. opaco	1.0	50	180,000,000.0
12	15	1.0	B. opaco	3.0	40	120,000,000.0
13	20	4.0	B. opaco	3.5	50	133,000,000.0
14	14	1.0	B. tenue	0.2	50	225,000,000.0
15	20	1.8	B. tenue	1.0	70	184,000,000.0
16	25	4.0	Cristalino	1.0	60	98,000,000.0
17	20	3.0	B. opaco	3.0	60	35,000,000.0
18	18	2.5	B. opaco	2.0	70	210,000,000.0
19	22	2.0	Blanco opaco	2.0	50	570,000,000.0
20	26	1.0	B. opaco	2.5	40	190,000,000.0

Cuadro N° 3.2. Promedio de Características Seminales de Alpacas Huacaya obtenidas por Vagina Artificial en el CIP. Quimsachata, INIA-Puno. 2008.

Parámetro	T. Cópula Min	Vol. Semen ml.	Viscosidad (cm)	Motilidad (%)	Concentración Esperm/mm ³ (x 10 ⁶)
Promedio	21.65	2.11	2.08	55.75	152.98
Desv. Estándar	5.91	1.06	1.57	9.63	117.84

Cuadro N° 3.3. Valores Máximos y Mínimos de las Características Seminales de 08 Alpacas Huacaya, de Colores Blanco obtenidas por Vagina Artificial en el CIP. Quimsachata del INIA-Puno.

Parámetro	T. Cópula Min.	Vol. Semen ml.	Viscosidad (cm)	Motilidad (%)	Concentración Esperm/mm ³ (x 10 ⁶)
Máximo	34	4,0	3,5	70,0	570,000.000
Mínimo	12	0,8	0,1	45,0	4,500.000

3.1.1 Tiempo de cópula

Se observa del cuadro 3.2. una media de tiempo de cópula de 21.65 ± 5.91 minutos, encontrándose este resultado dentro del rango de 15 a 30 minutos, considerado por Fernández Baca (1968); además de coincidir con los resultados obtenidos por Bravo y col. (1997) en la estación Experimental de la Raya (21.6 minutos). Sin embargo, este resultado suele ser mayor a lo registrado por Dávalos y Olazábal (2002), quienes encontraron resultados de tiempo de cópulas de 15.9 ± 0.6 minutos y 16.8 ± 0.7 minutos, usando la técnica del maniquís y hembras en estado de receptividad; respectivamente. Por otro lado, el tiempo de cópula encontrado en el presente estudio, suele ser también mayor comparativamente registrado por Von Baery col. (1998) en un grupo de llamas machos entrenados para la cópula con hembras receptivas, encontrando una media de 11.2 ± 6.0 minutos. De igual manera, Lichtenwalner y col. (1996), en un trabajo de colección con vagina artificial realizado en llamas, encontró un tiempo de cópula promedio de 31.7 ± 12 minutos, siendo mayor al encontrado en el presente estudio.

La variabilidad de los resultados obtenidos por los diversos autores citados, en relación al resultado obtenido en el presente estudio podría deberse según Pacheco (2008) además del tipo de colección, a la frecuencia y época de colección, así como a la edad de los machos.

Respecto al método de colección, al parecer según reportado por los diferentes autores, el método de vagina artificial y el uso de maniquí, resultaría en un mayor tiempo de monta en relación a la colección con hembras receptivas a cuyos machos se les hace el desvío del pene para su introducción en un prototipo de vagina artificial.

La época de colección según Bustinza, V. (2001) y Pacheco, J. (2008) también podría influir en algunas características seminales de las alpacas y demás camélidos (Franklin, W. 1983), debido a que está relacionada con la estacionalidad reproductiva. En ese sentido, los tiempos de colección podrían ser algo mayores cuando se realizan en épocas donde la actividad sexual de las alpacas se ve resentida por la baja disponibilidad de recursos forrajeros, lo cual influye en la libido de los machos, así como en la receptividad de las hembras. La edad al parecer no tiene influencia en el tiempo de colección y otras características (Fernández, R. y Col., 2003).

3.1.2. Volumen de Semen

Del cuadro 3.2. Se observa una media en el volumen de eyaculado de 2.11 ± 1.06 ml, encontrándose este resultado dentro del rango de 0.2 a 3.5 ml, considerado por Fernández, B. y col. (1966); pero que no se enmarca dentro del rango de 3.7 a 12.5 ml señalado por Sumar, J. y Leyva, C. (1989). En general el volumen promedio de semen encontrado en este trabajo es mayor al señalado por Bravo, P. y col. (1997) en la Raya (1.9 ml); así como a lo reportado por Dávalos, R. y Olazábal, J. (2002), quienes encontraron volúmenes de eyaculados de 1.03 ± 0.03 y $1.73 \text{ ml} \pm 0.09$ ml usando la técnica de vagina artificial con maniquí y hembras en estado de receptividad, respectivamente. Comparativamente con experiencias de colección en llamas, Von Baer y col. (1998) y Lichtenwalner y col. (1996), colectando llamas machos con vagina artificial, encontraron volúmenes promedio de eyaculado de 3.5 ± 1.7 y 3.0 ± 1.9 ml, siendo ambos resultados mayores a lo registrado en el presente estudio.

Cabe señalar que los amplios rangos de volúmenes de eyaculados reportados por los diversos autores, recaería en el método de colección utilizado principalmente (vagina artificial, desvíos de conductos deferentes, entre otros), puesto que existe una amplia literatura con reportes de volúmenes de eyaculados con amplios márgenes de rango en sus valores, que de manera general podemos mencionar rangos que van desde 0.1 ml hasta 12.5 ml, dependiendo del método de colección usado (Pacheco, J. 2008).

De manera similar la variabilidad de los resultados obtenidos por los diversos autores citados, en relación al obtenido en el presente estudio, podría deberse según Pacheco, J. (2008) además del tipo de colección, a la frecuencia y época de colección, entre otros aspectos.

Al igual que el tiempo de colección, la época de colección según Pacheco (2006) también podría influir en los volúmenes eyaculados. En ese sentido, los volúmenes de eyaculados podrían ser algo menores en épocas donde la actividad sexual de las alpacas se ve resentida por la baja disponibilidad de recursos forrajeros, lo cual influye en la libido de los machos, así como en la receptividad de las hembras. Asimismo, según Bravo, W. (2002), la edad puede tener un efecto muy sutil en la producción espermática, ya que las características mejoran ligeramente de acuerdo a la edad, pero dicha diferencia no es significativa ($p < 0.05$)

3.1.3. Viscosidad

El nivel de viscosidad promedio encontrado fue de 2.08 ± 1.57 . Este valor, determinado mecánicamente en una escala de 0 a 10 cm, indica el grado de fluidez del eyaculado, siguiendo la metodología reportada previamente (Fernández-Baca, 1964; Sumar, J. y Leyva, C. 1981; Quispe, F. y Olarte, P. 1988) puesto que en la literatura no se encuentra establecida una escala de medición para valorar esta característica, tal como suele ocurrir para otros tipos de fluidos no biológicos como son algunos líquidos y aceites de uso mecánico, para los cuales si se establecen escalas de medición. La razón a ello podría deberse a que la textura o fluidez del semen de la mayoría de especies domesticas no suelen mostrar diferencias resaltantes como para considerarlas dentro del patrón de análisis seminal; sin embargo, para el caso de los camélidos sudamericanos como la alpaca y llama, y tal vez otras especies no

domesticas, habría que ponerle especial interés a esta variable, pues como es sabido, el semen de camélidos sudamericanos presenta la característica de tener gran viscosidad, lo que limita su manipulación y dilución para su procesamiento. Al respecto, cabe mencionar del uso de enzimas proteolíticas para lisar el coágulo que en esencia suele estar compuesto por polipéptidos; sin embargo, estas enzimas suelen tener efectos negativos sobre la viabilidad de los espermatozoides. Respecto a ello, Pacheco, J. (2006) menciona experiencias en el uso de enzimas licuefactivas: fibrinolisisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina en la cantidad de 1 mg/ml de semen. Sus efectos se evaluó los efectos sobre la motilidad, vitalidad y la integridad del acrosoma, obteniéndose la destrucción del coagulo en un 100 y 99, 59 y 89, 88 y 36, 55 y 68 % para colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa y tripsina, respectivamente; teniendo además un efecto en la motilidad espermática en 4, 28, 12 y 13, respectivamente para las enzimas. El efecto sobre la vitalidad fue de 7, 10, 23 y 18 %, respectivamente, no teniendo sin embargo, diferencias significativas en el daño acrosómico (Ccallo, M. 1996).

3.1.4. Motilidad

Del cuadro 2.1 se observa una media en la motilidad espermática progresiva de 55.75 ± 9.63 %, siendo este resultado mayor a lo reportado por Dávalos, R. y Olazábal, J. (1998) cuando usó vagina artificial con maniquí para colectar semen ($34.2 \pm 5.3\%$); pero menor respecto al uso de vagina artificial con hembras receptoras ($68.9 \pm 4.9\%$). Asimismo, este resultado suele ser mayor, respecto a lo reportado en otras especies afines como el caso de la llama. Al respecto, Von Baer y col. (1998) y Lichtenwalner y col. (1996), encontraron motilidades progresivas promedio en semen nativo (sin diluir) 25.5 ± 18.7 % y $23.7 \pm 20.0\%$, respectivamente; siendo comparativamente menores al hallado en el presente estudio.

Las diferencias encontradas entre el nivel de motilidad hallada en el presente estudio, respecto a los reportados por los otros autores podrían deberse al método de colección utilizado (Pacheco, J. 2006); puesto que el mismo hace referencia a valores de motilidad que fluctúan entre 20.18 a 87.6%, de acuerdo al método de colección empleado. No cabe duda que la motilidad podría estar ligada a causas inherentes al propio individuo como ocurre en la mayoría de especies domesticas.

La experiencia y los criterios usados durante la valoración de esta variable, podría generar discrepancias de su medición, puesto que esta variable normalmente suele ser medida de manera visual.

Cabe mencionar que no existe la motilidad masal debido a la baja concentración relativa de espermatozoides y a la motilidad progresiva individual poca vigorosa (Sumar, J. 1981), debido a que el plasma seminal de la alpaca es altamente viscoso, por lo que el movimiento de los espermatozoides es lento, comparado al de otras especies convencionales. Por tanto, la motilidad progresiva de los espermatozoides de las alpacas y llamas suelen ser lenta, lineal y de tipo oscilatoria.

3.1.5. Concentración

La concentración promedio encontrada fue de 152.98×10^3 espermatozoides / $\text{mm}^3 \pm 117.84$, siendo superior al encontrado por Dávalos, R. y Olazabal, J. (1998), puesto que los mismos hallaron valores de concentración de $32.8 \times 10^3 / \text{mm}^3 \pm 4.3$ y de $57.5 \times 10^3 / \text{mm}^3 \pm 8.3$ haciendo uso de vagina artificial con maniquí, y hembras receptoras, respectivamente. Algunas experiencias realizadas en llamas, registran concentraciones de $84.7 \times 10^3 \pm 88.8$ espermatozoides/ mm^3 (Von Baer y col. 1998), $53.4 \times 10^3 / \text{mm}^3$ Gaulty, M. (1995), $10 \times 10^3 / \text{mm}^3$ (Lichtenwalner y col, 1996); siendo todos estos resultados inferiores a lo reportado en este estudio. Por otro lado, todos los valores de concentración espermática mencionados por los citados autores, suelen ser inferiores al promedio de $150 \times 10^3 / \text{mm}^3$ descrito por Bravo y col. (1997) en alpacas.

Al igual que las otras características estudiadas, la concentración espermática suele ser sensible al método y/o técnica de colección usada (Sumar, J. 1991; Pacheco, J. 2006). Al respecto, Mogrovejo, D. (1952), encuentra una concentración de 33.32×10^3 espermatozoides/ mm^3 al usar funda vaginal, Fernández, B. (1995) reporta un promedio de 48.16×10^3 espermatozoides/ mm^3 al usar electro eyaculación, mientras que Leyva, C. (1984) registra una concentración de 192×10^3 espermatozoides/ mm^3 al usar vagina artificial.

Cabe mencionar que además del método de colección usado, la técnica de medición de la concentración usando el hemocitómetro podría estar contribuyendo en el registro de diferentes resultados a la medición debido a la difícil tarea del llenado y distribución del

semen en la cámara. Es preciso también no descartar las causas inherentes al propio animal que haría que se registrase variación en la concentración espermática, sobre todo por los patrones nutricionales a las cuales estuvieron sometidos los animales evaluados.

El aspecto viscoso del semen, también descrito por Fernández-Baca y Calderón (1966), Sumar, J.(1991) y Bravo y col. (1997), no tiende a la licuefacción como en semen humano. Su carácter filante dificulta la confección de frotis, como también la succión y vaciado de las jeringuillas en la preparación de muestras para la determinación de concentración. Por tal motivo, los recuentos realizados en el presente estudio deben ser valorados con mesura.

3.2 Motilidad espermática a Diferentes Tiempos de Refrigeración y Según Tipo de Dilutor

En el cuadro 3,4 se presenta los niveles de motilidad espermática promedio sometidos a diferentes tiempos de conservación y según tipo de colección utilizado. De manera general, se observa que partiendo de un mismo tiempo y temperatura inicial, en promedio el nivel de motilidad espermática a partir de las 06 horas en adelante, suele ser mayor y de manera significativa ($p < 0.05$) con aquel dilutor elaborado a base de TRIS + yema de huevo, respecto al dilutor BSA + glucosa.

Cabe mencionar que la temperatura al inicio del ensayo fue de 4.1 °C para ambos grupos comparativos; y sin embargo, desde ya existió un diferencial de 2.25 % de la motilidad espermática a favor del dilutor TRIS + Yema de Huevo, pero que no tuvo significancia significativa ($p < 0.05$). El descenso de la temperatura fue gradual, en periodo de -1°C/2 min.

Cuadro 3.4. Promedios de motilidad espermática a diferentes tiempos de refrigeración y según tipo de Dilutor.

Tiempo (Horas)	Tipo de Dilutor	
	BSA + Glucosa	TRIS + Yema de Huevo
	Motilidad Prom. D.S	Motilidad Prom. D.S
0	55.00a ± 11.9	57.25a ± 12.9
6	43.00a ± 10.8	54.50b ± 11.1
12	28.50a ± 12.4	48.00b ± 10.4
24	14.25a ± 9.6	34.00b ± 10.7
36	5.80a ± 8.4	22.50b ± 6.4
48	1.55a ± 6.7	11.75b ± 9.4
72	0.25a ± 1.1	5.05b ± 5.3

Este primer resultado al inicio del experimento, estaría evidenciando a priori que el dilutor TRIS + yema de huevo tendría mejores condiciones fisico-químicas para proteger a los espermatozoides de las bajas temperaturas, además de proveer de mejores fuentes de nutrientes y efectos amortiguadores buffer para nutrir y estabilizar el medio de suspensión de las células espermáticas.

Por otro lado, se pudo observar que la diferencia inicial de 2.5 % en la motilidad espermática en el tiempo 0, al cabo de 06 horas se hace más pronunciada, puesto que a este tiempo con una media de 54.50 ± 11.1 y 43.00 ± 10.8 , se obtiene una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.06$) de 11.5 % de la motilidad espermática a favor del dilutor TRIS + Yema de huevo, lo cual confirmaría las bondades ventajosas de los componentes de dicho dilutor, respecto del dilutor BSA + Glucosa.

A las 12 horas de tiempo de conservación, la tendencia anterior se sigue manteniendo; es decir, el dilutor TRIS + yema de huevo mantiene una superioridad estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de la motilidad espermática en 19.5%, respecto al dilutor BSA + Glucosa. De igual manera, a un tiempo de conservación de 24 horas, se observa un mayor descenso de la motilidad espermática con el dilutor BSA + Glucosa, lo cual lo pone en desventaja respecto al dilutor TRIS + Yema de Huevo, que sigue manteniendo una superioridad fisico-química para mantener la motilidad espermática en 34.00 ± 10.7 %,

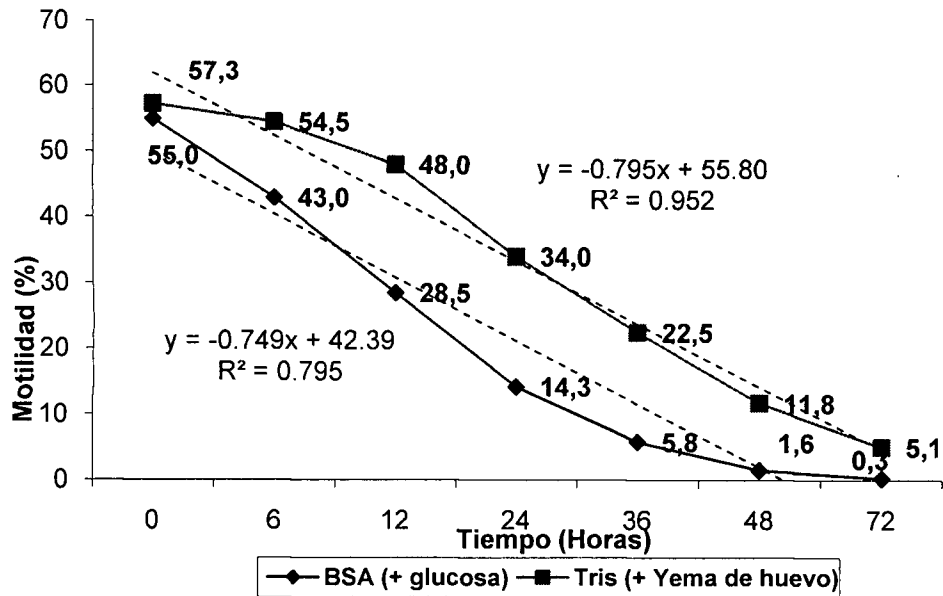
respecto al 14.25 ± 9.6 % por parte del dilutor BSA + Glucosa, resultando en un diferencial estadísticamente significativo de 21.75 % ($p < 0.05$).

Para un tiempo transcurrido de 36 horas, el nivel de motilidad espermática usando el dilutor BSA + Glucosa ha descendido dramáticamente a un nivel prácticamente inutilizable de uso de 5.80 ± 8.4 %, comparativamente a la motilidad espermática de 22.50 ± 6.4 %, registrada con el dilutor TRIS + yema de huevo, lo cual se traduce en un diferencial significativo de 16.7 % ($p < 0.05$), siendo favorable a este último.

Por otro lado, para un tiempo de conservación de 48 horas, prácticamente ya no se registró actividad espermática cuando se usó el dilutor BSA + Glucosa, puesto que la motilidad cayó dramáticamente a 1.55 ± 6.7 %. De manera similar, la motilidad espermática registrada con el dilutor TRIS + Yema de Huevo descendió a 11.75 ± 9.4 , siendo menor la diferencia de motilidad espermática encontrada entre ambos dilutores, respecto a lo registrado en anteriores tiempos de refrigeración; sin embargo, esta diferencia de 10.2 % es aun aritméticamente significativa ($p < 0.05$).

Finalmente, para un tiempo de refrigeración de 72 horas (03 días), la motilidad espermática registrada con el dilutor BSA + Glucosa prácticamente era nulo (0.25 ± 1.1 %); y la registrada con el dilutor TRIS + yema de huevo, no distaba mucho de ese valor (5.05 ± 5.3); sin embargo la diferencia establecida entre los mismos han sido 4.8 %, siendo aun diferencia aritmética significativo ($p < 0.05$). Para este punto de conservación, la motilidad espermáticamente registrada en ambos casos es inservible para efectos de ser usado en inseminación artificial y otros usos como es la fecundación in vitro.

En el gráfico 3.1. Se presenta la regresión establecida entre los tiempos de refrigeración (horas) y los niveles de motilidad espermática (%) establecida en cada reporte de tiempo. Se observa para el caso del dilutor TRIS + yema de huevo se ve un descenso de la motilidad a razón de 9.56 % por cada hora transcurrida durante la conservación. Comparativamente, el descenso en el nivel de motilidad espermática registrada con el dilutor BSA + Glucosa, se da a una tasa relativamente mayor de 9.64 % por cada hora transcurrida, lo cual se traduce en menores registros en los niveles de motilidad espermática conforme transcurre el tiempo, hasta hacerse prácticamente cero a las 48 y 72 horas con los dilutores BSA + Glucosa y TRIS + yema de huevo, respectivamente.



Gráfica 3.1. Porcentaje de motilidad espermática (horas) según tiempo de refrigeración y tipo de dilutor

Cabe reiterar la marcada superioridad del dilutor TRIS + Yema de Huevo para proveer de mejores condiciones fisicoquímicas y bioquímicas para mantener viable el material seminal por un mayor tiempo de conservación, que para efectos de utilidad práctica en trabajos de inseminación, resultaría beneficioso mantener y usar el material seminal diluido puesto a refrigeración dentro de las 12 horas, siempre y cuando se haga con el dilutor TRIS + yema de huevo, tal como lo señala Huanca, W. y Gauly, M. (2001) al manifestar que una motilidad de 43% resultaría aceptable para su uso en inseminación artificial, y como se sabe la motilidad encontrada a las 12 horas fue de 48%.

La situación ventajosa del dilutor TRIS + yema de huevo frente al dilutor BSA + Glucosa, se debe muy probablemente a las propiedades nutritivas y crio protectoras contenidos en la yema del huevo, como son la presencia de fosfolípidos, lipoproteínas, entre otros compuestos.

A pesar de los resultados favorables del dilutor TRIS + yema de huevo en mantener la motilidad espermática por más tiempo y en mejores niveles bajo temperatura de conservación de 4 a 5°C, respecto al dilutor BSA + Glucosa, no es lo suficientemente adecuado para prolongar su posible uso en inseminación artificial práctica como si ocurre con otras especies convencionales como es el caso del ovino o vacuno, cuya persistencia de la motilidad espermática tras un periodo de conservación a una temperatura 4 a 5°C es lo

suficientemente adecuado como para ser usado en inseminación artificial, incluso hasta cerca de 04 días de conservación (Hafez, E. 2002).

Lo anterior se explica en gran medida por la alta viscosidad del semen de las alpacas y llamas (Lichtenwalner, y col. 1996; Bravo, y col, 1997), lo cual constituye en un factor que dificulta el desarrollo de las técnicas de conservación, por ello los estudios sobre conservación de semen no son totalmente satisfactorios.

De alguna manera los resultados favorables del dilutor TRIS + yema de huevo encontrados en este estudio para mantener en mejores condiciones la motilidad espermática, han sido confirmadas por algunos trabajos de investigación realizados, tal como lo señala Pacheco, J. (2006), quien señala la superioridad del dilutor TRIS para mantener en un mejor nivel la motilidad de semen de alpaca, respecto a leche descremada, PBS, glucosa-citrato, yema-glucosa-citrato, triladyl. Similar conclusión hace Bravo, W. y col. (2002) al evaluar diversos dilutores para ser usados en la crio preservación de espermatozoides, encontrando también que el mejor dilutor para este fin es el TRIS (hidroximetil amino metano).

Esta misma tendencia de superioridad de la motilidad espermática al incorporar yema de huevo, reporta Bravo, W. y col. (2002), pues éste al usar la yema de huevo + citrato, obtuvo un 70% de espermatozoides vivos después de 24 horas de evaluación, respecto a la leche descremada al 68% y 60% obtenido usando leche descremada y glucosa-citrato, respectivamente. Asimismo, los resultados obtenidos en este estudio, también coinciden de alguna manera con los resultados que obtuvo Rivera, E. (1998), pues este usando yema de huevo en una proporción de 20% para la conservación, obtuvo a las 18 horas una sobrevivencia de 21.78 %, con un porcentaje inicial de 56.66%.

Otras experiencias han mostrado mejores resultados de motilidad a temperatura de conservación de 5°C, que al encontrado en este estudio, Fernandez, B. (1993), usando Yema de huevo a diferentes proporciones, encontró una motilidad individual del semen de alpaca conservado a 5°C de 72.3, 73.1 y 64.7 % con 10, 20 y 30% de yema de huevo; y en llamas una motilidad de 38, 42.5 y 47.6 % usando la misma proporción de yema de huevo.

Por otro lado, los resultados favorables del uso de yema de huevo unido al TRIS, reportado en el presente estudio, muestra discrepancias desfavorables con los resultados obtenidos por Ratto et al (1999), éste al realizar comparaciones de tres dilutores en la refrigeración de espermatozoides epididimales, utilizando los dilutores: tris +fructosa + ácido cítrico + yema (20 %), leche descremada + glucosa y leche descremada + sales, realizando la colección de espermatozoides post mortem desde el epidídimo, encontró una marcada superioridad del segundo dilutor para mantener la motilidad espermática a un mayor nivel a una temperatura de 5°C y manteniéndole así por 72 horas, pues solo la motilidad disminuyó cerca de 10%, el primer dilutor causó una gran caída de motilidad entre las 48 y 72 horas, mientras que el último dilutor causó una disminución de la motilidad en cerca de 50 %; por lo que recomienda el uso del dilutor Kenney (leche descremada+glucosa) para ser utilizado en la conservación de espermatozoides colectados del epidídimo.

En contraste, cabe mencionar que resultados similares al hallado en este estudio encontró Huanca, W. y Gaulty, M. (2001) en semen refrigerado en llamas al evaluar la acción de BSA + glucosa, desde una motilidad inicial de 57.6 %, descendió a 43.0 % a las 24 horas, refiriéndose que hasta este porcentaje es aceptable para realizar la inseminación artificial, por lo que se recomienda su uso, no siendo recomendable a partir de las 24 horas en adelante puesto que la motilidad va descendiendo progresivamente, hasta hacerse prácticamente nulo hacia las 72 horas de tiempo de conservación.

3.3 Relación entre Características Seminales Evaluadas

En el cuadro 3.5. Se presenta el grado de relación entre las características seminales evaluadas en el presente estudio. En general, se observa que no existe relación de correlación y regresión lineal estadísticamente significativo ($p < 0.05$) entre las variables evaluadas.

Cuadro 3.5. Relación de regresión y correlación entre las características seminales evaluadas

Variables intervinientes	Coefficiente de correlación (r_{xy})	Significancia	Coefficiente de regresión (b_{xy})	Significancia
Tiempo de cópula vs. Volumen	0.2851	0.2231ns	0.051	0.2231ns
Tiempo de cópula vs. Viscosidad	0.22537	0.3394ns	0.059	0.3394ns
Tiempo de cópula vs. Motilidad espermática	-0.00902	0.9699ns	-0.014	0.9699ns
Tiempo de cópula vs. Concentración espermática	0.02759	0.9081ns	0.550	0.9081ns
Volumen de eyaculado vs. Viscosidad	0.08373	0.7256ns	0.123	0.7256ns
Volumen de eyaculado vs. Motilidad espermática	0.02272	0.9243ns	0.205	0.9243ns
Volumen de eyaculado vs. Concentración espermática	-0.09233	0.6987ns	- 10.22	0.6987ns
Viscosidad vs. Motilidad espermática	-0.26014	0.268ns	-1.599	0.2680ns
Viscosidad vs. Concentración espermática	-0.29783	0.2022ns	- 22.39	0.2022ns
Motilidad vs. Concentración espermática	-0.1241	0.6022ns	- 0.010	0.6022ns

3.3.1 Tiempo de Colección vs. Volumen de eyaculado.

Se observa que no existe relación de correlación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el tiempo de cópula (min.) y el volumen de eyaculado (ml); en otras palabras con un valor de correlación de 0.2851, no podríamos afirmar contundentemente que un aumento en el tiempo de cópula acarrearía un incremento sustancial en el volumen de eyaculado.

Por otro lado, del Gráfico 3.2. podemos observar un coeficiente de regresión de 0.051 cuya linealidad resulta ser estadísticamente no significativo ($p < 0.05$); ello implica que la relación de dependencia lineal entre el volumen de eyaculado en función al tiempo de cópula, resulta ser inservible para efectos predictivos; es decir, resultaría inconsistente manifestar que un incremento en el tiempo de eyaculado de 01 hora, acarrearía un aumento del volumen de eyaculado en 0.051 ml.

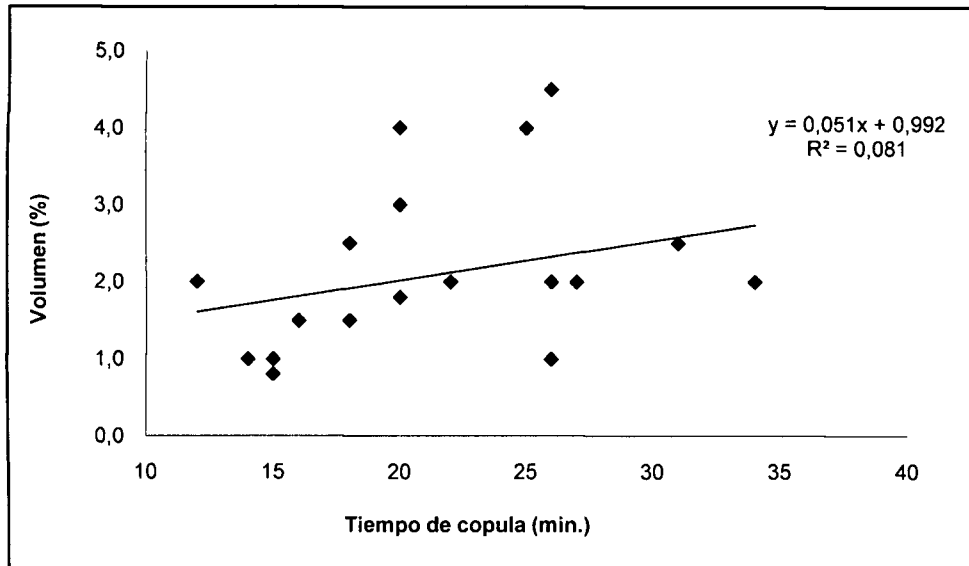


Gráfico 3.2. Relación de regresión lineal entre el volumen de eyaculado (ml) y el tiempo de cópula (min.)

Cabe mencionar que un R^2 de 0.081, estaría indicando un bajo poder del modelo de regresión estimada para explicar el comportamiento o variabilidad del volumen de eyaculado por efecto del tiempo de cópula; lo que quiere decir que existen otros factores explicativos o causas no conocidas, que estarían inmiscuidos en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que podría decirse de manera contundente que un aumento en el tiempo de cópula acarrearía un incremento en el volumen de semen.

3.3.2 Tiempo de Colección vs. Viscosidad

La magnitud de la relación de correlación lineal entre el tiempo de cópula (min.) y la viscosidad, es estadísticamente no significativa ($p < 0.05$); lo cual quiere decir que con un valor de correlación de 0.22537 no se puede afirmar contundentemente que un aumento en el tiempo de cópula acarrearía un incremento sustancial en el nivel de viscosidad.

Por otro lado, en el Gráfico 3.3 se puede observar un coeficiente de regresión de 0.059, cuya linealidad resulta ser estadísticamente no significativo ($p < 0.05$); ello implica que la relación de dependencia lineal entre la viscosidad del eyaculado en función del tiempo de cópula, resulta ser inservible para efectos predictivos; en otras palabras resulta ser inconsistente manifestar que un incremento en el tiempo de cópula de 1 hora, acarrearía un aumento en el nivel de viscosidad de 0.059 ml.

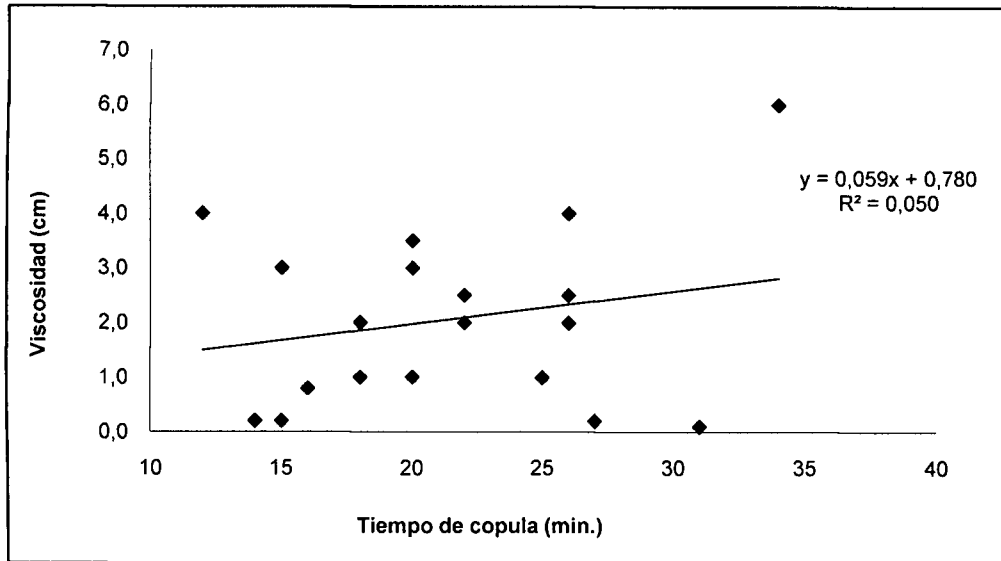


Grafico 3.3. Relación de regresión lineal entre el nivel de viscosidad y el tiempo de cópula (min.)

Cabe reiterar que un R^2 de 0.050, estaría indicando un bajo poder del modelo de regresión estimada para explicar el comportamiento o variabilidad del nivel de viscosidad por efecto del tiempo de eyaculado; lo que quiere decir que existe otros factores explicativos o causas no conocidos, que estarían inmiscuidos en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que no podríamos decir de manera contundente que un aumento en el tiempo de cópula acarrearía un incremento en el nivel de viscosidad.

3.3.3 Tiempo de Colección vs. Motilidad

Se puede observar que la magnitud de la relación de correlación entre el tiempo de cópula (min.) y la motilidad (%), es estadísticamente no significativa ($p < 0.05$); lo cual quiere decir que con un valor de correlación de -0.00902 se puede afirmar contundentemente que un aumento en el tiempo de cópula no acarrearía un incremento o decremento en el nivel de motilidad espermática.

Por otro lado, en el Grafico 3.4, se observa un coeficiente de regresión de -0.014, el cual resulta ser inservible para efectos de predecir una relación de dependencia entre el nivel de motilidad (%) y el tiempo de cópula (min.); en otras palabras, resulta inconsistente manifestar que un incremento en el tiempo de eyaculado de 1 hora, acarrearía un decremento en el nivel de motilidad espermática de -0.014l

Tener en cuenta que en R^2 de 0.00008, estaría indicando que el modelo de regresión estimada y usado para explicar el comportamiento o variabilidad del nivel de motilidad por efecto del tiempo de eyaculado es prácticamente inservible; lo que quiere decir que existe otros factores explicativos o causas no conocidos, que estarían inmiscuidos en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que podríamos decir contundentemente que un aumento en el tiempo de cópula no ocasionaría un incremento o decremento en el nivel de motilidad espermática (%).

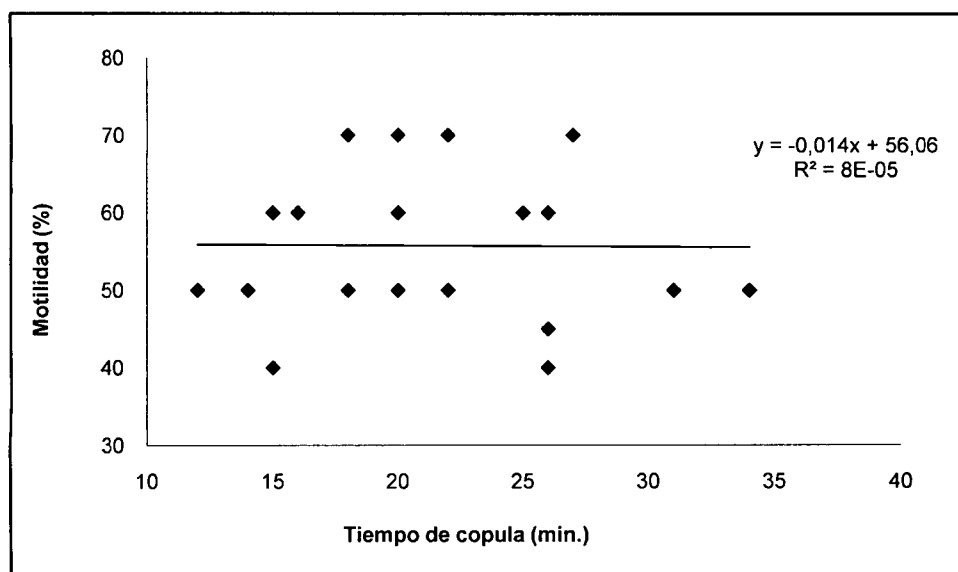


Gráfico 3.4. Relación de regresión lineal entre la motilidad espermática y el tiempo de cópula (min.)

3.3.4 Tiempo de Colección vs. Concentración.

La magnitud de la relación de correlación entre el tiempo de cópula (min.) y la concentración espermática ($\times 10^3/\text{mm}^3$), es estadísticamente no significativa ($p < 0.05$); lo cual quiere decir que con un valor de correlación de 0.02759 podríamos afirmar contundentemente que un aumento en el tiempo de cópula no acarrearía un incremento o decremento en la concentración espermática.

Por otro lado, en el Gráfico 3.5 se observa un coeficiente de regresión de 0.550×10^3 , el cual resulta ser inservible para efectos predictivos del comportamiento del nivel de concentración espermática en función del tiempo de cópula (min.); en otras palabras, resultaría inconsistente manifestar que un incremento en el tiempo de eyaculado de 01 hora,

acarrearía un incremento en el nivel de concentración espermática de 0.550×10^3 espermatozoides/ml.

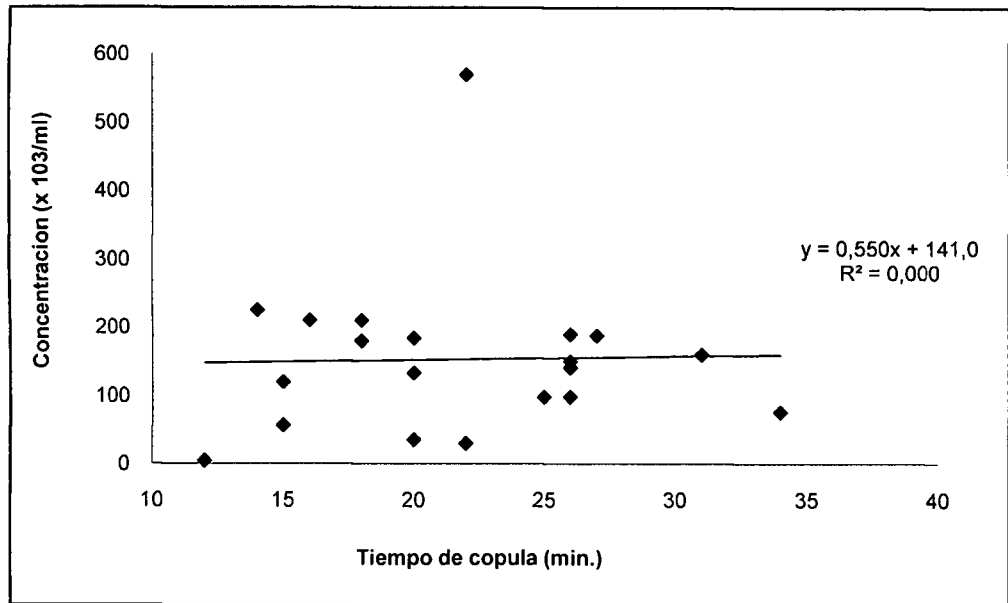


Grafico 3.5. Relación de regresión lineal entre la concentración espermática ($\times 10^3/\text{ml}$) y el tiempo de copula (min.)

Además, un R^2 de 0.0008, estaría indicando que el modelo de regresión estimada y usado para explicar el comportamiento o variabilidad de la concentración espermática por efecto del tiempo de eyaculado es prácticamente inservible; lo que quiere decir que existen otros factores explicativos o causas no conocidos, que estarían inmiscuidos en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que podríamos decir contundentemente que un aumento en el tiempo de cópula no ocasionaría un incremento o decremento en la concentración espermática.

3.3.5 Volumen vs. Viscosidad

Se observa que la magnitud de la relación de correlación entre el volumen de eyaculado (ml) y la viscosidad, es estadísticamente no significativa ($p < 0.05$); ello implica que con un valor de correlación de 0.08373 podemos afirmar contundentemente que un aumento en el volumen de eyaculado no acarrearía ningún incremento en la viscosidad espermática.

Por otro lado, en el Grafico 4.6, se observa un coeficiente de regresión de 0.123, lo cual resulta ser inservible para efectos de predecir el comportamiento de la viscosidad del eyaculado en función del volumen del mismo (ml); es decir, resultaría inconsistente afirmar

que un incremento de 01 ml en el volumen de eyaculado, acarrearía un incremento en el nivel de viscosidad en 0.123.

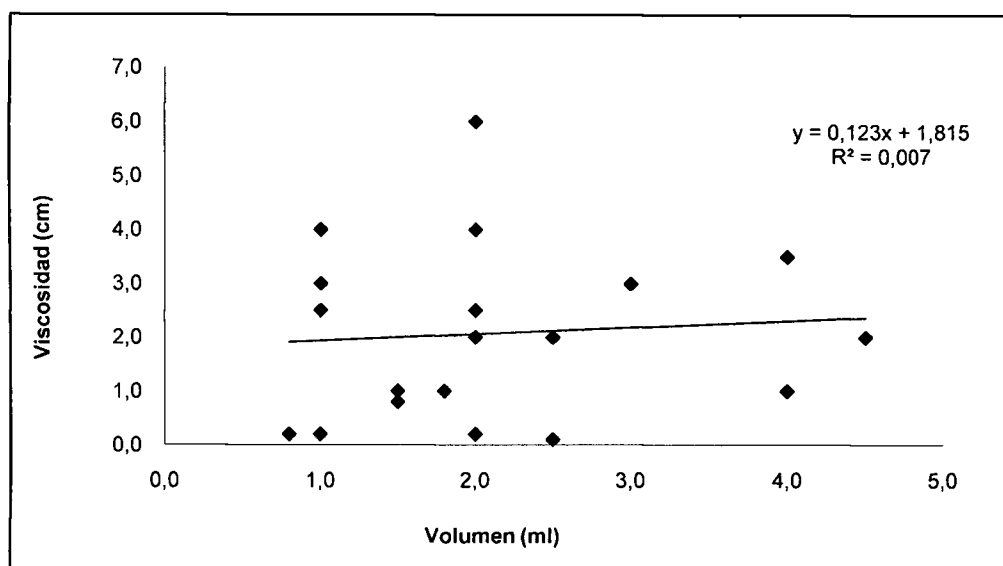


Gráfico 3.6. Relación de regresión lineal entre la viscosidad espermática y el volumen de semen (ml.)

Por otro lado, con un R^2 de 0.007, se afirma que el modelo de regresión estimada y usado para intentar explicar el comportamiento o variabilidad de la viscosidad espermática por efecto del volumen es prácticamente inservible; lo que quiere decir que existen otros factores explicativos o causas no conocidos, que estarían inmiscuidos en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que podríamos decir contundentemente que un aumento en el volumen de semen no ocasionaría ningún incremento en la viscosidad espermática.

3.3.6 Volumen vs. Motilidad

La magnitud de la relación de correlación entre el volumen de eyaculado (ml) y la motilidad, es estadísticamente no significativa ($p < 0.05$); ello implica que con un valor de correlación de 0.02272 podríamos afirmar contundentemente que un aumento en el volumen de eyaculado no acarrearía ningún incremento en el nivel de motilidad espermática.

Por otro lado, en el Gráfico 3.7, se observa un coeficiente de regresión de -10.22, que en términos prácticos resulta ser inservible para predecir el comportamiento de la motilidad

espermática (%) en función del volumen del mismo (ml); es decir, resulta impráctico manifestar que un incremento de 01 ml en el volumen de eyaculado, acarrearía un decremento en el nivel de motilidad espermática en -10.22%, tal como lo indica el coeficiente de regresión estimada.

Asimismo, con un R^2 de 0.008, se afirma que el modelo de regresión usado para intentar explicar el comportamiento o variabilidad de la motilidad espermática por efecto de un cambio en el volumen del eyaculado es prácticamente inservible; lo que quiere decir que existen otros factores explicativos o causas no conocidas, que están inmiscuidas en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que se puede decir contundentemente que un aumento en el volumen de semen no ocasionaría ningún incremento o decremento en la motilidad espermática.

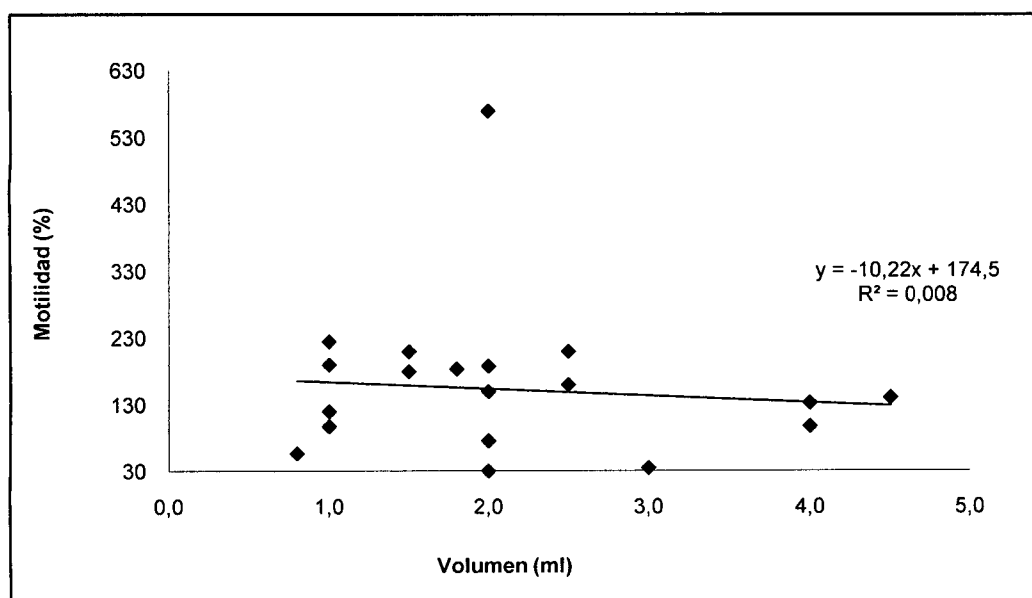


Gráfico 4.7. Relación de regresión lineal entre la motilidad espermática (%) y el volumen de semen (ml.)

4.3.7 Volumen vs. Concentración

La magnitud de la relación de correlación entre el volumen de eyaculado (ml) y la concentración espermática ($\times 10^3/\text{ml}$), es estadísticamente no significativa ($p < 0.05$); ello implica que con un valor de correlación de -0.09233 se afirma contundentemente que un aumento en el volumen de eyaculado no acarrearía una disminución significativa en el nivel de la concentración espermática.

Por otro lado, en el Grafico 3.8, se observa un coeficiente de regresión de 0.205×10^3 , lo cual en términos prácticos resulta ser inservible para efectos de predecir el comportamiento de la concentración espermática ($\times 10^3/\text{ml}$) en función del volumen (ml); es decir, no sería pertinente manifestar que un incremento de 01 ml en el volumen de eyaculado, ocasionaría un aumento en la concentración espermática de 0.205×10^3 , tal como lo indicaría el coeficiente de regresión estimada.

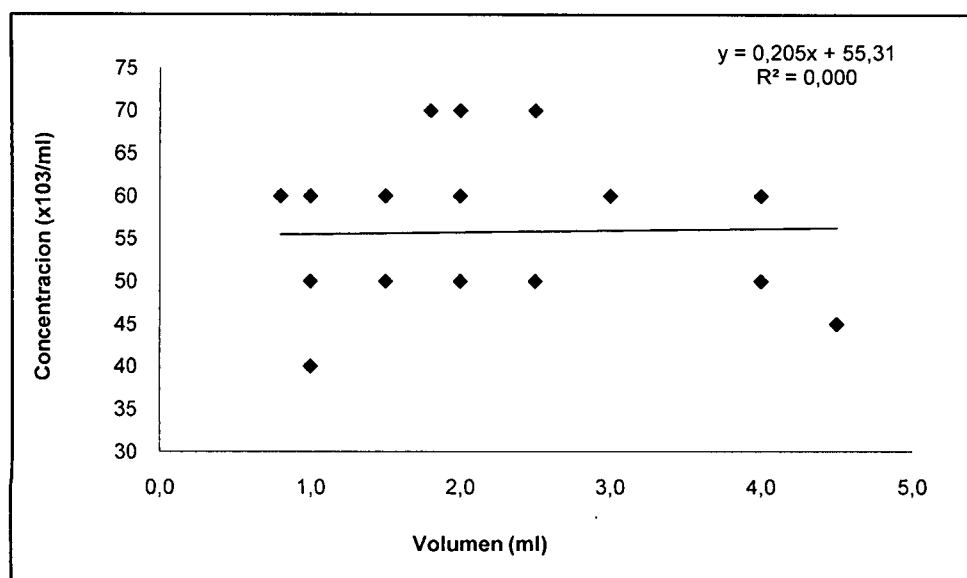


Grafico 3.8. Relación de regresión lineal entre la concentración espermática ($\times 10^3/\text{ml}$) y el volumen de semen (ml.)

Asimismo, con un R^2 de 0.0005, se afirma que el modelo de regresión estimado para intentar explicar el comportamiento o variabilidad de la concentración espermática por efecto de un cambio en el volumen del eyaculado, resulta ser prácticamente inservible; lo que quiere decir que existen otros factores explicativos o causas no conocidos, que están inmiscuidos en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que se afirma contundentemente que un aumento en el volumen del eyaculado no ocasiona un incremento significativo de la concentración espermática.

3.3.8 Viscosidad vs. Motilidad

La magnitud de la relación de correlación entre la motilidad espermática (%) y su viscosidad, es estadísticamente no significativa ($p < 0.05$); ello implica que con un valor de -

0.26014 no se puede afirmar de manera contundente que un aumento de la viscosidad del eyaculado acarrearía una disminución significativa en el nivel de motilidad espermática.

Por otro lado, en el Grafico 3.9, se observa un coeficiente de regresión de -1.599, resultando ser inservible para efectos de predecir el comportamiento de la motilidad espermática (%) en función de su viscosidad; en otras palabras, resulta ser inconsistente manifestar que un incremento de 01 unidad en la viscosidad del semen, acarrearía una disminución en el nivel de motilidad espermática de -1.599%, tal como aparentemente indicaría el coeficiente de regresión estimada.

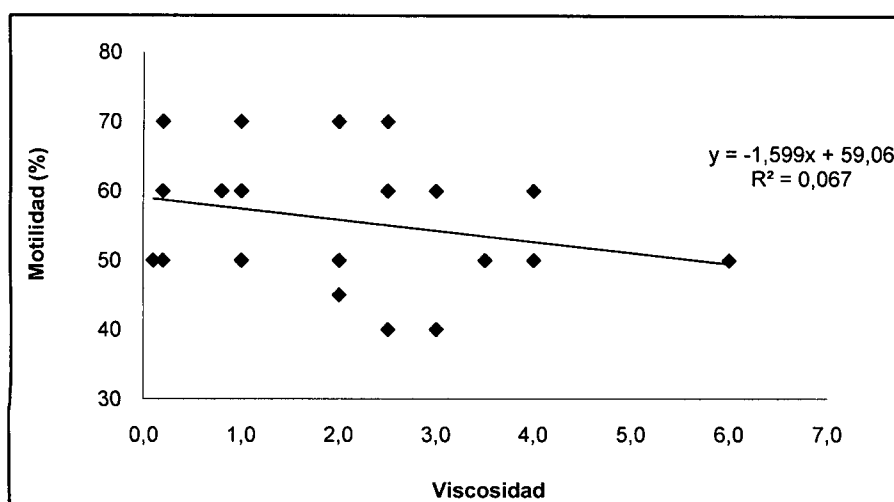


Grafico 3.9. Relación de regresión lineal entre la motilidad espermática (%) y el volumen de semen (ml.)

Cabe mencionar que con un R^2 de 0.067, ese afirma que el modelo de regresión usado para intentar explicar el comportamiento o variabilidad de la motilidad espermática por efecto de un cambio en el nivel de viscosidad de alguna manera resulta impráctico, lo que quiere decir que existen otros factores explicativos o causas no conocidos, que estarían inmiscuidos en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que podríamos decir que un aumento en el nivel de viscosidad del semen no ocasionaría una disminución significativo de la motilidad.

3.3.9 Viscosidad vs. Concentración

La magnitud de la relación de correlación entre la concentración espermática ($\times 10^3/\text{ml}$) y su viscosidad, es estadísticamente no significativa ($p < 0.05$); ello implica que con un valor de correlación de -0.29783 no podríamos afirmar de manera categórica que un aumento de la viscosidad del eyaculado acarrearía una disminución significativa en el nivel de concentración espermática.

Por otro lado, en el Grafico 3.10, se observa un coeficiente de regresión de -22.39×10^3 que resulta ser inservible para efectos de predecir el comportamiento de la concentración en función de su viscosidad; es decir, es inconsistente manifestar que un incremento de 01 unidad en la viscosidad del semen, acarrearía una disminución de la concentración espermática de -22.39×10^3 espermatozoides/ml, tal como aparentemente indicaría el coeficiente de regresión estimada.

Así mismo, con un R^2 de 0.088, se puede afirmar que el modelo de regresión usado para intentar explicar el comportamiento o variabilidad de la concentración espermática por efecto de un cambio en el nivel de viscosidad de alguna manera resultaría impráctico, lo que quiere decir que existen otros factores explicativos o causas no conocidos, que estarían inmiscuidos en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que podríamos decir que un aumento en el nivel de viscosidad del semen no ocasionaría un disminución significativo de la concentración.

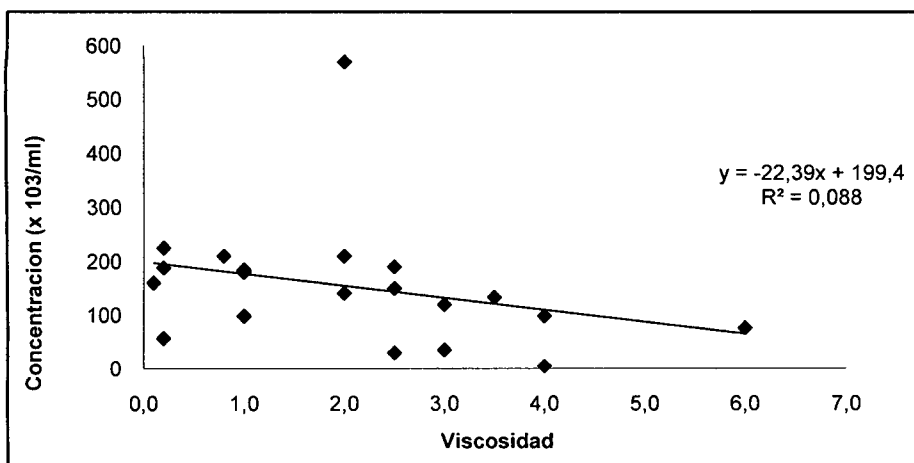


Grafico 3.10. Relación de regresión lineal entre la concentración espermática ($\times 10^3$ /ml) y su viscosidad

3.3.10 Motilidad vs. Concentración

La magnitud de la relación de correlación entre la motilidad espermática (%) y la concentración ($\times 10^3$ /ml), es estadísticamente no significativa ($p < 0.05$); ello implica que con un valor de correlación de -0.1241 no podríamos afirmar de manera categórica que un aumento en el nivel de concentración espermática acarrearía una disminución significativa en el nivel demotilidad.

Por otro lado, en el Grafico 3.11, se observa un coeficiente de regresión de -0.010 que resulta ser inservible para efectos de predecir el comportamiento de la motilidad espermática en función de su concentración; por lo que no resultaría prudente manifestar que el incremento de 01 unidad en la concentración espermática ($\times 10^3$ espermatozoides/ml), acarrearía una disminución de la motilidad de -0.010 %, tal como lo indica el coeficiente de regresión estimada.

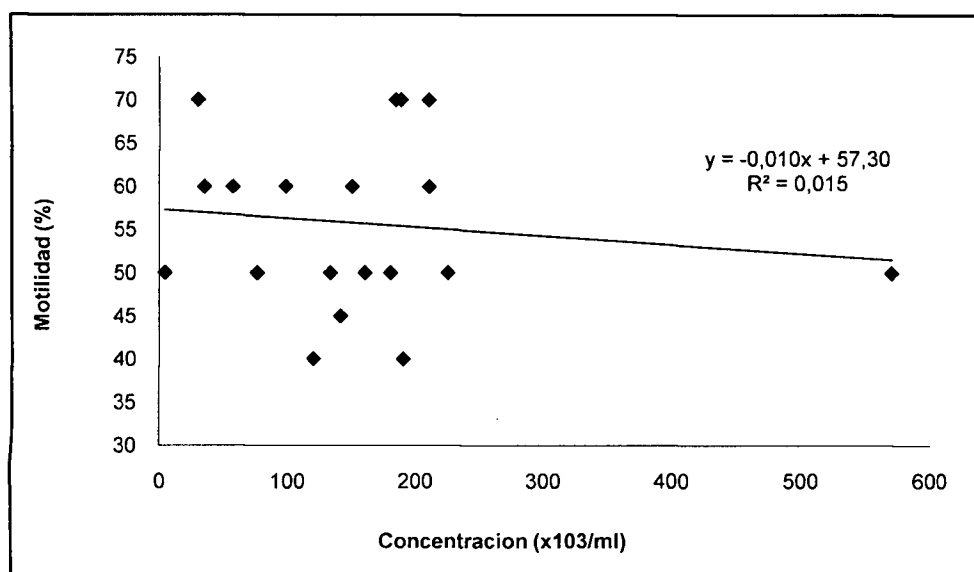


Grafico 3.11. Relación de regresión lineal entre la motilidad y la concentración espermática ($\times 10^3$ /ml)

Asimismo, con un R^2 de 0.015, se puede afirmar que el modelo de regresión usado para intentar explicar el comportamiento o variabilidad de la concentración espermática por efecto de un cambio en el nivel de motilidad de alguna manera resultaría impráctico, lo que quiere decir que existen otros factores explicativos o causas no conocidos, que estarían inmiscuidos en este comportamiento sin ningún patrón definido, por lo que se puede afirmar que un aumento en el nivel de motilidad del eyaculado no ocasionaría una disminución significativa de su concentración.

Los resultados de correlación y regresión no significativa entre las características seminales evaluadas en el presente estudio implicarían que estas se comportan de manera independiente una de otras, y por lo tanto, no tendría ninguna utilidad la manipulación de ciertas variables fáciles de medir, para efectos de predecir otras que muestren cierto grado de dificultad en su medición o que puedan ser cruciales como indicador dentro de los trabajos de inseminación artificial con semen fresco o refrigerado.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

4.1 CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en este trabajo se concluye lo siguiente:

1. La motilidad espermática resultó ser mejor y mayor, por efecto del dilutor Hidroximetil Amino Metano (TRIS + yema de huevo) en comparación con el Suero de Albúmina Bovina (BSA + glucosa), en términos de la motilidad y en los distintos tiempos de refrigerado.
2. En caso del semen fresco de alpaca, el tiempo de eyaculado (min) y el volumen de semen (ml), promedio obtenido de alpacas de raza Huacaya, de edades apropiadas entre 03 a 5 años, mediante la técnica de colección de la vagina artificial y el maniquí, arrojó valores dentro de los rangos normales reportados por otros investigadores que se señalan en la literatura. Mientras tanto la motilidad espermática (%) y la concentración espermática en semen diluido (%), promedio obtenido, resultó ser superiores a lo normalmente reportado en las literaturas.
3. El máximo tiempo de conservación para lograr un nivel de motilidad espermática permisible para su uso práctico en inseminación artificial, corresponde hacia las 12 horas de iniciado la conservación con el dilutor TRIS + yema de huevo, y hacia las 06 horas con el dilutor BSA + glucosa.
4. La características seminales de tiempo de eyaculado, volumen, motilidad, viscosidad y concentración espermática no se encontró las correlaciones unas con otras, ni muestran relación de dependencia lineal de manera significativa.

4.2. RECOMENDACIONES.

1. Para casos de estudios en semen refrigerado de alpaca, se recomienda utilizar el dilutor Hidroximetil amino metano (TRIS) + Yema de Huevo, por su efecto positivo en la supervivencia espermática.
2. Se recomienda para posteriores trabajos de investigación o de aplicación, mejorar la eficiencia del dilutor TRIS + yema de huevo respecto a la performance de la motilidad espermática y otras características seminales, mediante la realización de pruebas adicionales para establecer el nivel de uso apropiado de la yema de huevo; así, recomendar su uso masivo en estudios y aplicaciones de inseminación artificial en las alpacas.
3. A fin de recomendar algunas iniciativas de uso preliminar del material seminal de alpacas colectadas con vagina artificial en trabajos de inseminación artificial, se sugiere evitar sobrepasar un tiempo de conservación mayor a las 12 horas.
4. Evaluar el potencial de fertilidad del semen de alpacas diluido con el dilutor TRIS + yema de huevo mediante iniciativas de trabajos de investigación que evalúen el nivel de fertilidad obtenido mediante inseminación artificial con semen refrigerado.

RESUMEN

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto de dos dilutores sobre la motilidad espermática en semen refrigerado de 08 alpacas machos de la raza Huacaya de color Blanco, bajo condiciones de buena salud con edades apropiadas entre 03 a 5 años. Para tal efecto el presente trabajo de investigación se desarrolló en la Estación Experimental de Quimsachata perteneciente al INIA. – PUNO, distrito de Santa Lucia, Provincia de Melgar, Departamento de Puno. En cuyo efecto el proceso de la colección del semen de las 08 alpacas fue a través del método de la vagina artificial insertado dentro de un maniquí figurado como alpaca hembra en posición receptiva. Las muestras de semen colectadas, fueron posteriormente caracterizadas teniendo en cuenta las variables de volumen de eyaculado, color, viscosidad, motilidad y concentración espermática en semen fresco, teniendo para ello en cuenta las técnicas de laboratorio usualmente empleadas para especies convencionales. Después de caracterizado las muestras de semen, posteriormente se procedió a la respectiva refrigeración por un tiempo de 72 horas, usando para ello 02 dilutores elaborados a base de Suero de Albúmina Bovina (BSA + glucosa) e Hidroximetil amino metano (TRIS + yema de huevo) a, tiempo en el cual se procedió a registrar la motilidad espermática a las: 06, 12, 24, 36, 48 y 72 horas de transcurrido el periodo de puesta en refrigeración. Los datos obtenidos en semen fresco fueron caracterizados utilizando estadística descriptiva básica basada en medidas de tendencia central y dispersión, utilizándose técnicas de análisis bivalente basado en correlación de Pearson y regresión lineal para establecer la relación entre las características estudiadas. La información procedente del proceso de refrigeración del semen, usando los 02 dilutores fue analizada mediante prueba t- de student, usando en todos los casos analizados el programa SAS ver 8.0. El tiempo de cópula y el volumen de

semen arrojaron medias de 21.65 min. \pm 5.91 y 2.11 ml. \pm 1.06, respectivamente, encontrándose estos valores dentro del rango normal citado por la literatura. A su vez, la motilidad y concentración espermática reportaron medias de 55.75% \pm 9.63 y 152.98 x 10³/ml \pm 117.84, respectivamente, encontrándose estos valores por debajo y muy por encima de las referencias citadas por la literatura. No se encontraron referencias respecto a valores de viscosidad, siendo determinado subjetivamente en el presente estudio. Las características seminales no estuvieron relacionadas linealmente unas de otras ($P < 0.05$), no encontrándose relación de dependencia lineal al análisis de regresión efectuada ($P < 0.05$). Por otro lado, el dilutor TRIS + Yema de huevo fue superior respecto al dilutor SBA + glucosa para mantener la motilidad espermática en mejores niveles, bajo condiciones de refrigeración de 4.5 a 5,6 °C; correspondiendo a las 12 horas de refrigeración, el tiempo máximo permisible para mantener el material seminal en condiciones practicas de ser usado en trabajos de inseminación.

BIBLIOGRAFÍA.

1. **ALANOCCA, H. 1978.** Descripción de algunos aspectos macro-microscópicos del aparato reproductor masculino de la alpaca. Tesis. Fac. Med. Vet. Y Zoot. Univ. Nac. Del Altiplano. Puno- Perú. 75 pp.
2. **ALARCÓN, V. 1984.** Ensayo de aplicación de la inseminación artificial con semen congelado en borregas mantenidas en sistema extensivo en praderas alto andinas. Tesis. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima.
3. **BEARDEN, M. 1982.** Reproducción animal aplicada. 1era Ed. Editorial Manual Moderno. México. Pp 185.
4. **BRAVO, P; FLORES, J; y GARNICA, C. 1997.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas, *Theriogenology* 47: 619-626.
5. **BRAVO, W. 2002.** The reproductive process of South American camelidos. Printed by Seagull Printing, Salt Lake City. USA.
6. **BRAVO, W; FLORES, U; GARNICA, J; y ORDOÑEZ, C. 1989.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626.
7. **BUSTINZA, C. 2001.** La Alpaca, primera edición, Tomo I, Editorial Universitaria. Puno Perú.
8. **CALDERON, W; SUMAR, J; y FRANCO, E. 1968.** Avances en la inseminación Artificial de la Alpaca (Lama paco). Vol. 2. Lima – Perú, Facultad de Medicina Veterinaria –Universidad Nacional Mayor de San Marcos. pp 19 -25.

9. **CARPIO, M; ORDOÑEZ, C; ALARCÓN, V. 1989.** Presencia de espermatozoides, niveles de testosterona y tamaño testicular en alpacas. Fac. Agron. Y Zootecnia Universidad San Antonio Abad del Cusco. Perú. 76 p.
10. **CHIPANA, 1997.** Colección de semen y evaluación de dilutores sobre la viabilidad espermática de alpacas. Tesis. Fac. Zoot. Universidad Agraria La Molina. Lima. 78 pp.
11. **COLE, H; y CUPPS, P.1984.** Reproducción de los animales domésticos. 3era Ed. Editorial Acribia, España.
12. **CORTEZ, S; MONTERO, N; y VÁSQUEZ, I. 1995.** Jornadas sobre producción animal. P 422-424. España.
13. **DÁVALOS, R; y OLAZABAL, J. 1989.** Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Rev. Inv. Vet. Perú. 13 (2): 98-99.
14. **DERIVAUX, J. 1982.** Reproducción de los animales domésticos. 5ta Ed. Edt. Acribia. España.
15. **FERNANDEZ BACA, S.1993.** Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. Anim. Reprod. Sci. 33:307-323.
16. **FERNÁNDEZ, B; y CALDERÓN, W. 1966.** Método de colección de semen de alpaca. Rev. Fac. Med. Vet. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vol. 18-20: 13-26.
17. **FERNÁNDEZ, B; y NOVOA, C. 1968.** Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña. Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM. Vol. 22: 9-18.
18. **FERRE, L; y WERKMESITER, A. 1996.** Desarrollo de una vagina artificial TERMO ELECTRICA PARA LA COLECCIÓN DE SEMEN. Rev. Agr. Prod. Anim. 16(4): 363-365.

19. **FLORES, C. 1999.** Uso de la colagenasa y tripsina a diferentes concentraciones en congelación de semen de alpaca en la estación experimental ILLPA-Puno. Resis Universidad Católica de Santa Maria. Fac. de Ciencias e Ingenierías Biológicas y Química. Arequipa. Perú. 113 pp.
20. **FRANKLIN, W. 1983.** Contrasting socioecologies of south america's wild camelids. The vicuña and the guanaco. In: Eisenberg, J. F. Keinman. D G. (Eds): Advances in the study of mammalian behaviour. Special publication of the American Society of Mammalogist. 7: 573-629.
21. **GALINDO, W. 1995.** Efecto de eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen de alpacas. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
22. **GARNICA, J; y ACHATA, R. 1989.** Constituyentes químicos del plasma seminal de la alpaca. Rev. XII Reunión Asociación Peruana de Producción Animal. APPA. Lima. 66 pp.
23. **GAULY, M; y LEINDIGER, J. 1996.** Spermagewinnung und Spermaqualität von Lamas. En: Lamas, HaltungundZucht von Neuweltkameliden 3: 26-28.
24. **GIULANO, S; DIRECTOR, A; GAMBAROTTA, M; y MIRAGAYA, M. 2007.** Características seminales de la especie lama glama: efectos del método de extracción, del macho utilizado y de la estación del año. Memorias del II Simposium internacional de investigaciones sobre camélidos sudamericanos. Arequipa Perú.
25. **HAFEZ, E.S.E. 2002.** Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma edición. McGraw-Hill Interamericana Ediciones. México. Pp. 457-451.
26. **HERRERA, E. 1986.** Evaluación de dilutores para la conservación de semen en ovinos. Tesis Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional del Altiplano, Puno.
27. **HOLY, L. 1983.** Bases biológicas de la reproducción. 17 pp.
28. **HUANCA, W; y GAULY, M. 1998.** Conservación de semen refrigerado de llamas. Rev. Inv. Vet. Perú Suppl 1: 460-461.

29. **HUANCA, W; y GAULY, M. 2001.** Conservación de semen refrigerado de llamas. Rev. Inv. Vet. Perú. N° 1: 460-464.
30. **ILLARA, M. 1994.** Reproducción de los animales domésticos. 1era. Edición. Edt. Aedos. España. 390 pp.
31. **JAEN, J. 1999.** Biometría y consistencia testicular de la alpaca. Univ. Nac. Altiplano. Puno. 59 pp.
32. **LEYVA, C. 1981.** Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca. Memoria sobre V convención internacional sobre camélidos. Punta arenas Chile.
33. **LICHTENWALNER, A; WOODS, J. 1996.** Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas, *Theriogenology*46: 293-305.
34. **LUBOS, H. 1983.** Bases biológicas de la reproducción bovina. 1era Ed. Editorial Diana. México.
35. **McEVOY, T; SLATER, D; ADAM, C; y BOURKE, D. 1992.** Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. Journal of Reproduction and Fertility. Abstract pp 948.
36. **MOGROVEJO, D. 1952.** Estudios del semen de la alpaca. Tesis, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú, 21 pp.
37. **OBANDO, A; AVILA, E; OLIVERA, L; y CIPRIAN, C. 1992.** Variaciones en la forma del epidídimo de la alpaca. Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Fac. Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional del Altiplano. Puno.
38. **OSORIO, E; y SAN MARTIN, M. 1966.** Aspectos histológicos del epidídimo, conducto deferente y glándulas sexuales accesorias del aparato reproductor masculino de la alpaca. Arch.Rev. de Biología andina. Nro. 03. Pp 128-140.
39. **PACHECO, J. 1996.** Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma del espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca. 1996. Tesis MVZ

Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú. 52 pp.

40. **PACHECO, J. 2008.** Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 2008 Volumen IX Número 5. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>.
41. **PALOMINO, H. 1962.** Espermograma y dimensiones de los espermatozoides de la alpaca. Tesis Bach. FMV- UNMSM. - Lima Perú.
42. **PALOMINO, L. 2000.** Conservación del semen caprino con los dilutores citrato. yema y leche descremada-Yema. Tesis Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Fac. Med. Vet. Perú 37 pp.
43. **PÉREZ, F. 1985.** Reproducción animal. Edit. Científico Médica. España.
44. **PÉREZ, G. 1996.** Avances en la congelación de semen de alpacas y tasa de gestación. Res. I Cong. Mundial sobre camélidos. Cajamarca-Perú. 6-10 Octubre. 29 pp.
45. **PÉREZ, G. 2006.** Avances en la congelación de semen de alpaca durante la época de empadre. Tesis Fac. Med. Vet. Y Zoot. Universidad Nacional del Altiplano. 70 pp.
46. **QUISPE, F. y OLARTE, P. 1988.** Evaluación de las características físicas del semen de la alpaca durante la época del empadre. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
47. **QUISPE, F. y OLARTE, U. 1998.** Comparativo sexual y colección de semen de la alpaca en el periodo de un año. VI Conv. Int. de Especialistas en Camélidos. Bolivia.
48. **RAYMUNDO, F. HUANCA, W; HUANCA, T; y CORDERO, R. 2006.** Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. Rev. Inv. Vet Perú 17 (2): 125-130.
49. **RIVERA, E. 1998.** Uso de la yema de huevo y la glicerina en la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca. Tesis FMVZ-UNA. Puno. Perú.

- 50. SALISBURY, G; DERMARK, V. y LOADGHE, J. 1982.** Fisiología de la reproducción e inseminación de los bóvidos. Edt. Acribia. España. 463-580 pp.
- 51. SALOMON, S; y MAXWELL, W. 1985.** Frozen storage of ram semen. Processing, freezing, thawing. And fertility. After cervical insemination. Animal reproduction science. 37: 185-249.
- 52. SAN MARTIN, F. 1961.** Fisiología de la reproducción de la alpaca. An. Symp. Sobre problemas ganaderos. Lima Perú.
- 53. SCHMIDT, C. 1973.** Breeding season and notes on some other aspects of reproduction in camelid. Int. Zoo. Year. book. 13: 387-390.
- 54. SUMAR, J. 1991.** En: FAO, Oficina de la FAO para América Latina y el Caribe. Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos.
- 55. SUMAR, J. 1997.** Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. En: Avances en reproducción de rumiantes. I Simposio Internacional. APPA-Perú. p 45-56.
- 56. SUMAR, J; y LEYVA, C. 1981.** Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (lama pacos). Memorias del IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Punta Arenas. Chile.
- 57. VALDIVIA, M; RUIZ, M; BERMÚDEZ, L; QUINTEROS, S; GONZALES, A; OLAZÁBAL, J; y DÁVALOS, R. 1999.** Crio preservación de semen de alpacas. Resumen. II congreso Mundial sobre camélidos, Cusco, Perú 81 abstract.
- 58. VON BAER, L; y HELLEMANN, C.1998.** Variables seminales en llama (Lama glama) *. Arch. med. vet., Valdivia, v. 30, n. 2, 1998.

ANEXO.

Anexo 1. Análisis de varianza de la regresión tiempo de copula (min.) y volumen (ml)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.285102659
Coeficiente de determinación	
R ²	0.081283526
R ² ajustado	0.030243722
Error típico	1.04777892
Observaciones	20

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1.74836801	1.74836801	1.5925517	0.2231
Residuos	18	19.76113199	1.097840666		
Total	19	21.5095			

Anexo 2. Análisis de varianza de la regresión tiempo de copula (min.) y viscosidad

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.225371613
Coeficiente de determinación	
R ²	0.050792364
R ² ajustado	-0.001941393
Error típico	1.568574287
Observaciones	20

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	2.369844729	2.369844729	0.963185	0.3394
Residuos	18	44.28765527	2.460425293		
Total	19	46.6575			

Anexo 3. Análisis de varianza de la regresión tiempo de copula (min.) y motilidad espermática (%)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.00901938
Coeficiente de determinación	
R ²	8.1349E-05
R ² ajustado	-0.0554697
Error típico	9.89839078
Observaciones	20

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.143479737	0.143479737	0.0014644	0.9699
Residuos	18	1763.60652	97.97814001		
Total	19	1763.75			

Anexo 4. Análisis de varianza de la regresión tiempo de copula (min.) y concentración (x10³/ml)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.027593056
Coeficiente de determinación	
R ²	0.000761377
R ² ajustado	-0.05475188
Error típico	121024641.9
Observaciones	20

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	2.00886E+14	2.00886E+14	0.0137152	0.9081
Residuos	18	2.63645E+17	1.4647E+16		
Total	19	2.63846E+17			

Anexo 5. Análisis de varianza de la regresión volumen (ml.) y viscosidad

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.08372969
Coeficiente de determinación	
R ²	0.00701066
R ² ajustado	-0.0481554
Error típico	1.60434133
Observaciones	20

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.327099944	0.327099944	0.12708284	0.7256
Residuos	18	46.33040006	2.573911114		
Total	19	46.6575			

Anexo 6. Análisis de varianza de la regresión volumen (ml.) y motilidad espermática (%)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.022718497
Coeficiente de determinación	
R ²	0.00051613
R ² ajustado	-0.055010752
Error típico	9.896238554
Observaciones	20

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	0.910324508	0.910324508	0.0092951	0.9243
Residuos	18	1762.839675	97.93553753		

Total 19 1763.75

Anexo 7. Análisis de varianza de la regresión volumen (ml.) y concentración espermática (x10³/ml)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.092326935
Coeficiente de determinación	
R ²	0.008524263
R ² ajustado	-0.04655772
Error típico	120553617.1
Observaciones	20

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	2.24909E+15	2.24909E+15	0.15475591	0.6987
Residuos	18	2.61597E+17	1.45332E+16		
Total	19	2.63846E+17			

Anexo 8. Análisis de varianza de la regresión viscosidad y motilidad espermática (%)

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.26013878
Coeficiente de determinación	
R ²	0.06767218
R ² ajustado	0.01587619
Error típico	9.55799021
Observaciones	20

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	119.3568156	119.3568156	1.30651398	0.2680
Residuos	18	1644.393184	91.35517691		
Total	19	1763.75			

**Anexo 9. Análisis de varianza de la regresión viscosidad y concentración espermática
(x10³/ml)**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.29782731
Coeficiente de determinación	
R ²	0.08870111
R ² ajustado	0.03807339
Error típico	115576522
Observaciones	20

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	2.34035E+16	2.34035E+16	1.75202663	0.2022
Residuos	18	2.40443E+17	1.33579E+16		
Total	19	2.63846E+17			

**Anexo 10. Análisis de varianza de la regresión motilidad y concentración espermática
(x10³/ml)**

<i>Estadísticas de la regresión</i>	
Coeficiente de correlación	
múltiple	0.124100829
Coeficiente de determinación	
R ²	0.015401016
R ² ajustado	-0.039298928
Error típico	120134817.2
Observaciones	20

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	4.0635E+15	4.0635E+15	0.2815545	0.6022
Residuos	18	2.59783E+17	1.44324E+16		
Total	19	2.63846E+17			

Anexo 11. Matriz de correlaciones genéticas entre las características evaluadas

Pearson Correlation Coefficients, N = 20

Prob> |r| under H0: Rho=0

	TIEM	VOLU	VISC	MOTI
VOLU	0.2851 0.2231			
VISC	0.22537 0.3394	0.08373 0.7256		
MOTI	-0.00902 0.9699	0.02272 0.9243	-0.26014 0.268	
CONC	0.02759 0.9081	-0.09233 0.6987	-0.29783 0.2022	-0.1241 0.6022

Anexo 12. Planilla de características seminales evaluadas.

Muestreo N°	T. Cópula Min	Vol. Semen ml.	Semen color	Viscosidad (cm)	Semen Motilidad (%)	Concentración Esperm/mm ³ . (x 10 ⁶).
1	34	2.0	B. opaco	6.0	50	76,000,000.0
2	12	2.0	B. opaco	4.0	50	4,500,000.0
3	26	1.0	B. opaco	4.0	60	98,000,000.0
4	16	1.5	B. opaco	0.8	60	210,000,000.0
5	27	2.0	Cristalino	0.2	70	188,000,000.0
6	31	2.5	Cristalino	0.1	50	160,000,000.0
7	26	2.0	cristalino	2.5	60	150,000,000.0
8	22	2.0	B. opaco	2.5	70	30,000,000.0
9	15	0.8	B. opaco	0.2	60	57,000,000.0
10	26	4.5	B. opaco	2.0	45	141,000,000.0
11	18	1.5	B. opaco	1.0	50	180,000,000.0
12	15	1.0	B. opaco	3.0	40	120,000,000.0
13	20	4.0	B. opaco	3.5	50	133,000,000.0
14	14	1.0	B. tenue	0.2	50	225,000,000.0
15	20	1.8	B. tenue	1.0	70	184,000,000.0
16	25	4.0	Cristalino	1.0	60	98,000,000.0
17	20	3.0	B. opaco	3.0	60	35,000,000.0
18	18	2.5	B. opaco	2.0	70	210,000,000.0
19	22	2.0	Blanco opaco	2.0	50	570,000,000.0
20	26	1.0	B. opaco	2.5	40	190,000,000.0