

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**



**Evaluación de tres tratamientos de semen sobre la filancia,  
motilidad y vitalidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*)  
a 2736 m.s.n.m. - Ayacucho 2017**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
MÉDICO VETERINARIO**

**PRESENTADO POR:  
Andrés Avelino Ramírez Rojas**

**Ayacucho - Perú**

**2019**

*Al divino por la vida, por darme todas las posibles oportunidades en mí vivir en este planeta maravilloso y darme las fuerzas para seguir en el camino de aprendizaje.*

*A mi madre Delfina por ser un impulso, sacrificio y dedicación que hizo por mí.  
A Sabino quien es padre, amigo y compañero de la vida.*

*A mis hermanos por su paciencia, amistad, ayuda, comprensión y dedicaciones.  
A mi familia por ser parte de este logro.*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por albergarme y brindarme conocimiento en mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, a mi linda Escuela Profesional de Medicina Veterinaria que estuvo en cómplice en mi formación académica y personal.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), de Estación Experimental Agraria Canaán - Ayacucho, por ceder los materiales necesarios para realizar el trabajo de investigación, además por alcanzar el don de seguir en la investigación en los camélidos sudamericanos.

Al Mg. Sc. César A. Olaguivel Flores, asesor de este trabajo de investigación, por su gran apoyo, sugerencias y consejos.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores, al M.V. Mijaíl Contreras Huamán, al M.V. Edwin Mendoza Alacute por sus apoyos incondicionales como coasesores de este trabajo de investigación, por sus consejos, sugerencias, amistad y comprensión.

A mi amigo Walter Palomino por su apoyo incondicional en el tiempo de aprendizaje y logro, a Ronal, Christell por sus apoyos durante la ejecución de este trabajo.

A todos aquellos que de una u otra manera fueron cómplices para concluir mi carrera a través de sus apoyos y consejos.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de tablas .....	viii
Índice de figuras.....	ix
Índice de anexos.....	x
<b>RESUMEN .....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>15</b>
1.1. Antecedentes .....	15
1.2. La alpaca .....	17
1.3. Estacionalidad reproductiva de la especie .....	17
1.4. Anatomía del tracto reproductivo de alpacas .....	18
1.4.1. El prepucio .....	18
1.4.2. El pene.....	18
1.4.3. El testículo.....	19
1.4.4. El epidídimo.....	20
1.4.5. Conducto deferente .....	22
1.4.6. Glándulas accesorias .....	22
1.5. Fisiología reproductiva del macho .....	23
1.5.1. Pubertad .....	23
1.5.2. Comportamiento sexual, cópula y eyaculación.....	24
1.5.3. Esteroidogénesis.....	26
1.5.4. Espermatogénesis.....	26
1.5.5. Control hormonal de la espermatogénesis .....	28
1.5.6. Espermatozoides .....	29
1.5.7. Morfología del espermatozoide .....	29
1.5.8. Metabolismo del espermatozoide.....	31
1.6. Características del semen de alpaca .....	32
1.6.1. Mecanismo del eyaculado .....	32
1.7. Características macroscópicas del semen de alpacas .....	33

1.7.1. Espuma.....	33
1.7.2. Filancia.....	33
1.7.3. pH.....	34
1.7.4. Volumen.....	34
1.8. Características microscópicas del semen de alpacas.....	34
1.8.1. Concentración .....	35
1.8.2. Motilidad.....	35
1.8.3. Vitalidad.....	36
1.9. Características bioquímicas del semen .....	36
1.9.1. Plasma seminal.....	37
1.9.2. Enzimas del plasma seminal .....	39
1.10. Colección de semen en alpacas .....	39
1.10.1. Aspiración vaginal postcoital.....	40
1.10.2. Bulbouretrotomía .....	40
1.10.3. Desviación de los conductos deferentes.....	41
1.10.4. Electroeyaculación .....	41
1.10.5. Esponjas vaginales .....	42
1.10.6. Fístula uretral .....	42
1.10.7. Fundas vaginales .....	42
1.10.8. Vagina artificial.....	43
1.11. Factores que implican en la colección de semen .....	44
1.11.1. Frecuencia de colección .....	44
1.11.2. Duración de la copula .....	44
1.11.3. Época del año .....	45
1.11.4. Edad del macho.....	45
1.12. Dilutores.....	45
1.12.1. Dilutor a base de leche .....	46
1.12.2. Dilutor a base de TES .....	47
1.12.3. Tris + yema de huevo.....	47
1.13. Uso de enzimas proteolíticas.....	48
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>51</b>
2.1. Ubicación .....	51
2.2. Duración.....	51

2.3.	Muestra.....	51
2.4.	Materiales y equipos .....	51
2.4.1.	Materiales de campo .....	51
2.4.2.	Materiales de laboratorio .....	52
2.4.3.	Equipos y aparatos .....	52
2.4.4.	Insumos .....	53
2.4.5.	Material biológico .....	53
2.4.6.	Otros.....	53
2.5.	Problemas específicos .....	53
2.6.	Metodología .....	53
2.6.1.	Preparación de vagina artificial.....	53
2.6.2.	Preparación de los diluyentes.....	54
2.6.3.	Colección del semen .....	55
2.6.4.	Análisis de semen en el laboratorio .....	55
2.6.5.	Análisis macroscópico y microscópico de semen fresco .....	56
2.6.6.	Dilución de semen.....	57
2.6.7.	Análisis post dilución de semen.....	57
2.6.8.	Evaluación macroscópica de semen diluido .....	58
2.6.9.	Evaluación microscópica de semen diluido .....	58
2.7.	Diseño estadístico .....	58
<b>CAPÍTULO III</b>		
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>60</b>
3.1.	Evaluación de la temperatura de vagina artificial durante la colecta de semen..	60
3.2.	Evaluación del tiempo de copula .....	61
3.3.	Evaluación del volumen de semen.....	61
3.4.	Evaluación del volumen de espuma de semen.....	62
3.5.	Evaluación del pH.....	63
3.6.	Evaluación de la filancia seminal.....	64
3.7.	Evaluación de motilidad espermática .....	65
3.8.	Evaluación de vitalidad espermática.....	65
3.9.	Evaluación de concentración espermática .....	66
3.10.	Evaluación de filancia seminal post dilución.....	67
3.11.	Evaluación de motilidad espermática post dilución.....	70
3.12.	Evaluación de vitalidad espermática post dilución.....	72

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1.1. Composición bioquímica del semen de alpacas.....	37
Tabla 3.1. Temperatura en la vagina artificial durante la colecta de semen (minutos).....	60
Tabla 3.2. Tiempo de copula (minutos).....	61
Tabla 3.3. Volumen en semen fresco (ml).....	61
Tabla 3.4. Volumen de espuma en semen fresco (ml).....	62
Tabla 3.5. pH en semen fresco.....	63
Tabla 3.6. Filancia seminal en semen fresco (cm).....	64
Tabla 3.7. Motilidad espermática en semen fresco (%).....	65
Tabla 3.8. Vitalidad espermática en semen fresco (%).....	65
Tabla 3.9. Concentración espermática en semen fresco (Mill/ml).....	66
Tabla 3.10. Filancia post dilución de semen según tratamientos en cada etapa del tiempo (cm).....	67
Tabla 3.11. Motilidad espermática post dilución de semen según tratamientos en cada etapa del tiempo (%).....	70
Tabla 3.12. Vitalidad espermática post dilución de semen según tratamientos en cada etapa del tiempo (%).....	72



## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1.1. Espermiogénesis en mamífero.....	28

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo 1. Resultados de la investigación.....	91
Anexo 2. Datos estadísticos.....	98
Anexo 3. Panel fotográfico.....	104

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Reproducción Asistida de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA, ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray de la provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho entre los meses abril a junio del 2017 en los finales de época reproductiva. Se trabajó con 07 alpacas machos entre 4 a 7 años de edad entrenados para la colección mediante vagina artificial y se trabajó con 28 eyaculados. Cada muestra de semen fresco fué evaluada macroscópica y microscópica. El tiempo de copula fue 19.32 minutos; la temperatura inicial y final, 41.86°C y 38.75°C de forma respectiva durante la colecta; (macroscópicamente) volumen, espuma, pH y la filancia de semen en promedio fueron 1.68ml, 1.13ml, 7.14 pH y 1.82cm correspondientemente; (microscópicamente) motilidad, vitalidad y concentración espermática fueron 52.50%, 70.64% y 81.13mill/ml en promedio; luego las muestras fueron distribuidas en tres alícuotas y disuelto en proporción 1:1 con dilutor comercial AndroMed® para cada tratamiento: (T1) colagenasa al 5%, 0.25ul/5ml de dilutor; (T2) pipeteo 10 veces y (T3) incubación por 10 min en 37°C en gradilla térmica. Cada tratamiento se evaluó macroscópica y microscópicamente por etapas con intervalo de 20 minutos: en disuelto; (Eii) en 20 minutos; (Eiii) en 40 minutos; (Eiv) en 1 hora y (Ev) en 2 horas. El resultado para la filancia en (Ei) fue 0.95cm, 0.89cm, 0.91cm en promedio y dentro de 2 horas disminuyó a un promedio de 0.26cm, 0.27cm, 0.33cm para colagenasa; pipeteo; incubación de forma respectiva y no habiendo diferencia estadística ( $p>0.05$ ) entre tratamientos en todas las etapas. En relación a la motilidad espermática en (Eiii) tuvo 36.43%, 36.25%, 32.68% para colagenasa, pipeteo, incubación respectivamente; donde T2 difiere ( $p<0.05$ ) a T1 y T3; a 2 horas de evaluación fue 31.25%, 31.25%, 33.21% respectivamente, mientras entre tratamientos en otras etapas no existe diferencia estadística ( $p>0.05$ ). Finalmente, la vitalidad espermática, en (Ei) fue 72.61%, 71.96%, 72.21% en promedio, evaluado a las 2 horas se encontró 67.46%, 69.07%, 65.39% con un efecto mínimo por colagenasa, pipeteo, incubación correspondientemente y no existe una diferencia estadística ( $p>0.05$ ) entre tratamiento en cada etapa.

**Palabras claves:** Dilutor, espermatozoides, motilidad, filancia, vitalidad.

## INTRODUCCIÓN

El eyaculado de espermatozoides de los Camélidos Sudamericanos presentan solamente movimientos en el lugar (oscilatorio) y no progresivos (para adelante) (Giuliano y col., 2010) al igual que en los humanos, primates y roedores (Robert y Gagnon, 1999) por poseer característica de una naturaleza viscoso a diferencia con otros mamíferos machos. Por lo tanto para conseguir embriones mediante las técnicas de fertilización asistida FIV e ICSI es necesario que los espermatozoides tengan movilidad progresiva y también es necesario poder separar a los espermatozoides del plasma seminal y poder separar a los espermatozoides móviles de los inmóviles (Giuliano y Casareto, 2011); por ende se inició algunos estudio y técnicas para disminuir la viscosidad y filancia de plasma seminal del eyaculado en camélidos domésticos, la cual ha sido atribuida a la presencia de mucopolisacáridos en las secreciones de las glándulas bulbouretrales ya que en animales bulbourectomizados la viscosidad es baja, similar a la de la solución fisiológica (González y col., 2003).

Para mejorar la biotecnología reproductiva se ha utilizado diferentes métodos para reducir la viscosidad seminal entre las enzimas, tripsina y colagenasa en la cual observaron una disminución de la viscosidad también una disminución del porcentaje de movilidad espermática, en otra experiencia observaron que las enzimas colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa y tripsina son efectivas para disminuir la viscosidad del semen de alpaca y llama, pero no consiguieron la motilidad progresiva (Bravo y col., 1999, 2000), a la vez una solución de colagenasa en H TALP BSA disminuyó la filancia del plasma seminal, se incrementó la movilidad progresiva espermática y se conservó la integridad funcional de la membrana plasmática de los espermatozoides (Giuliano y Casareto, 2011). También hay uso de métodos mecánicos como la aspiración y expulsión del eyaculado a través de una aguja (Valdivia y col., 1999; Apaza y col., 2001, Bérnago y col., 2012), al igual usando pasajes por una aguja luego sometido a la centrifugación a 802 G por 10 minutos, en la cual se redujo la viscosidad sin alteraron

los parámetros seminales (Zirena, 2014), y la centrifugación con cierto éxito (Turín y col, 2013). Por este motivo el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto tres tratamientos de semen sobre la filancia, motilidad y vitalidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*) para seguir colaborando en mejorar algunas características del semen en esta especie.

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto de tres tratamientos (colagenasa 5%, pipeteo 10 veces e incubación 10 minutos) de semen sobre la filancia, motilidad y vitalidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*).

### **Objetivos específicos**

1. Evaluar el efecto de la colagenasa al 5% sobre la filancia seminal, motilidad y vitalidad espermática en alpacas en diferentes etapas del tiempo.
2. Evaluar el efecto del pipeteo sobre filancia seminal, motilidad y vitalidad espermático en alpacas en diferentes etapas del tiempo.
3. Evaluar el efecto de la incubación sobre filancia seminal, motilidad y vitalidad espermático en alpacas en diferentes etapas del tiempo.

## **CAPÍTULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **1.1. ANTECEDENTES**

Los experimentos en la disminución de filancia seminal (viscoso) en alpacas se está haciendo usando métodos enzimáticos y físicos con cierto éxito, hasta el momento aún no existe un protocolo para disminuir la filancia conservando los otros parámetros seminales tales como la motilidad, tampoco no se ha logrado aún la motilidad progresiva viable.

Entre los trabajos realizados con métodos enzimáticos son reportados utilizando colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa y tripsina en concentración 1mg/ml a la eyaculación, evaluadas en (tiempo de recogida de esperma) 0, 2, 5 minutos, en semen de llamas y de alpacas; donde la colagenasa eliminó la viscosidad en 100 y 99% de las muestras respectivamente; fibrinolisisina en 89 y 59%; hialuronidasa en 88 y 36%; y tripsina en 55 y 68% de las muestras. En semen de llama, la motilidad disminuyó con la adición de fibrinolisisina (28%), tripsina (13%), hialuronidasa (12%) y colagenasa (4%). En Semen de alpaca, las enzimas utilizadas no tuvieron ningún efecto sobre la motilidad del esperma (Bravo y col., 2000).

El mejoramiento de las características del semen en llama utilizando una solución de colagenasa al 0,1% en H TALP BSA por 4 y 8 minutos disminuyo la filancia en 100% pero no la viscosidad del semen y conservando 40% de motilidad (Giuliano y Casaretto, 2011).

Tratamiento con enzimas (colagenasa, papaína y tripsina) en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0mg/ml evaluadas desde 5, 10, 20 y 40 minutos, donde el efecto de colagenasa se ve de 10, 20, 40 minutos en  $2.1 \pm 0.7$ ;  $0.8 \pm 0.4$ ;  $0.3 \pm 0.2$  respectivamente para 4.0mg de concentración, la papaína fue más efectiva en todas las

concentraciones en la disminución de la viscosidad y todas las concentraciones de colagenasa reduce la motilidad de los espermatozoides mientras que todas las concentraciones de papaína reduce la integridad acrosomal de espermatozoides (Morton y col., 2012).

Efecto de dos dilutores y cinco concentraciones de extracto piña sobre del semen de llama a 75, 80 y 100 % de extracto de piña en dos dilutores, muestra un tiempo promedio de eliminación de la filancia del semen de llama de 50 segundos. La utilización de 75 y 80% de extracto de piña ayuda a que los espermatozoides logren una motilidad de superior a 84% y un porcentaje de espermatozoides vivos mayor al 90% superior a los otros tratamientos tanto en el dilutor Tris y Citrato respectivamente, Una exposición a 100% de extracto de piña reduce la motilidad a 79.79% y la vitalidad a 87,4%. Esto puede deberse a la excesiva cantidad de bromelina que se pone en contacto con los espermatozoides. Las concentraciones de 50, 75, 80, y 100% de jugo de piña son efectivas en liberar completamente a los espermatozoides de la viscosidad seminal de llama. Usando extracto de piña puro (100%) pareciera afectar negativamente a la motilidad y la cantidad de espermatozoides vivos (Delgado y Choque, 2015).

Realizados con métodos físicos, redujo la viscosidad sin alterar los parámetros seminales conservando una motilidad espermática, los resultados promedio para las muestras sometidas al tratamiento A (pasajes por aguja) fueron 46.11%  $\pm$  9 (desviación estándar: 20.76), mientras que el porcentaje de motilidad promedio para las muestras sometidas al tratamiento B (agitación manual) fue 48.83%. En relación al porcentaje de espermatozoides vivos, los resultados promedio fueron casi similares entre los tratamientos A y B (61.47% y 62.87% respectivamente) (Zirena, 2014).

El porcentaje de positivos al test de endosmosis (HOST) en muestras de semen de refrigeración fue más alto para tratamiento B (40.80%; desviación estándar: 10.63%) comparado a tratamiento A (36.20%; desviación estándar: 11.5%) (Zirena, 2014) al igual a (Bérgamo y col., 2012) con pasajes por aguja disminuyó la filancia significativamente.

## **1.2. LA ALPACA**

Es una especie doméstica artiodáctilo mamífero de la familia Camelidae, cuyo nombre científico es (*Vicugna pacos*). Genéticamente deriva mayormente de la vicuña salvaje y, en una proporción mucho menor de la llama (Wheeler y col., 2001). Pertenecen a una familia de mamíferos ungulados (Camelidae) emparentados con los camellos que habitan en África y Asia. Se distinguen por algunas características típicas (De Lamo, 2011) como:

- No tienen cuernos
- Presentan dientes caninos verdaderos, separados de los premolares por un espacio llamado diastema, tanto en el maxilar como en la mandíbula.
- Una estructura anatómica de la cadera que les permite flexionar las patas debajo del tronco.
- La presencia de una uña en cada falange (en lugar de pezuña) de cada pata y una almohadilla plantar en cada dedo, entre otras características (Wheeler, 1995). Al igual que los rumiantes, no tienen piezas dentarias (incisivos) en el maxilar superior, lugar que se encuentra recubierto por tejido conectivo (rodete dentario) (De Lamo, 2011).

Dentro de los camélidos sudamericanos (tribu Lamini), existen 4 especies, siendo dos de ellos silvestres, el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*), y dos formas doméstica, la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*). El análisis combinado de variaciones cromosómicas y moleculares demostraron una alta similitud genética entre alpacas y vicuñas, así como entre llamas y guanacos (Marín y col., 2007).

## **1.3. ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA DE LA ESPECIE**

Los Camélidos Sudamericanos, específicamente la alpaca es considerada como una especie de actividad reproductiva estacional en condiciones naturales donde vive, que tiene lugar entre los meses de enero a abril (Bustinza, 2001), siendo éstos meses más cálidos del año donde hay lluvias y abundan el forraje verde (Sumar, 1996). En el caso de los machos, son capaces de producir eyaculados fértiles todo el año, pero al igual que en otras especies domésticas, la calidad del semen, así como la lividez, se ven influenciados por la estación del año y disponibilidad de alimento (Montalvo y col., 1979).



Los factores responsables del inicio y término de la actividad reproductiva en condiciones naturales de crianza de alpacas aún no son bien conocidos (Sumar, 1997). Sin embargo, más allá de los factores nutricionales o de manejo, se cree que factores ambientales como la temperatura, humedad y luz, así como estímulos visuales u olfatorios tienen influencia en los centros del sistema nervioso central que controla el comportamiento reproductivo (Brown, 2000).

Se ha dado a conocer un grado importante de estacionalidad en la estructura microscópica del testículo de la alpaca por un grado de involución de los túbulos seminíferos que ocurre en la estación no reproductiva que es heterogénea y responde a un ordenamiento alternante muy marcado (Nuñez y col., 2007); también estudiaron el efecto de la estacionalidad en llamas en invierno y verano, llegando a la conclusión que la concentración espermática y las anormalidades son diferentes en una de otra, presentando menos concentración y más anormalidades en la estación de verano (Giuliano y col., 2008).

#### **1.4. ANATOMÍA DEL TRACTO REPRODUCTIVO DE ALPACAS**

En primer lugar se debe conocer muy bien la anatomía funcional del aparato reproductivo en los macho. El sistema reproductivo de alpaca macho presenta varias características anatómicas y fisiológicas distintivas de otras especies (Tibary y Vaughan, 2006).

##### **1.4.1. El prepucio**

El órgano prepucio tiene forma triangular, aplanado de lado a lado, es no pendular y se sitúa en la línea media de la región inguinal a 15 cm caudal al ombligo presentan músculos bien desarrollados (músculos prepuciales laterales y los músculos prepuciales craneal y caudal), que dirigen el prepucio hacia delante para la respectiva erección y hacia atrás para poder orinar (Sumar, 2002).

##### **1.4.2. El pene**

El pene es un órgano fibrosoelástico, que se extiende desde el arco isquiático hasta la región umbilical (Sato y Montoya, 1990) y está compuesta por: raíz, cuerpo, porción libre y las glándulas peneanas (Sumar, 2002). Forma una curva en forma de "S", esta curvatura o flexura sigmoidal es pre-escrotal y puede ser observada en el macho desde

la parte posterior, esta curvatura desaparece cuando se produce la erección del pene. El extremo terminal del pene posee un proceso peniano que se encarga de la dirección del pene a través de la cérvix en el momento de la copula (Bravo, 1995). Afirma que el pene tiene una longitud de 26 cm sin erección, y que también que el pene de la alpaca tiene una longitud de 35 a 40 cm en estado de erección (Pérez, 1997; Bustinza, 2001).

### **1.4.3. El testículo**

Los testículos son los órganos masculinos y están contenidos en una bolsa de piel especializada denominada escroto (Sisson, 1975), que le da protección y soporta a los testículos. La función principal del escroto es regular la temperatura interna de las gónadas mediante la contracción involuntaria del músculo dartos que recubre el escroto interna y basalmente (Salisbury y col., 1978); a la vez están recubiertos por dos capas serosas de la túnica vaginalis, y una capa de tejido conectivo denso e irregular, que constituye la túnica albugínea (Wrobel y Dellmann, 1993), de esta emergen trabéculas de tejido conectivo que convergen en el mediastino ubicado en el centro del parénquima testicular, y dividen al testículo en un número variable de lobulillos testiculares que contienen de 1 a 4 túbulos seminíferos contorneados. Los túbulos seminíferos se unen a la salida de cada lobulillo, y forman los túbulos rectos agrupados en el mediastino, que a su vez conforman la rete testis (Sisson, 1975), de rete testis sale una docena de túbulos llamados vasos eferentes que convergen en la porción dorsal del mediastino para luego llegar a la cabeza del epidídimo (Salisbury y col, 1978).

Cada testículo mide esta 4 y 5 cm de longitud y 2.5 a 3.0 cm de grosor y pesa 15-18 g, siendo el 0.02 – 0.03 % de su peso corporal (Sumar, 1983). Presentan una forma ovoide y están orientados dorso-ventral, con la cabeza del epidídimo en ventral y la cola del epidídimo en dorsal. A diferencia de carneros y toros, en los cuales la cola del epidídimo está ubicada en posición ventral (Bravo, 2002). En condiciones normales, los dos testículos son del mismo tamaño, firmes, con un movimiento libre dentro del escroto y lo que presenta una variación de tamaño relativa a la edad adulta (Tibary, 2006).

El testículo tiene tres compartimientos funcionales (Amann y Schanbacher, 1983):

- a. El compartimiento intersticial, contiene las células de Leydig (que rodean cada túbulo seminífero y lo bañan con un fluido rico en testosterona) y vasos sanguíneos y linfáticos,
- b. El compartimiento basal (separado del anterior por la lámina propia testicular), que incluye la base de las células de Sertoli (células de sostén), y las espermatogonias (células espermáticas precursoras, que se dividirán por mitosis).
- c. Y el compartimiento abdominal, que incluye la porción apical de las células de Sertoli, y los espermatocitos y espermátides. Aquí ocurre la espermiogénesis, diferenciación de las espermátides a espermatozoides) (Johnson y Everitt, 1980).

Las funciones principales del testículo son:

- Secreción de hormonas masculinas, como la testosterona y androstenediona a través del proceso de esteroidogénesis, en las células de Leydig.
- Producción de espermatozoides a través del proceso de espermatogénesis, en los túbulos seminíferos (Amann y Schanbacher, 1983; Chenoweth, 1997).

#### **1.4.4. El epidídimo**

El epidídimo es un túbulo elongado y tortuoso empaquetado en un saco de tejido conectivo que es una extensión de la túnica albugínea (Chenoweth, 1997). Está formado por cabeza, cuerpo y cola (Sumar, 2002). La cabeza es más larga que la cola (Bravo, 1995) y se encuentra craneoventralmente al testículo. El cuerpo se extiende en medial y dorso caudal a la cola, la cual se ubica dorsal al testículo (Fowler, 1998). La cabeza y el cuerpo son sitios para la maduración espermática, mientras que la cola está asociada al almacenamiento de los espermatozoides (Elwishy, 1988). La cola se encorva para dar origen al conducto deferente. El conducto deferente tiene una longitud promedio total de 40 cm (Smith y col., 1994) y es muy delgado en su inicio (1 mm) pero se engrosa (2 mm) cuando alcanza la cavidad abdominal (Sumar, 1983). Su recorrido va desde la cola del epidídimo a través del anillo inguinal hacia la uretra, caudalmente al cuello de la vejiga donde existe una pequeña ámpula (Bravo y col., 2002).

Las funciones es el transporte y la maduración de los espermatozoides (Chenoweth, 1997), los cuales, a través del pasaje por los conductos eferentes y el epidídimo, adquieren la habilidad de tener movimiento progresivo lineal y la capacidad de fertilizar (Johnson y Everitt, 1980). Durante este proceso, en la célula espermática ocurren

cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos (Johnson y col., 1980). También ocurre la reabsorción e intercambio de fluidos (Salisbury y col., 1978). Específicamente, en la cabeza del epidídimo ocurre la reabsorción de solutos y fluidos, en el cuerpo del epidídimo la maduración espermática, y en la cola del epidídimo el almacenamiento de los espermatozoides fértiles (Amann y Schanbacher, 1983).

En los conductos eferentes, cabeza y cuerpo del epidídimo el transporte es mediado por el epitelio del epidídimo, específicamente las células ciliadas principales, y contracciones peristálticas de la musculatura lisa de los conductos eferentes y la cabeza y cuerpo del epidídimo, más la presión hidrostática interna (Johnson y col., 1980). Los espermatozoides inmóviles que son transportados al lumen del túbulo seminífero, una vez separados de la célula de Sertoli, tienen una cantidad de citoplasma residual de las espermátides retenida por las células de Sertoli, y otra porción se queda unida al espermatozoide emergente y forma la "gota citoplasmática" (Chenoweth, 1997).

Los movimientos peristálticos en la cola del epidídimo son menos frecuentes y los conductos deferentes son inactivos, excepto cuando la musculatura es estimulada a contraerse, por lo que el tránsito en esta porción del epidídimo sí es afectado por la eyaculación. El número de espermatozoides en la cola del epidídimo es máximo cuando los animales no han eyaculado en 7 días, pero se reduce en al menos 25% en animales que eyaculan diariamente (Amann y Schanbacher, 1983).

La maduración espermática en el epidídimo es dependiente de las secreciones epiteliales, del transporte de sodio y potasio, de los andrógenos, y de la temperatura escrotal (Amann y Schanbacher, 1983). Los cambios estructurales de los espermatozoides se deben a la utilización de fosfolípidos y colesterol como sustratos durante la maduración en el epidídimo. En estos cambios se completa el proceso de condensación nuclear, los espermatozoides pierden la gota citoplasmática, aumenta la negatividad de la carga superficial, y ocurren ligeros cambios en la morfología del acrosoma (Johnson y Everitt, 1980).

Un solo epidídimo tiene capacidad para almacenar 4 ml de fluido rico en espermatozoides, con una concentración de  $3.55 \times 10^9$  espermatozoides/ml, que ocupa la mitad del volumen total (Salisbury y col., 1978). El fluido producido por las células

secretoras del epidídimo es rico en carnitina, glicerilfosforilcolina y varias glicoproteínas y generalmente es de color amarillento (Johnson y Everitt, 1980).

#### **1.4.5. Conducto deferente**

Es un órgano reproductivo que se inicia en la cola del epidídimo y finaliza en la uretra pelviana, a la cual llega luego de entrar a la cavidad abdominal (Sato y Montoya, 1990), de los camélidos tiene una característica particular que es pequeña y poco desarrollada la ampolla del conducto deferente, en tanto que en carneros y toros la ampolla es bien desarrollada y es uno de los principales lugares donde el semen es almacenado, una pequeña ampolla del conducto deferente en los camélidos puede ser una de las razones del porque los intentos de colección de semen por electroeyaculación que no son satisfactorios, indica como funciones del conducto deferente el pasaje y almacenamiento de los espermatozoides hasta el momento de la eyaculación, y en vacunos y ovinos también tiene la función de agregar fructuosa y ácido cítrico al semen (Bravo, 1995).

La función de los conductos deferentes es transportar a los espermatozoides a la uretra en preparación para la eyaculación y también sirven de almacén de los espermatozoides (Knobil y Neill, 2006). El conducto deferente es delgado de 2 mm en su comienzo y se engrosa cuando alcanza la cavidad abdominal de 3 mm (Youngquist y Threfall, 2007).

#### **1.4.6. Glándulas accesorias**

Estas glándulas conformada por las glándulas bulbouretrales y las próstata, ya que los camélidos no poseen glándulas vesiculares, siendo esta ausencia una de las características más resaltantes en los camélidos (Bravo y col., 2000).

Las dos glándulas bulbouretrales son pares de forma ovoides y están localizadas de 7 a 8 cm de la próstata a los lados de la uretra, en la salida pélvica (Novoa y Leyva, 1996), mientras la próstata de alpaca tiene una forma de H; descansa dorsal y lateralmente sobre el cuello de la vejiga. Tiene un tamaño de aproximado de 3 por 2 cm, y no es fácil palparla por el recto (Sumar, 2002).

Indican que en la alpaca las glándulas accesorias elaboran secreciones, cuyo producto vierten en la uretra mezclándose con las secreciones producidas por los testículos,

influyendo favorablemente sobre la vitalidad y movimientos de los espermatozoides (Sato y Montoya, 1990).

## **1.5. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO**

La vida reproductiva de la alpaca, inicia con la desaparición de la adherencia pene-prepucial, cual es un desafío en la reproducción plena, esto se logra a los tres años en su totalidad (Sumar, 1983).

Las alpacas sólo producen una cría al año, con una gestación de 340 días en promedio y una duración de vida de entre 15 y 25 años. Durante la cópula de los camélidos sudamericanos (CSA), la postura, la duración de la misma y el patrón de eyaculación, han sido limitantes para el ámbito reproductivo con un interés internacional, siendo necesario implementar el uso de biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos como la inseminación artificial (IA) para acelerar la propagación de animales genéticamente superiores, que son selectos por la riqueza de su fibra y carne (Giuliano y col., 2008).

### **1.5.1. Pubertad**

Generalmente, la pubertad ocurre cuando el macho es capaz de producir espermatozoides (Sumar, 2002). Para saber exactamente la edad de pubertad se realizó un estudio de la testosterona sérica en alpacas machos de 9 a 12 meses de edad, estudio que reveló que el inicio de la pubertad ocurre a partir del 11vo mes de edad en el cual la producción media de testosterona no solo se hace mayor sino que se encuentra dentro de los rangos de animales machos adultos (Losno y Coyotupa, 1981), esto es confirmado por estudios realizados que los niveles de testosterona son de 231 pg/mL, a la edad de 18 meses ya pasan los 1000 pg/mL al igual a la edad de 24 meses (Carpio y col., 1999).

Conforme los machos maduran, los testículos se agrandan y los niveles de testosterona en sangre incrementan a más de 1000pg/ml aproximadamente a los 20 meses de edad en la mayoría de alpacas (Bravo, 1995; 2000). Las adherencias desaparecen en forma gradual con el crecimiento del animal bajo la influencia de la testosterona. A pesar de que al año de edad, los machos muestran interés sexual por las hembras, sólo cerca del 8% de las alpacas macho muestran una separación completa de las adherencias entre el pene y el prepucio y son capaces de realizar la copulación. A los dos años de edad,

cerca del 70% de los machos no tiene adherencias, y 100% a los tres años de edad (Sumar, 2002).

Existe una variación en la edad en que desaparece la adherencia pene-prepucial, la que podría explicarse parcialmente por la nutrición (Fernandez-Baca, 1993) como si hubiese una correlación entre el tamaño del animal con la medida del testículo (Galloway, 2000). La variación en el tamaño testicular a distintas edades o en el tamaño corporal, sugiere la influencia de otros factores, como la genética (Galloway, 2000).

### **1.5.2. Comportamiento sexual, cópula y eyaculación**

La actividad sexual de la alpaca en campo abierto es particularmente intensa durante la primera semana de la época de empadre, con alrededor de 70% de montas a hembras al menos una vez (Fernandez-Baca y col., 1972). Los machos tienen actitud activa y en ocasiones agresiva durante el apareamiento, en contraste con la actitud pasiva de la hembra (Sumar, 2002). Los machos pelean para hacer valer su dominio sobre los otros machos, usando su cuello, pecho y dientes caninos para establecer su superioridad (Fowler, 1998). Posteriormente, la actividad sexual decrece a pesar de la presencia de hembras receptivas, alcanzando un 0% en algunos casos, pero después de cambiar los machos, el empadre se reactiva alcanzando niveles comparables como los de la primera semana (Sumar, 1996). La asociación continua de machos y hembras inhibe de alguna manera después de un determinado periodo, la actividad sexual de los machos, situación que en ocasiones impide el apareamiento de hembras que reanudan el estro después de un apareamiento estéril o de muerte prematura del embrión (Sumar, 2002).

El comportamiento sexual demostrado por los camélidos sudamericanos machos puede ser dividido en dos fases: cortejo y cópula (Morton y col., 2008). Las hembras no preñadas están en estro continuamente y cuando los machos son introducidos al rebaño, ellos van a intentar aparearse con la primera hembra receptiva que encuentren, mediante la detección de feromonas usando la respuesta “flehmen” El cortejo empieza con el macho persiguiendo activamente a las hembras receptivas e intentando montarlas (Brown, 2000).

Si la hembra está receptiva, se colocará en posición de cúbito esternal pero si la hembra se niega, lo pateará, escupirá y se irá corriendo; el macho aun continuará por algunos

minutos, y si la hembra se sigue negando, luego cambiará por otra y comienza una nueva persecución. Cuando muchas hembras están disponibles, la elección de la hembra para el empadre se da al azar. El macho persigue a la hembra hasta que ella se recuesta (Bravo, 2002). La respuesta Flehmen en los camélidos no es tan notoria como en toros y carneros. El macho olfateará la zona perianal de la hembra o estiércol del corral y elevará su cabeza. El proceso de la cópula en los camélidos es único, por muchas razones: duración de la cópula, tiempo de eyaculación, lugar de depósito del semen, y comportamiento del macho (Bravo, 2002). Esta fase ocurre cuando la hembra adopta la posición de cópula en decúbito ventral con las extremidades inferiores metidas debajo del cuerpo (England y col., 1971). El macho cubre a la hembra, apretando los hombros de la hembra con sus codos, y su metatarso lo apoya en el suelo, lateral a los de la hembra (Novoa, 1970). El pene se vuelve rígido, y el proceso uretral empieza a realizar movimientos semi-rotativos. Cuando la vulva es localizada, el macho se acerca más a la hembra, y posiciona sus corvejones paralelos a los de ella. Además, la espalda del macho está es recta; sin embargo, cuando ya se dio la penetración, el espalda del macho se encorva y la región sacra del macho se coloca en una posición vertical y muy cerca al perineo de la hembra (Bravo, 2002). El macho muestra su excitación mordiendo las orejas de la hembra, con su cola moviéndose de arriba para abajo, la dilatación y contracción de los ollares y la vocalización (Novoa, 1970). El sonido gutural característicos de los machos durante el empadre es un aspecto integral en la liberación de la LH preovulatoria (Bravo, 1994). La duración de la cópula es determinada por el macho, y puede durar de 5 a 50 minutos (promedio de 25 minutos). La competencia entre machos acortará el tiempo, especialmente cuando un grupo de machos están montando a varias hembras, como ocurre en Perú (Bravo, 2002).

El macho penetra la cérvix con el pene, y va depositando el semen continuamente en los dos cuernos uterinos usando leves movimientos de empuje, como lo confirma un trabajo de palpación uterina vía laparotomía durante la cópula (Franco y col., 1981; Bravo, 1994; 2002). La examinación del útero 24 horas después de la monta evidencia hemorragia, inflamación, edema e hiperemia del endometrio, posiblemente por el trauma de los movimientos hechos por el pene o por una reacción inflamatoria del plasma seminal (Velásquez y Novoa, 1999; Bravo, 2002). Este proceso inflamatorio dura entre 3 a 4 días y se vuelve más severo si la hembra tiene más de dos cópulas (Bravo, 2002).



### **1.5.3. Esteroidogénesis**

En los testículos de las alpacas, las células de Leydig producen hormonas masculinas como respuesta a su estimulación por parte de la hormona luteinizante (LH), liberada por la hipófisis, a su vez estimulada por la GnRH secretada por el hipotálamo (Chenoweth, 1997). La testosterona producida por las células de Leydig es necesaria, entre otras cosas, para la función de las células de Sertoli y la producción de espermatozoides (Maddocks y col., 1995); (Chenoweth, 1997).

### **1.5.4. Espermatogénesis**

La espermatogénesis es un proceso de diferenciación celular que se lleva a cabo en los testículos (gónadas) en el cual las espermatogonias, a través de varias divisiones meióticas y transformaciones citológicas, dan origen a las espermátides maduras (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Este proceso se lleva a cabo en los compartimientos basal y adluminal del túbulo seminífero, separados funcionalmente entre sí por las células de Sertoli, que garantizan el ambiente propicio para que se lleve a cabo la espermatogénesis (Maddocks y col., 1995).

Bajo la acción de la FSH las células de Sertoli secretan glicoproteínas como transferrina, ceruloplasmina, inhibina, y proteína transportadora de andrógeno ABP (Griswold, 1995). Espermatogénesis se divide en dos fases. En donde la primera es la espermatocitogénesis, en donde suceden una serie de divisiones en las cuales la Espermatogonia forma las espermátides, y la segunda fase es la espermatogénesis, en las que las espermátides sufren metamorfosis para que logre formar al espermatozoide respectivamente. Este proceso para que sea completo se efectúa en 7 semanas aproximadamente, conforme se va desarrollando la espermatogénesis (Terranova Editores 2001).

#### **a. Espermatocitogénesis**

Los túbulos seminíferos constituyen dos tipos de células, como las células de Sertoli las cuales son grandes y sirven como células nutricionales. El otro tipo de células son los espermatogonios que son células más pequeñas pero más numerosas, y son los gametos primitivos. Los espermatocitos de primer orden están constituidos por cromosomas completos, como las células somáticas. Mediante la mitosis de reducción se separan otra vez los pares de cromosomas, emigrando cada uno de los pares hacia los polos del huso.

Aquellos cromosomas no se parten en cromosomas hijos, sino que los paternos se separan de los homólogos maternos y cada uno de estos dos grupos se distribuye en una célula hija, dando como resultado uno con el cromosoma X y el otro con el cromosoma Y, que son células hijas haploides. La mitosis ocupacional es la segunda división de maduración. En donde cada espermatocito de primer orden deriva cuatro células haploides que son espermátides. Las mismas tienen la función de conservar aun el carácter normal como tales células (Terranova Editores 2001), fase que comprende el proceso por el cual las células germinales primordiales se convierten en espermátides (Hafez, 2000).

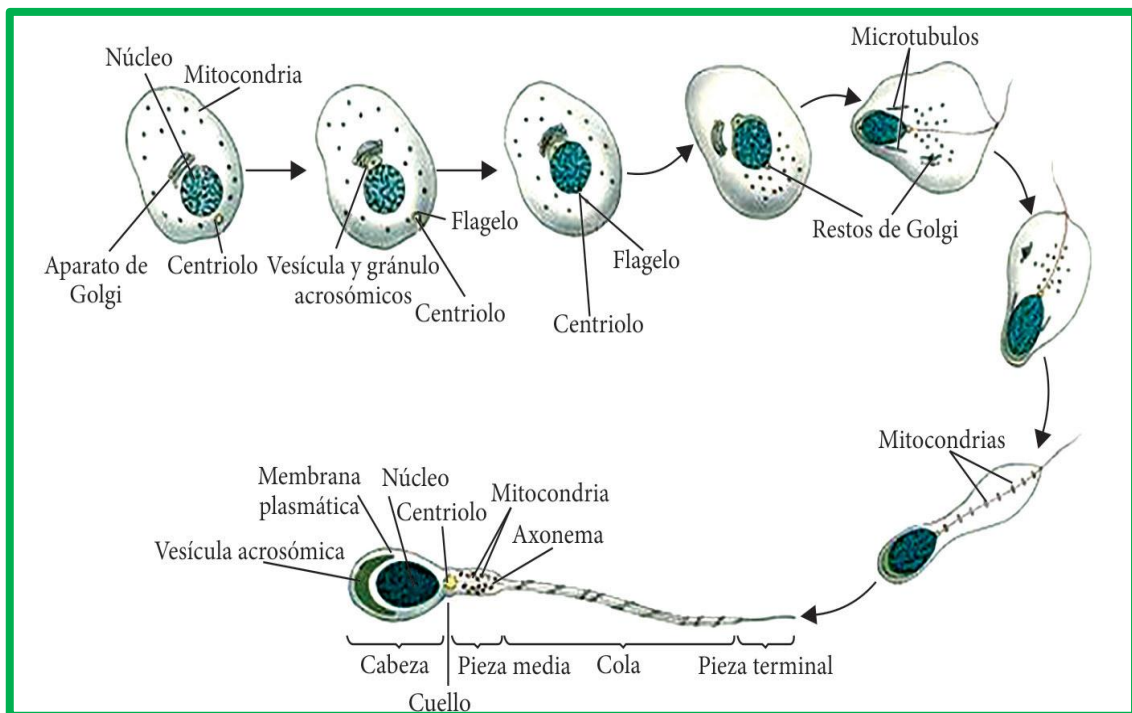
### **b. Espermiogénesis**

En la que las espermátides sufren cambios morfológicos progresivos y se transforman en espermatozoides completamente formados (Salisbury y col, 1978). Las espermatogonias contienen el número de cromosomas característico de la célula somática de la especie y están categorizadas en: Espermatogonia tipo A, que incluye espermatogonias A1 y formas celulares más diferenciadas llamadas espermatogonias A2, A3, A4; luego espermatogonia intermedia o "In", derivada de A4, después espermatogonia tipo 8, que incluye 81 y 82 (Salisbury y col., 1978, Ekstedt y col., 1986; Hafez, 1989).

Luego del crecimiento y desarrollo de los espermatocitos primarios siguen dos divisiones celulares. De la primera división se producen dos espermatocitos secundarios de cada uno de los espermatocitos primarios y de la segunda división se producen dos espermátides de cada espermatocito secundario (Salisbury y col., 1978).

El epitelio del túbulo seminífero contiene células de Sertoli y células germinales en diferentes etapas: espermatogonias, espermatocitos, espermátidas y espermatozoides. Los cambios que ocurren en la espermiogénesis consisten en: a) formación del acrosoma, que se extiende sobre la mitad de la superficie nuclear y contiene enzimas que ayudarán a la penetración del ovocito; b) condensación del núcleo; c) formación del cuello, pieza media y flagelo y d) eliminación de la mayor parte del citoplasma (Gómez y col., 2005).

Durante la espermiogénesis el centriolo produce el flagelo del espermatozoide, aquí las mitocondrias se reúnen y se acomodan en la base del núcleo formando parte de la pieza media, el aparato de Golgi dará origen a la vesícula acrosómica, el resto del citoplasma se elimina y el núcleo se condensará (Gilbert, 2005). Una vez finalizado el proceso de espermiogénesis, los espermatozoides son liberados hacia el lumen de los túbulos seminíferos en un proceso llamado espermiación y luego es transportado hacia el epidídimo (Hafez, 2000).



**Figura 1.1.** Espermiogénesis en mamífero.

Fuente: Gilbert, 2005.

### 1.5.5. Control hormonal de la espermatogénesis

La función de la LH en la regulación de la espermatogénesis es indirecta, ya que ésta estimula la liberación de testosterona. La testosterona 6.70 mg/dl y la FSH actúan en los túbulos seminíferos estimulando la espermatogénesis. La testosterona es necesaria en ciertas etapas de la espermatogénesis, y es más dominante en la regulación de estos procesos (Nabiev y col., 2003). También señala que la FSH es más dominante en la regulación de la espermiogénesis, tanto la testosterona como la FSH ejercen una influencia directa a través de las células germinales, indirectamente a través de las células de Sertoli. La FSH estimula a las células de Sertoli para secretar a la proteína andrógena de fijación (PAF) y la inhibina. La (PAF) es simplemente un transportador

para la testosterona, facilitando su disponibilidad durante la espermatogénesis en los túbulos seminíferos y transportándola a través de la red de testis hacia el epidídimo. La (PAF) se absorbe en el epidídimo (Nabiev y col., 2003).

Los controles de retroalimentación que operan entre los testículos, hipotálamo e hipófisis anterior en la regulación de la liberación de gonadotropinas (FSH y LH) y esteroides gonadales (testosterona). La ( $PG2\alpha$ ) estimula la liberación de LH y de testosterona (Nabiev y col., 2003).

### **1.5.6. Espermatozoides**

El espermatozoide es una única célula fecundante diseñada para abandonar el organismo del macho y así poder completar su función biológica de unión al ovocito maduro durante la fecundación, formación del cigoto y embrión. El rol principal de esta célula es el transporte de un paquete, constituido por el genoma nuclear y el centriolo, hasta el ovocito. Para realizar esta tarea, el espermatozoide está equipado con una batería de estructuras especializadas los que garantizan la interacción particular con el tracto genital femenino y el ovocito y sus envolturas. Las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, motilidad hiperactiva, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Graham y col., 1990).

### **1.5.7. Morfología del espermatozoide**

El espermatozoide es una célula masculina alargada especializada que está formada por tres componentes principales: cabeza, cuello y cola (Hafez, 1989), ambos rodeados por una membrana espermática o plasmolema (Sutovsky y Manandhar, 2006).

La cabeza del espermatozoide contiene el material genético y mide 8-10 micrones de largo, 4-5 micrones de ancho y 0.5 micrones de grosor (Hafez, 1989). En la cabeza del espermatozoide se encuentran el núcleo celular y el acrosoma. El núcleo es ovalado, aplanado, y la cromatina está compactada y conformada por ADN unido a histonas espermáticas (Salisbury y col., 1978). Los núcleos de los espermatozoides de la mayor parte de las especies contienen sólo protaminas, mientras que en otras especies

contienen cantidades variables de histonas más grandes, ricas en arginina (Garner y Hafez, 2002). El extremo anterior del núcleo está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa ubicado sobre el núcleo a manera de casquete, que contiene acrosina, hialurodasa y otras enzimas hidrolíticas, que participan en el proceso de fecundación (Garner y Hafez, 2002).

El acrosoma tiene forma de capuchón y cubre el polo anterior de la cabeza espermática (Salisbury y col., 1978). En la región anterior tiene el cuerpo apical, y en la caudal tiene un estrechamiento que conforma el segmento ecuatorial, asociado a los procesos de envejecimiento celular (Salisbury y col., 1978). Además, tiene una membrana acrosomal de doble pared, interna y externa, conectadas por puentes; dichas membranas se fusionan en su extremo caudal (Hafez, 1989). Contiene varias enzimas hidrolíticas (acrosina, hialuronidasa, esterases e hidrolasas ácidas) que participan activamente en el proceso de la fecundación (Hafez, 1989). Entre el núcleo espermático y el acrosoma se encuentra la sustancia perinuclear (Mc. Donald, 1991). La base del núcleo está rodeada por la vaina post-acrosómica donde hay proteínas ricas en azufre y receptores moleculares que reconocen al ovocito durante la fecundación (Salisbury y col., 1978).

El cuello del espermatozoide es una estructura corta (0.4-1.5 micrones de largo) ubicada entre la cabeza y la pieza intermedia. Tiene un centriolo rodeado de 9 fibras periféricas orientadas longitudinalmente que se continúan con las fibras exteriores de la pieza intermedia (Salisbury y col., 1978).

La cola espermática provee la fuerza motil al espermatozoide. Está formada por el cuello y los segmentos principal medio y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en el extremo posterior del núcleo. La placa basal del cuello es continua en sentido posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola. La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda su longitud de la cola, comprende el axonema. El axonema, como tal, se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. En el segmento medio, esta disposición 9 + 2 de los microtúbulos está rodeada por nueve fibras gruesas o densas que al parecer están relacionadas con los nueve dobletes del axonema. El axonema y las

fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial, dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de la cola, es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática (Garner y Hafez, 2002).

El segmento principal, que se extiende casi hasta la punta de la cola, está formado por el axonema al centro y sus fibras gruesas asociadas (Garner y Hafez, 2002). Además, esta sección está rodeada por una vaina fibrosa que provee soporte al axonema (Sutovsky y Manandhar, 2006). El segmento caudal o terminal contiene solo el axonema central cubierto por la membrana espermática (Garner y Hafez, 2002). El axonema es que le da motilidad al espermatozoide. Los pares externos de microtúbulos del patrón 9 + 2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes. La pieza principal es la porción más larga del flagelo, la estructura del filamento axial es idéntica a la estructura de la pieza media (Mc. Donald, 1991), e igualmente está rodeado por las fibras exteriores que son continuación de la pieza media (Hafez, 1989).

La longitud de los espermatozoides de los camélidos es menor que los de toro, búfalo, carnero, asno y garañón (Tibary y Anouassi, 1997). En la alpaca, las dimensiones de la cabeza es 6.1 +- 0.6 um de largo y 3.6 +- 0.3 um de ancho (Buendía y col., 2002).

#### **1.5.8. Metabolismo del espermatozoide**

La principal fuente de energía disponible para los espermatozoides son los carbohidratos de sustrato extracelular, y metabolizan rápidamente los monosacáridos como la glucosa; pero tienen capacidad muy limitada para utilizar otros azúcares o carbohidratos más complejos, porque la glucosa se liga a proteínas de transporte para atravesar la membrana plasmática (Álvarez y Storey, 1984), donde la necesidad energética es suplida en 90% por los sustratos exógenos y el restante 10% por fuentes intracelulares como los fosfolípidos (Álvarez y Storey, 1984 ), dicen que este metabolismo produce cantidades significativas de peróxido de hidrógeno en las mitocondrias, que tiene un efecto adverso sobre las membranas por causar la peroxidación de los lípidos, comprometiendo la integridad estructural, la motilidad, y la viabilidad espermática (Álvarez y Storey, 1984).

## **1.6. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACA**

El semen de alpaca es una suspensión celular líquida que contiene los gametos del macho (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor (Garner y Hafez, 2002). Para los camélidos, como sucede con su anatomía reproductiva, el semen también presenta características particulares.

Los eyaculados de los camélidos están caracterizados por un reducido volumen y baja concentración de espermatozoides comparando con otros animales de producción. Los parámetros como volumen, color, motilidad, concentración espermática, vitalidad y morfología son altamente variables entre machos y entre eyaculados colectados del mismo macho. Potencialmente, esto puede conducir a problemas para obtener eyaculados de calidad aceptable para la preservación de semen e inseminación artificial (Von Baer y Hellemann, 1999; Raymundo y col., 2000). Además, algunos trabajadores han notado que el eyaculado de alpacas y llamas no es fraccionado, por tanto la calidad del semen es uniforme desde el comienzo hasta el final de la cópula. Las características físicas y biológicas del semen del camélidos sudamericanos también varían dependiendo de las condiciones de colección, por ejemplo, el método de colección, fertilidad y libido del macho, temperatura ambiental, etc. (Tibary y Vaughan, 2006). Por ejemplo, el volumen, la concentración espermática, el porcentaje de espermatozoides vivos y la duración de la cópula fueron diferentes en los diferentes días de colección (Bravo y col., 1997a).

### **1.6.1. Mecanismo del eyaculado**

La eyaculación propiamente dicha es el resultado de contracciones rítmicas de los músculos estriados del cuerpo cavernoso, bulbo esponjoso y otros músculos pélvicos (Leyva, 1981).

El vaso deferente, el esfínter de la vejiga, la próstata, las vesículas seminales y el pene son estimulados por fibras nerviosas simpáticas provenientes del plexo nervioso pélvico, que está localizado retro peritonealmente al lado del recto (T10-L2). Por otro lado, la musculatura estriada perineal, incluyendo los músculos isqueocavernoso y bulbocavernoso, reciben inervación somática a través del nervio pudendo, proveniente de la región del sacro (S2-4) (Benson, 1994).

Durante la emisión seminal la activación simpática causa que el musculo liso del conducto deferente se contraiga, el cuello de la vejiga se contraiga y el musculo liso de la pared de la vejiga se relaje. Esto previene el pasaje retrogrado del semen dentro de la vejiga urinaria (Benson, 1994). Simultáneamente existe una contracción rítmica del esfínter anal (McDonnell, 1992).

La micción envuelve inervación semejante al proceso de eyaculación y la contaminación del semen por orina es el problema técnico más común durante la electroeyaculación (Martín, 1998). La orina parece ser más problemática en el caso de colección de semen en camélidos (Tibary y Vaughan, 2006), probablemente por la menor separación anatómica de las inervaciones controladoras de la eyaculación y micción en estas familias de mamíferos (Watson, 1978).

## **1.7. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL SEMEN DE ALPACAS**

Algunos parámetros macroscópicos en semen de alpacas se muestran en la siguiente lista.

### **1.7.1. Espuma**

La presencia de espuma en los eyaculados de alpacas es por movimientos de rotación generados del pene a través del proceso uretral dentro del tubo de la colecta en la cual el animal intenta simular lo que sucede en la hembra al eyacular en uno y otro cuerno uterino (Giuliano, 2012).

La abundante espuma que presenta, aun bastante tiempo después de la colección, y cuya desintegración hace disminuir a la mitad el volumen seminal medido inicialmente (Von Baer y Hellemann 1998). Los informes previos de (Von Baer y Hellemann, 1998; Aller y col., 2003) también reporta la colección de eyaculados con espuma al utilizar la vagina artificial, von Baer y Hellemann (1998) descartaron estos eyaculados mientras que (Aller y cl., 2003) usaron estos en sus valoraciones. Los eyaculados extraídos mediante V.A. suelen ser muy espumosos (Giuliano y col., 2008).

### **1.7.2. Filancia**

El eyaculado de los Camélidos Sudamericanos (CSA) es filante y muy viscoso. La filancia puede definirse como la capacidad de un fluido de extenderse hasta formar



hilos, a su vez un fluido viscoso es aquel en el cual existen fuerzas de atracción entre porciones adyacentes del fluido, estas fuerzas definen el comportamiento del flujo, el cual puede ser estudiado mediante un reograma, un gráfico de fuerza de corte (en función de la velocidad de corte) (Giuliano y Casaretto, 2011). La pendiente a cada velocidad de corte en el reograma representa los valores de viscosidad, denominada viscosidad aparente (Mendeluk y col., 2000). Por lo tanto, cuando el eyaculado de los CSA se pipetea, se forma un hilo de extensión (Giuliano y col., 2010).

También de carácter altamente viscoso, cual dificulta su manejo durante los procedimientos en el laboratorio (pipetear, frotis por extensión), dificulta determinar parámetros como concentración espermática y motilidad y su mezcla con dilutores (Garnica y col., 1993; Tibary y Vaughan, 2006). El grado de viscosidad varía entre machos (Tibary y Memon, 1999) y disminuye con el incremento de número de eyaculados en cualquier día (Bravo y col., 1997a). Dicha viscosidad se debe al plasma seminal, que viene a ser la fracción líquida del semen después de haberse separado los espermatozoides por centrifugación o filtración (Illera, 1994).

### **1.7.3. pH**

Los valores de pH proporcionados por varios autores se acercan mucho a la neutralidad, con cierta tendencia a alcalinidad ligera (Sumar, 1991). Los valores de pH promedio varían de 7.2 a 7.5 (Bravo y col., 1997b). Además, se ha demostrado que la frecuencia de eyaculados no tiene mayores efectos en los valores de pH (Galindo, 1995).

### **1.7.4. Volumen**

El promedio del volumen de cada eyaculado en alpacas varía entre 1 a 2 ml y el rango varía desde menos de 1 ml hasta 7 ml, aproximadamente (Von Kubicek, 1974; Fowler, 1998; Garnica y col., 1995). Por lo general, el volumen es menor cuando se colecta por electroeyaculación que usando la vagina artificial (Tibary y Memon, 1999). Los porcentajes en el semen de alpaca consisten en 11.5% de espermatozoides y 88.5% de fluido seminal (Garnica y col., 1993).

## **1.8. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE ALPACAS**

Algunos parámetros microscópicos en semen de alpacas se muestran en la siguiente lista.

### **1.8.1. Concentración**

La alta viscosidad del plasma seminal de la alpaca hacen difícil la adecuada colección y extensión del semen en el hemocitometro, cabe indicar que la concentración espermática en la alpaca no es de billones como en el toro, morueco o sementales, más bien esta entre cientos de miles (Bravo, 1995). La concentración espermática varía de acuerdo al método utilizado en la colección del semen, así se tiene que los investigadores van encontrando concentraciones que varían desde  $7.78 \times 10^4 / \text{mm}^3$  (Pacheco, 1996). Utilizando el método de la desviación de los conductos deferentes encontró como promedio  $23.87 \times 10^4$  espermatozoides por  $\text{mm}^3$  (Quintano, 2002). La concentración de los espermatozoides en el plasma seminal también se verá influenciado por el efecto de las eyaculaciones sucesivas. Mediante la desviación de conductos deferentes se obtuvo una concentración de  $23.87 \times 10^6$  a  $25.53 \times 10^6$  esp/ $\text{mm}^3$  (Quintano, 2002). Las grandes variaciones son atribuidas a los diferentes animales, tipos de colección de semen y números de eyaculados (Morton y col., 2008).

### **1.8.2. Motilidad**

La motilidad es una característica de la célula espermática y se trata de uno de los parámetros más importantes en las contrastaciones seminales, debido a que es imprescindible para que se produzca la fecundación (Rivera, 1998). La motilidad total en camélidos no está presente como en el caso de los carneros, en camélidos es mejor referirse como motilidad individual y oscilatoria, con movimiento lento que en parte es debido a la viscosidad del semen (Bravo, 1995).

La motilidad es dificultada por la presencia de viscosidad y filancia, muestra por medio de la contracción del flagelo y solo en un sitio, como un movimiento oscilatorio. La motilidad debe ser observada inmediatamente después de la colección del semen (Bravo, 2002). El espermatozoide incrementa su motilidad progresiva cuando el eyaculado se vuelve más líquido (Tibary y Memon, 1999). Se ha reportado un porcentaje de motilidad de  $34.2 \pm 5.3$  (Davalos y Olazabal, 2002). Hay dos tipos de motilidad.

#### **a. Motilidad individual**

Para observar el movimiento individual de las células se mezcla una gota de semen con un pequeño volumen de una solución salina fisiológica y se observa al microscopio bajo

un cubre objetos, con lente de gran aumento 40X (Pérez y Pérez, 1990). El movimiento individual se observa rectilíneo y progresivo además del porcentaje de espermatozoides que se mueven. Se requiere como mínimo para un eyaculado un mínimo progresivo de 70%. (Jara, 2000).

#### **b. Motilidad masal**

Es un movimiento de superficie que refleja la proporción de espermatozoides que presentan algún tipo de movimiento. Para observarlo se deposita una gota de semen puro y se coloca en un portaobjetos, se examina en un microscopio óptico a 40X aumentos y se valora la velocidad con la que se mueven los remolinos que se forman en la superficie de la gota de semen. Se les da una valoración de 0 a 5, siendo solamente utilizados para inseminación aquellos que presenten una motilidad masal buena (4) o muy buena (5) (Chahuayo y Paytán, 2013).

#### **1.8.3. Vitalidad**

La vitalidad se refiere a la supervivencia de espermatozoides en relación de los muertos de estas células después de la colecta. El porcentaje de espermatozoides vivos es de  $34.3 \pm 4.2$  por ciento (Dávalos et al., 2002), también hay reporte que incluso se encontró mayores a 66.50% (Cavalcanti, 2013).

Las tinciones permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los espermatozoides muertos, así en lo referente a colorantes la cabeza tiene la propiedad de dejar pasar los colorantes por perturbación de la membrana cefálica mientras que los vivos no (Lubos, 1983). Clasificando espermatozoides vivos y muertos, indicando que una buena motilidad tiene más del 60% de espermatozoides vivos, motilidad regular cuando los espermatozoides vivos están entre un 40 a 60% y motilidad baja cuando el porcentaje de espermatozoides vivos es menor al 40% en semen colectado de alpacas (Quispe, 1987).

### **1.9. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DEL SEMEN**

La composición bioquímica del semen de camélidos es similar al reportado de otras especies ganaderas (Tibary y Vaughan, 2006). Las concentraciones de ácido cítrico (promedio 4.3 mg/dl, rango 3.1 – 6.0 mg/dl) y fructosa (promedio 5.0 mg/dl, rango 3.9 – 6.6 mg/dl) del semen de alpaca fueron encontradas independientes de la edad del animal y mucho menos en comparación con toros, carneros, verracos, padrillos y

dromedarios, posiblemente debido a la falta de las glándulas de la vesícula seminal (Garnica y col., 1995).

Altas concentraciones de fructosa y ácido cítrico se han observado en camellos (Elwishy, 1988) Altas concentraciones de glucosa puede servir como la fuente de energía primaria al espermatozoide (Garnica y col., 1995).

Datos de camellos bactrianos en alpacas indican que el semen de los camélidos contiene un factor que induce la ovulación. El plasma seminal induce la ovulación en hembras después de su colocación en la vagina o en el útero de la hembra sin la necesidad de la monta natural o por una inyección vía intramuscular. La composición del factor inductor de la ovulación es desconocida pero es diferente a la GnRH (Adams, 2005).

**Tabla 1.1.** Composición bioquímica del semen de alpacas.

<b>Componentes</b>	<b>Alpaca de 3 años</b>	<b>Alpaca de 6 años</b>
Ácido cítrico (mg/dl)	4,3 ± 0,3	
Cloro (mEq/l)	348 ± 32	404 ± 34
Calcio (mg/dl)	18 ± 1	18 ± 3
Fósforo inorgánico (mg/dl)	12 ± 2	8 ± 0.4
Glucosa (mg/dl)	7 ± 0.4	5 ± 0.3
Fructuosa (mg/dl)		6 ± 0.1
Lípidos (mg/dl)	86 ± 10	95 ± 10
Fosfolípidos (mg/dl)	29 ± 1	29 ± 1
Nitrógeno total (mg/dl)	548 ± 50	647 ± 32
Proteína total (g/dl)	3 ± 0.3	4 ± 0.2
Albúminas (g/dl)	2 ± 0.3	2 ± 0.2
Globulinas (g/dl)	1 ± 0.1	2 ± 0.2

Fuente: (Garnica, 2003)

### **1.9.1. Plasma seminal**

En los mamíferos el plasma seminal es una secreción fisiológica de varias glándulas del tracto reproductivo del macho, que juega un rol importante en la maduración final de los espermatozoides, también interviene en los eventos hormonales, enzimáticos, modificación de superficie y de sobrevivencia de los mismos, además de cumplir la función como un vehículo para el eyaculado de los espermatozoides. Esta compleja

mezcla difiere entre especies, como también entre machos de la misma especie y contiene una variedad de componentes bioquímicos (Muiño-Blanco y col., 2008).

El plasma seminal de las alpacas está compuesto por las secreciones de las glándulas anexas, las que son vertidas hacia la uretra durante la eyaculación, generándose así la mezcla con los espermatozoides. Dichas secreciones contienen diversos componentes bioquímicos que regulan diferentes funciones espermáticas, y que por la presencia de mucopolisacáridos confieren la viscosidad al plasma. La disminución de la viscosidad depende de cada macho y tiende a disminuir con el aumento de eyaculados en un día. La importancia funcional del plasma seminal es cuestionable, ya que en el apareamiento natural actúa como portador y protector de los espermatozoides, siendo de suma importancia en el mantenimiento de la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (Hafez, 2002).

Los componentes orgánicos en el plasma seminal son esencialmente utilizados para mantener el metabolismo del espermatozoide, pH y osmolaridad, además las proteínas son las más importantes contribuyentes en la función espermática de los mamíferos (Maxwell y col., 2007). La mayoría de las proteínas del plasma seminal son productos secretados por las vesículas seminales y las glándulas sexuales accesorias en casi todos los mamíferos, algunas proteínas del plasma seminal son relativamente específicas para la regulación de la función y fertilidad espermática. Los espermatozoides eyaculados tienen motilidad reducida, actividad metabólica y capacidad fertilizante o incluso puede morir si las concentraciones de plasma seminal se reducen consecuencia de la dilución o lavado, denominado como “efecto de dilución” descrito por (Mann, 1954). Estos efectos tienen incidencia sobre las estructuras espermáticas incluyendo la desestabilización de la membrana, lo que finalmente produce la muerte celular (Maxwell y Jhonson, 1999).

La adición de plasma seminal a semen altamente diluido reduce el efecto de dilución e incrementa la vitalidad de los espermatozoides del carnero, conejo, toro y macho cabrío (Muiño-Blanco y col., 2008; Maxwell y Jhonson, 1999). Es entonces importante la preservación de una adecuada membrana plasmática del espermatozoide para la retención de su capacidad fertilizante, especialmente después de todo el estrés producido consecuencia de la refrigeración, congelación y almacenaje; esta protección es otorgada por componentes específicos del plasma seminal particularmente proteínas

que recubren la superficie del espermatozoide eyaculado (Muiño-Blanco y col., 2008). Sin embargo, el rol del plasma seminal en la función espermática es aún materia de especulación especialmente sobre los efectos inhibitorios o estimulantes que pudiera tener.

### **1.9.2. Enzimas del plasma seminal**

Gamma glutamiltransferasa ( $\gamma$ -GT) en el líquido seminal es secretada principalmente desde la glándula de la próstata, y es aproximadamente 200 veces mayor que la de la sangre (Uchijima y col., 1986) Estudios recientes han demostrado que la enzima  $\gamma$ -GT en sí misma no es necesaria para la función reproductiva, pero juega un papel importante en el sistema de glutatión peroxidasa que está implicado en la protección de los espermatozoides contra los radicales libres de oxígeno (Zalata y col., 1995).

Una gran variedad de enzimas está presente en el plasma seminal, pero en muchos casos no se ha identificado la glándula responsable de su producción. Los niveles de las enzimas en plasma seminal son muy importantes para el metabolismo del esperma, así como la función del esperma (Brooks, 1990).

La Fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra en una gran cantidad de tejidos y órganos, incluyendo los huesos, hígado, riñón, intestino, pulmón y placenta (Hoffmann y col., 1989). También se han detectado niveles variables de fosfatasa alcalina en el fluido seminal de algunos mamíferos, incluyendo el de gallo y el pavo (Bell y Lake, 1962).

## **1.10. COLECCIÓN DE SEMEN EN ALPACAS**

La colecta de semen varía de acuerdo a la especie por su comportamiento sexual, y en el caso particular de los camélidos sudamericanos, se presentan características muy peculiares. Como la posición en el apareamiento es decúbitoventral y el animal presenta un temperamento nervioso, hace que la obtención de semen presente serias dificultades (Bustinza, 2001). La colección de semen en camélidos sudamericanos presenta dificultades como: la duración de la cópula, la posición de cópula, el lugar de depósito del semen y el tipo de eyaculación, así como el aspecto del eyaculado, su extrema viscosidad y lo dificultoso de su manejo, esto hizo que durante varias décadas se

investigue una técnica óptima para poder extraer este semen y poder manejar los espermatozoides sin que estos pierdan su capacidad fecundante (Solís, 1997).

Los reportes sobre métodos de colección son diversos (Huanca y Adams, 2007); desde el primer reporte (Mogrovejo, 1952).

#### **1.10.1. Aspiración vaginal postcoital**

Técnica donde las muestras de semen pueden ser obtenidas por aspiración del fondo de la vagina después de la copula, ya que una pequeña cantidad de semen es eyaculada al momento de llevar el pene de un cuerno al otro, este método no es invasivo ni tedioso pero la desventaja es que este semen es incompleto, contaminado y diluido con las secreciones del tracto genital femenino, se puede utilizar este semen para realizar la evaluación de espermatozoides como motilidad, vitalidad, morfología; estas muestras frecuentemente se obtienen con residuos sanguinolentos y se ve de un color rosado ya que el endometrio se encuentra inflamado y lacerado por la copula; la técnica es introducir un espejo por la vulva previamente aseada y con la ayuda de una fuente de luz se ubica la cerviz, inmediatamente se aspira con una pipeta adosada a una jeringa, la utilización de este tipo de semen para evaluar la fertilidad del macho es muy cuestionada (Bravo, 2002).

#### **1.10.2. Bulbouretrotomía**

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

La técnica de la bulbouretrectomía para posibilitar la colección de semen de alpacas macho con escaso nivel de viscosidad, para lo cual se describe la técnica, con una incisión en la piel perianal hasta visualizar la uretra pélvica y las glándulas bulbouretrales, las cuales fueron extirpadas, esta técnica dura en promedio 3 horas con

una recuperación completa del animal en 17 días. Los animales fueron sometidos a una bulbourectomía y luego del reposo post operatorio, se realizó la colección de semen utilizando vagina artificial con la técnica del maniquí a intervalos de una semana; este eyaculado no posee viscosidad por lo que su manejo es más fácil y se puede utilizar dilutores usados en otras (Copa y Col., 2003).

### **1.10.3. Desviación de los conductos deferentes**

Con el fin de colectar espermatozoides libres de la secreción de las glándulas anexas en alpacas, se desarrollaron las técnicas de la desviación de los conductos deferentes y la extirpación de la próstata; la primera técnica intenta colectar espermatozoides directamente de su reservorio, la cola del epidídimo, sin que estos tengan contacto con las secreciones de las glándulas anexas, desviando quirúrgicamente los conductos deferentes hacia la región ventral del animal o la cara interna del muslo, formando una fístula permanente en la piel desde donde se puedan colectar continuamente sin la necesidad de tener hembra receptiva ni someter a los espermatozoides a la acción de enzimas proteolíticas que intenten licuefactar el coagulo del eyaculado para la mejor manipulación espermática (Paricahua, 2001; Quintano, 2002).

### **1.10.4. Electroeyaculación**

Esta técnica fue ejercida utilizando un equipo medianamente sofisticado de fabricación nacional, con una intensidad máxima de 40 voltios, se obtuvieron muestras de semen con la ventaja de realizar la colección sin la necesidad de tener hembras en celo, acortar el tiempo de colección y realizarla a lo largo de todo el año (Fernández-Baca y Calderón, 1966); también se utilizó esta técnica para obtener semen de vicuñas y pacovicuñas (Fernández-Baca y Novoa, 1968). Los resultados de Electroeyaculación muestran gran variabilidad entre animales y aún entre el mismo animal, además de obtenerse semen muy diluido con las secreciones de las glándulas anexas, contaminado con semen y baja concentración espermática.

Con este método realizaron un estudio comparativo de colección de semen entre la electroeyaculación y vagina artificial, se utilizó un electroeyaculador Plectron, obteniéndose buenos resultados con 60 cargas eléctricas de 2 segundos de duración, 14 voltios, 4 amperios, 25 ciclos/segundos y 2 segundos de descanso entre cada pulsación, el semen obtenido por este método fue ( $1.0 \pm 0.47$  ml) de volumen, concentración



espermática (384 705/mm<sup>3</sup>), motilidad (48.2 ± 15.6 %) y pH (7.1 ± 0.2), siendo altamente diferente a las características obtenidas mediante vagina artificial (Cárdenas y Col., 1987).

#### **1.10.5. Esponjas vaginales**

Este método fue realizada usando trozos de esponja que se introducen en la parte anterior de la vagina y que absorbe el semen y otros fluidos vaginales, sirviendo como contenedores; el inconveniente de este método es que logra obtener semen muy contaminado y mezclado con los fluidos del tracto genital femenino y esto diluye el semen y lo contamina con bacterias, dificultando así su evaluación, por lo que no se recomienda su uso para fines de inseminación artificial (San Martín, 1961).

#### **1.10.6. Fístula uretral**

Es el método que requiere realizar una fístula quirúrgica en la uretra peneana entre el ano y el escroto; el semen es colectado durante la copula natural, esta técnica se realiza utilizando anestesia epidural y anestesia local para colocar un catéter plástico en la uretra desde el pene hasta la vejiga, el cual sirve para guiar la cirugía y ayuda a identificar la uretra; la incisión se realiza en la piel, el músculo bulbocavernoso aislado y se separa la uretra del cuerpo cavernoso; este método no interfiere en la copula y las secuelas post operatorias parecen no afectar al animal (Kubiceck, 1974).

#### **1.10.7. Fundas vaginales**

Es la primera técnica realizada para la colección de semen en alpacas, utilizando una funda de jebe colocada intravaginalmente antes de la copula; después de la monta se retiraba la funda que servía de recipiente de semen; con esta técnica se logró colectar semen, aún que algunos inconvenientes, ya que se interfería con la copula normal y alargaba el tiempo de monta, más allá de los valores normales; la colocación de la funda dentro del tracto genital y su fijación ofrecía serias dificultades y con frecuencia provocaban lesiones que inhabilitaban a la hembra para su uso posterior (Mogrovejo, 1952).

Existieron otros intentos de colectar semen con la técnica de fundas vaginales, obteniendo pequeños volúmenes y bajas condiciones espermáticas, como: volumen (0.67-0.42 ml), pH (7.32), concentración espermática (83 750 000/ ml),

espermatozoides vivos (27.58 %), espermatozoides muertos (72. 42 %), color blanco cristalino, aspecto viscoso, etc. (Sucapuca, 1991).

#### **1.10.8. Vagina artificial**

Esta técnica se constituye a través de un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de copula; la vagina artificial fue una modificación de la vagina artificial usada para vacunos y ovinos, la cual consistía en un tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 de largo con una funda interna de látex, un cono de látex al que envolvía un alambre en espiral simulando la cervix de la alpaca y al final un frasco de colección de semen de ovino o un tubo de centrifuga (Sumar, 2002), el agua a 45° se coloca por una válvula-espita los machos aceptaron el maniquí después de un corto entrenamiento; la copula se interrumpía cada 10 minutos aproximadamente para renovar el agua caliente, el semen colectado varió, dependiendo de los machos, el tiempo de copula y el número de interrupciones que se les hacía para cambiar el agua, el color del eyaculado, independientemente del volumen, fue de un blanco lechoso a blanco claro, este semen no muestra motilidad masal por lo espeso de su consistencia. Esta técnica fue desarrollada por (Sumar y Leyva, 1981).

La utilización de vagina artificial en combinación con una hembra receptiva es la técnica más óptima de obtener semen de buena calidad, el que se puede utilizar para fines de inseminación artificial, teniendo en cuenta de usar una fuente de calor continuo y la característica que imite a la cerviz (Vaughan y col., 2003).

En un estudio llevado a cabo, se encontró que utilizando hembra receptiva al lado del maniquí incrementaba la calidad del eyaculado obtenido mediante vagina artificial a comparación de utilizar el maniquí solo, incrementando el tiempo de cópula de 15,9 a 16,8 minutos (Dávalos y col., 2002).

En Bolivia se trató de mejorar la técnica de la vagina artificial utilizando un maniquí de grupa, el cual es un aditamento que se le coloca a la hembra sin necesidad de contar con un maniquí de cuerpo completo, la técnica es similar a la del maniquí, y otra técnica es la de la vagina artificial por desviación del pene en el momento de la penetración, tal como se realiza en vacunos, al comparar las tres técnicas se tuvo una aceptación por parte del macho del 20 % para la técnica del maniquí completo sin hembra receptiva 80

% para la técnica del maniquí de grupa y un 90 % para la técnica de la desviación del pene al inicio de la copula, según el autor la última técnica es la más recomendable pues evita la contaminación del eyaculado (Delgado y Col., 2003).

### **1.11. FACTORES QUE IMPLICAN EN LA COLECCIÓN DE SEMEN**

Hay factores que se relacionan durante la colecta de semen aparte de los métodos de colección y son los siguientes:

#### **1.11.1. Frecuencia de colección**

Un estudio realizado del efecto de la repetición de colección de semen usando el método de la vagina artificial, realizando hasta tres colecciones diarias por un periodo de 12 días seguidos, los resultados obtenidos indican que las características más afectadas por la frecuencia de colección fueron la concentración de espermatozoides, la cual desciende significativamente en la tercera colección, así mismo el porcentaje de anomalías en la cola se incrementa pero la motilidad, porcentaje de vitalidad y el porcentaje de espermatozoides normales no fue afectada, se vio la diferencia significativa en todas las características al hacer las comparaciones entre individuos; pero a partir del día 10 de colección, casi todos los machos tuvieron un descenso en todas las características seminales e incluso algunos solo eyacularon plasma seminal, especialmente en la tercera colección diaria (Bravo y col., 1997a).

#### **1.11.2. Duración de la copula**

Las características del semen se relacionan con la duración de la copula, esto ha sido descrito desde dos puntos de vista: primero el cambio del tubo colector cada 5 minutos, y segundo la interrupción de la copula a cada 10 minutos, en general no existen cambios considerables de volumen del eyaculado pero si existen cambios substanciales en la concentración y el porcentaje de espermatozoides vivos, la concentración se incrementó a los 20 minutos de copula, sumado a esto, la interrupción de la copula incrementa el porcentaje de espermatozoides muertos cuando se interrumpe a partir de los 15 minutos, por lo que no se recomienda interrumpir la copula ya que la última fracción del eyaculado parece ser la que lleva la mayor concentración de espermatozoides vivos (Bravo y col., 2002).

### **1.11.3. Época del año**

Se sabe que la época así como la alimentación juegan un papel importante en la producción espermática y en la calidad del semen colectado de acuerdo a la época del año, esto en condiciones de la sierra sudamericana ya que gracias a la geografía se presentan estaciones marcadas, problema que no se presenta en el hemisferio norte por lo que no se orientan estudios hacia este tema; un reporte de la sierra argentina en llamas indica que la época juega un papel importante en la producción espermática, concentración y porcentaje de anormalidades, sobre todo de la cola, teniéndose buenas características seminales durante el verano y las anormalidades se incrementa durante el invierno (Giuliano y Col., 2006).

### **1.11.4. Edad del macho**

En un trabajo realizado en llamas, para evaluar el efecto de la edad de los animales en las características seminales obtenidas mediante la técnica de la vagina artificial, se utilizaron llamas machos de 3, 4 y 5 años de edad, se determinó que esta característica no tiene influencia en las características seminales (Fernández y Col., 2003). En alpacas, la edad tiene un efecto muy sutil en la producción espermática, ya que las características mejoran ligeramente de acuerdo aumenta la edad, pero dicha diferencia no es significativa (Bravo, 2002; Quispe, 1987).

## **1.12. DILUTORES**

Los dilutores de espermatozoides contienen componentes protectores que permiten la sobrevivencia fuera de tracto reproductivo. Además de esto aumentan el volumen de la dosis inseminada. Yema de huevo, leche y glicerol son los componentes más adicionados para la protección de los espermatozoides frente al descenso de temperatura. Las lipoproteínas presentes en la leche y la yema de huevo protegen a los espermatozoides del choque térmico. Substratos metabolizables como glucosa constituyen la fuente de energía para las células espermáticas. Los diluyentes deben contener sustancias con alta capacidad tampón para neutralizarlos. Los antibióticos son adicionados en forma rutinaria a los diluyentes para retardar o eliminar el crecimiento de bacterias que invariablemente contaminan el semen como consecuencia de la recolección, los antibióticos más empleados son la penicilina G-potásica o sódica cristalina, la gentamicina o amikacina, la estreptomycinina o penicilina G-potásica cristalina. La combinación de penicilina G-potásica cristalina con amikacina fue más

eficaz en el control de bacterias anaerobias. La presión osmótica y el pH del diluyente deben ajustarse para favorecer la sobrevivencia espermática. El pH de los diluyentes puede variar entre 6,7 y 7,2 sin afectar la calidad espermática durante el almacenamiento (Pineda y Pinilla, 2007).

Los principales sustratos de energía para dilutores son: fructosa, sorbitol y glicerilfosforilcolina, los cuales se encuentran en el plasma seminal (Sandoval, 2005). Siendo la fructosa el azúcar principal del semen y la que proporciona los hidratos de carbono que son utilizados como fuente de energía de los espermatozoides móviles; es así que, para proveer energía al espermatozoide, los dilutores de semen deben incluir azúcares del tipo monosacárido (Garner y Hafez, 2002). Se ha reportado el uso de glucosa, manosa, maltosa o lactosa como fuentes de energía y protección de los espermatozoides (Banda, 2009). Otros carbohidratos (polisacáridos) no actúan como fuente de energía, pero son utilizados por su habilidad para preservar la motilidad espermática (Sandoval, 2005).

#### **1.12.1. Dilutor a base de leche**

Lleva como componente principal leche descremada con una proporción pequeña de yema de huevo de gallina y como fuente energética fructosa u otro azúcar (Santiani y col., 2005). Los estudios demuestran que algunos dilutores que mantuvieron mayor número de espermatozoides vivos, como: tris tamponado 70%; tryladil 65%; yema de huevo, glucosa y citrato 8% (Vaughan y col., 2003).

La leche tiene diversas propiedades que la hace uno de los componentes más usados en los dilutores de semen. Las proteínas de la leche son las que proveen dichas propiedades a favor de los espermatozoides durante la congelación, y pueden funcionar como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salomón y Maxwell, 2000). Es así que la caseína, la proteína que se encuentra en mayor proporción en la leche, muestra propiedades antioxidantes (Foote y col., 2002). Sin embargo, la lactenina resulta tóxica para los espermatozoides, por lo que se convierte en práctica común calentar a temperaturas superiores a los 90°C la leche entera antes de ser usada, con lo que se logra inactivar dicha proteína (Salamón y Maxwell, 2000).

La leche puede ser usada en distintas presentaciones, como leche entera (Sandoval, 2005), reconstituida (Salomón y Maxwell, 2000) o descremada (Sandoval, 2005). Asimismo, el uso de leche tratada a altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salomón y Maxwell, 2000).

### **1.12.2. Dilutor a base de TES**

Lleva una proporción mayor de Tes acompañado de Tris, citrato de sodio y una proporción de aproximadamente 20% de yema de huevo (Rodríguez, 2009).

### **1.12.3. Tris + yema de huevo**

La cual tiene entre sus ingredientes Tris (Hidroximetil amino metano), ácido cítrico y fructosa los cuales son preparados en agua bidestilada completando la mezcla con yema de huevo de gallina en diferentes proporciones (Aisen y col., 2002).

La yema de huevo se ha identificado con efectos positivos en la refrigeración y la congelación de los gametos masculinos. Es posible que permita intercambios de componentes lipídicos con los espermatozoides durante la criopreservación (Maldjiana y col., 2005).

Se ha demostrado que la yema de huevo sirve para proteger al espermatozoide del daño producido durante el enfriamiento y descongelamiento (Salamon y Maxwell, 2000); así como mejorar la fertilidad espermática (Lamia y col., 2004). Esta acción protectora se atribuye a las proteínas de baja densidad (LDL) (Moussa y col., 2002). Las LDL están compuestas por 87% de lípidos y 12% de proteínas, y presentan una forma esférica con un centro formado por triglicéridos, los cuales están rodeados por una envoltura de proteínas y fosfolípidos. Se cree que durante la congelación descongelación, las LDL son desbaratadas y los fosfolípidos son liberados en el medio, y vendrían a formar una cubierta protectora en la superficie de las membranas espermáticas (Hu y col., 2010). Estudios demostraron que las LDL son responsables del proceso de solidificación en la criopreservación, durante el cual se alterarían las estructuras de las LDL favoreciéndose la deshidratación de los espermatozoides, confiriendo así resistencia al shock térmico del proceso de congelación-descongelación. Sin embargo, el mecanismo preciso por el

que la yema de huevo ayuda a la protección de los espermatozoides no ha sido claramente establecido (Moussa et al., 2002), (Lamia y col., 2004).

De igual manera se sabe de algunos componentes de la yema de huevo que pueden tener un rol antagónico al efecto protector de las LDL (Demianowicz y Strezek, 1996) separaron la yema de huevo en dos lipoproteínas: las LDL y las lipoproteínas de alta-densidad (HDL-high density proteins), y observaron que las LDL proveían una mejor protección al semen de cerdo que la yema entera, mientras que las HDL disminuyeron significativamente la motilidad espermática en comparación con la yema entera; y señalaron posteriormente que eso se debía a la presencia de gránulos en las HDL. Esto sugeriría que la yema de huevo puede contener algunos componentes dañinos que pueden reducir notablemente la motilidad espermática (Moussa y col., 2002).

Otros dilutores probados en semen de alpaca colectado por vagina artificial son el PBS, BSA y dilutores comerciales para rumiantes y camélidos europeos (Wabersky y col., 1989).

### **1.13. USO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS**

El semen de camélidos sudamericanos presenta la característica de tener gran viscosidad, lo que limita su manipulación. El semen viscoso no es exclusivo de los camélidos, de hecho es común entre los mamíferos, aunque los mecanismos parecen variar ampliamente (Robert y Cagnon 1999). El significado fisiológico del semen coagulado todavía se está discutiendo en la literatura, y se cree que la formación de un tapón vaginal en algunas especies es esencial para prevenir la salida del semen de la vagina de la hembra (roedor, primate) o cérvix (cerdo). En roedores, el tapón está pensado para prevenir la inseminación posterior de espermatozoides de machos no dominantes. Los tapones vaginales también pueden representar un reservorio y contribuir a la liberación gradual de espermatozoides en especies donde la hembra no tiene un cuello uterino largo y moco cervical, y el semen se deposita directamente en el útero (Robert y Cagnon 1999).

Los métodos enzimáticos se han utilizado anteriormente para licuar el semen de alpaca (Bravo y col., 1999; Callo y col. 1999; Bravo y col 2000b; 2000) utilizaron colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa y tripsina para la licuefacción del semen de alpaca y llama,

lo cuales reportó pocos efectos perjudiciales, mientras que otros se observó que el tratamiento con enzimas era altamente tóxico para los espermatozoides de camello (Santiani y col, 2005) y otros métodos también se han utilizado para licuar semen de alpaca antes de líquidos o preservación congelada pero los autores no han podido cuantificar los efectos sobre la viscosidad del semen.

A la vez el semen humano se coagula espontáneamente en una masa gelatinosa semisólida. La licuefacción también es espontánea en el semen humano normal, debido a la presencia de quimotripsina (Cohen y Aafjes, 1982), tripsina (Mortimer, 1994) y una proteasa de tipo quimotripsina secretada a partir de próstata, conocida como antígeno prostático específico (PSA; Robert y Cagnon, 1999). Sin embargo, una proporción de las muestras de semen humano son hiperviscosas, la viscosidad del semen sigue siendo incierta. Sin embargo (Mortimer, 1994) sugiere que puede estar asociado con una reducción en la fertilidad humana en virtud de su deterioro del movimiento de los espermatozoides. Además, obtener altos rendimientos de esperma (tasas de recuperación) de las muestras de semen hiperviscosas sigue siendo un problema importante (Mortimer, 1994).



## **CAPÍTULO II METODOLOGÍA**

### **2.1. UBICACIÓN**

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Reproducción Asistida de la Estación Experimental Agraria Canaán, ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray de la provincia de Huamanga, Departamento de Ayacucho a una altitud de 2736 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 12 - 18 °C, precipitación pluvial promedio de 500 mm, humedad relativa de 40 – 50%, latitud sur a 13°10'09" y 74°11'53" longitud oeste (Senamhi, 2013).

### **2.2. DURACIÓN**

El trabajo de investigación tuvo una duración de 3 meses desde abril hasta junio del 2017.

### **2.3. MUESTRA**

Se trabajó con un total de 28 muestras positivas a espermatozoides colectados a una frecuencia de 2 a 3 veces a la semana por macho, de un total de 07 alpacas libres de adherencia pene-prepucial, aproximadamente de 4 a 7 años de edad, previo al entrenamiento para aceptar al maniquí.

### **2.4. MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **2.4.1. Materiales de campo**

- Cuaderno de apuntes.
- Gel no espermicida.
- Lapiceros.
- Mameluco.
- Maniquís.
- Papel tolla.

- Registros de colección de semen.
- Tiras de jebe.

#### **2.4.2. Materiales de laboratorio**

- Cámara de neubawer.
- Gorra descartable de laboratorio.
- Guantes látex.
- Jeringa desechable de 1, 3, 5ml.
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos.
- Mascarillas descartable
- Papel toalla.
- Tips para micropipetas de diferentes capacidades.
- Tubos eppendorf de 1.5 y 2.5ml.
- Tubos falcons de 15ml.

#### **2.4.3. Equipos y aparatos**

- Autoclave.
- Balanza analítica.
- Baño maría.
- Bolsas de agua.
- Bolsas de plástico.
- Congeladora.
- Estufa.
- Gradilla normal.
- Gradilla térmica.
- Hervidor eléctrico.
- Inflador.
- Microscopio.
- Micropipeta de 10-100, 100-1000 microlitros (ul).
- Platina térmica.
- Refrigeradora.
- Regla graduada en centímetros.
- Selladora de plástico.

- Termómetro de alcohol (mercurio).
- Vagina artificial para alpacas.

#### **2.4.4. Insumos**

- Andromed (diluyente).
- Colagenasa.
- Eosina Nigrosina.

#### **2.4.5. Material biológico**

- Semen de alpacas.

#### **2.4.6. Otros**

- Alcohol de 76°.
- Cámara digital.
- Cronometro.
- Guardapolvo blanco.
- Laptop.
- Plumón.

### **2.5. PROBLEMAS ESPECÍFICOS**

1. ¿Cuál será el efecto de la colagenasa al 5% en la filancia seminal, motilidad y vitalidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*)?
2. ¿Cuál será el efecto del pipeteo en la filancia seminal, motilidad y vitalidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*)?
3. ¿Cuál será el efecto de la incubación en la filancia seminal, motilidad y vitalidad espermáticos en alpacas (*Vicugna pacos*)?

### **2.6. METODOLOGÍA**

#### **2.6.1. Preparación de vagina artificial**

La preparación de la vagina artificial se hizo de la siguiente manera:

- a) En primer lugar, con la ayuda de la selladora se elaboró conos del plástico estéril con la finalidad de que sirva como colector de semen durante la copula, acoplado a los tubos falcons de 5ml esterilizados en autoclave. El tubo falcons se protegió con

fundas de esponja para cubrir de rayos solares en todo el proceso de colección y durante la ejecución del trabajo.

- b) Se tomó un extremo de la manga de látex y se pasó por dentro del cuerpo de la vagina artificial luego doblándose en el borde más cercano al pistón de aire sobre el cual se colocó el cono de plástico armado y se aseguró con bandas elásticas de jebe para asegurar de que no escape el agua ni el aire que se llenó después del armado de la vagina artificial.
- c) Se colocó agua atemperada entre 40 a 42 °C dentro del tubo PVC por encima del látex, calculando que llene hasta unos 3 centímetros debajo del borde superior del tubo; luego se dobló el otro borde del látex y se sujetó fuertemente con otras bandas elásticas de jebe.
- d) Con la ayuda del inflador se inyectó aire por el pistón a una presión moderada donde el dedo índice penetró con facilidad en el látex de la vagina artificial.
- e) Armada la vagina artificial se envolvió en franelas, luego se rodeó de dos bolsas de agua (agua hervida) para tratar de mantener la temperatura de vagina artificial en 40°C a 42°C durante el tiempo de la copula, luego con otras franelas se envolvió por encima de bolsas de agua y se sujetó con bandas elásticas de jebe, finalizado este proceso de preparación de vagina artificial, se trasladó al campo de colecta de la muestra de semen.
- f) Se evaluó la temperatura inicial y final de la vagina artificial con un termómetro de alcohol introduciendo entre el látex con la ayuda de gel no espermicida, esta evaluación se hizo en todas las colecciones.

### **2.6.2. Preparación de los diluyentes**

La adición de la colagenasa al semen de alpaca fue de la siguiente manera:

- a. Con la ayuda de la balanza analítica se pesó 1mg de colagenasa y se diluyó en 1ml de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), 0.05ml solución para 5ml de diluyente (5%). Se separó 50ul en tubos eppendorf 1.5ml de capacidad, y finalmente se conservó en la congeladora en menos 5<sup>0</sup>C durante todo el proceso de ejecución. Para añadir al semen fresco se atemperó en baño maría antes de la colecta hasta la dilución. Preparación del diluyente final de Andromed se hizo de acuerdo las indicaciones en el inserto adjunto al frasco.
- b. El contenido (200 ml) de un frasco de Andromed se puede diluir con 800 ml de agua bidestilada estéril previamente temperada a 30°C hasta 35°C. Es posible

preparar volúmenes menores, siempre que se mantenga la proporción de 4 partes de agua bidestilada con 1 parte del concentrado la cual fue usada en 100% en este trabajo.

- c. Para lograr las propiedades óptimas de conservación a Andromed, se agregó la cantidad requerida de agua al concentrado y no viceversa. El diluyente preparado Andromed fué atemperado antes de su uso en baño maría a 37°C.
- d. La pre-dilución de Andromed se realizó antes de la colecta diaria y se mantuvo en baño maría de 37°C hasta la dilución con semen fresco.

Andromed contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de la UE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina).

### **2.6.3. Colección del semen**

La técnica de colección de semen fue mediante el uso del maniquí de alpacas, en el cual se acopló la vagina artificial de alpacas, la colecta se llevó acabo en un lugar plano libre de contaminantes, previa la limpieza con alcohol y papel toalla a la parte posterior del maniquí donde se coloca la entrada de la vagina artificial.

A los reproductores se les rasuró la parte ventral alrededor del prepucio con el fin de no contaminar la muestra. Para que tenga más lividez sexual, al maniquí se hizo unos movimientos ligeros simulando a la hembra real, esto no implico diferencia alguna en la muestra.

Diariamente se manejó registros durante el experimento donde se anotó la temperatura inicial y final de vagina artificial, el tiempo de la copula fue anotado desde que el macho opto en posición de la penetración a la vagina con los pelvis pegado en el maniquí; también se anotó el número de arete de los reproductores con los que se ha trabajado.

### **2.6.4. Análisis de semen en el laboratorio**

Después de finalizar la cópula en el maniquí, el semen colectado se llevó inmediatamente al laboratorio lo más rápido posible y se colocó en baño maría a fin de mantener la temperatura de 37°C.

### **2.6.5. Análisis macroscópico y microscópico de semen fresco**

Inmediatamente después de la llegada al laboratorio, el semen se procedió a evaluar los parámetros tales como:

#### **A. Evaluaciones macroscópicas**

Se evaluaron en forma visual directa las siguientes características: (volumen y espuma) en un tubo falcons graduado de 15ml. El pH se evaluó utilizando tiras reactivas indicadoras de pH “universal test paper” con una gota de semen. La filancia se midió utilizando una regla metálica graduada haciendo una extensión ascendente con una pipeta de 100ul y se registró la medida máxima.

#### **B. Evaluaciones microscópicas**

Se evaluaron las siguientes características con la ayuda del microscopio óptico:

##### **B.1. Motilidad espermática**

Se evaluó colocando 10ul de semen sobre una lámina portaobjeto luego cubierto con una lámina cubre objetos, ambos a una temperatura de 37°C en platina térmica y se observó en el microscopio a un aumento de 100 y 400x, esta característica se evaluó subjetivamente desde 5% de motilidad hasta 100% en cinco campos diferentes.

##### **B.2. Vitalidad espermática**

Se evaluó entre la mezcla de 10ul de semen y 10ul de tinción eosina y nigrosina en una proporción de 1:1 sobre platina térmica en lámina portaobjeto a una temperatura de 37°C; luego se hizo el frotis y se dejó secar a temperatura ambiental, posterior a ello se observó en el microscopio a 400x. Los espermatozoides vivos se observaron de color transparente y los muertos de color rosado oscuro, la evaluación de cada muestra se realizó con un conteo total de 100 espermatozoides, de esta se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

##### **B.3. Concentración espermática**

Se realizó con el uso de cámara Neubauer para la cual se mezcló 0.9ml de agua bidestilada con 0.1ml de semen en un tubo eppendorf de 2.5ml sobre una gradilla normal. Se vertió el contenido en el tubo y se pipeteo para disminuir la viscosidad; luego con la misma pipeta se llenó en la cámara Neubauer desechando las 2 primeras

gotas, pasado los 5 minutos se observó en el microscopio óptico a 400x. Los espermatozoides se contaron presentes en 5 de los 25 cuadrados de la cámara.

La concentración se calculó según la siguiente fórmula (Mellisho, 2010):

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

Donde:

**C:** Se determina en millones por ml.

**N:** Promedio de espermatozoide contados en 5 campos pequeños en ambas cámaras.

**D:** Grado de dilución 0.1 ml de semen en 0.9 ml de agua bidestilada = 10.

#### **2.6.6. Dilución de semen**

La dilución se realizó con la proporción de 1:1 (Semen : Andromed) durante todo el proceso de ejecución del presente trabajo de investigación, con un dilutor comercial prediluido 4:1 (Agua bidestilada : Andromed) atemperada en baño maría a 37°C.

#### **2.6.7. Análisis post dilución de semen**

Inmediatamente después de la evaluación el semen fresco, se procedió a separar en volúmenes iguales en 3 distintos tubos eppendorf de 2.5ml para cada tratamiento; luego se diluyó con Andromed prediluido en una proporción de 1:1, atemperado sobre una gradilla térmica de 37°C, y se prosiguió a evaluar.

A continuación se especifican los tratamientos empleados:

**Tratamiento 1 (T1):** semen + Andromed prediluido con colagenasa al 5%.

**Tratamiento 2 (T2):** semen + Andromed prediluido con efecto del pipeteo de 10 veces.

**Tratamiento 1 (T3):** semen + Andromed prediluido con efecto de incubación durante 10 minutos.

Cada tratamiento se evaluó con intervalo de 20 minutos hasta las 2 horas post dilución de la siguiente manera en diferentes etapas, a continuación se detalla las etapas de evaluación:

**Etapa 1:** inmediatamente después de la dilución se evaluó todas las características macroscópicas y microscópicas, cual esta etapa se consideró como minuto cero; luego

las muestras de T1, T2 se guardaron en la refrigeración; la T3 pasado los 10 minutos de incubación a 37°C también se guardaron en refrigeración y se mantuvo durante todo el proceso de evaluación.

**Etapa 2:** evaluación después de 20 minutos.

**Etapa 3:** evaluación después de 40 minutos.

**Etapa 4:** evaluación después de 60 minutos.

**Etapa 5:** evaluación después de 2 horas.

### **2.6.8. Evaluación macroscópica de semen diluido**

Después de la dilución con Andromed prediluido, principalmente se evaluó la disminución de la filancia seminal en diferentes etapas por cada tratamiento establecido, la cual fue uno de las características en estudio, mientras las otras características mencionadas anteriormente se evaluaron solo en semen fresco. La metodología del desarrollo fue igual que en el análisis en semen fresco utilizando la regla metálica graduada en una superficie plana.

### **2.6.9. Evaluación microscópica de semen diluido**

La evaluación se realizó exactamente con la misma metodología que se hizo en semen fresco, en este caso en semen diluido solamente se consideró la motilidad y vitalidad espermática, estos parámetros fueron más importantes durante el experimento del presente trabajo.

Todas las muestras de cada tratamiento se mantuvieron en refrigeración de 5°C a 8°C inmediatamente después de evaluar la primera etapa hasta las dos horas de evaluación, excepto del T3 que se mantuvo solamente hasta 10 minutos post dilución en gradilla térmica de 37°C.

## **2.7. DISEÑO ESTADÍSTICO**

Se analizaron los datos de las siguientes variables; mantenimiento de la temperatura, tiempo de cópula, volumen de semen, volumen de espuma, filancia, pH, motilidad, vitalidad y concentración espermática, estos se reportan mediante estadísticos de tendencia central (promedio) y de dispersión (desviación estándar, valores mínimo y máximo).



Para analizar la filancia, motilidad y vitalidad espermática en las diferentes etapas de tiempo en cada tratamiento se ha analizado mediante un diseño completamente al azar (DCA) cuyo modelo aditivo lineal (Kaps and Lamberson, 2004) es el siguiente:

$$y_{ij} = u + D_i + e_{ij}$$

Dónde:

$y_{ij}$  = Variable respuesta (filancia, motilidad y vitalidad).

$u$  = Media general o constante común.

$D_i$  = Efecto del factor tratamientos.

$e_{ij}$  = Error experimental o efecto ambiental no controlable del experimento.

Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Duncan con un nivel de confianza del 95%.

Los datos se han procesado con el programa estadístico SAS® (SAS 9.2, Institute. Inc., Cary, NC, USA).

### CAPÍTULO III

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Evaluación de la temperatura de vagina artificial durante la colecta de semen

**Tabla 3.1** Temperatura en la vagina artificial durante la colecta de semen (minutos)

N° de muestras	Temperatura inicial (Grados Celsius)				Temperatura final (Grados Celsius)			
	Mín.	Máx.	Promedio ± D.E.	C.V. %	Mín.	Máx.	Promedio ± D.E.	C.V. %
28	40	42	41.86 ± 0.52	1.25	36	40	38.75 ± 0.93	2.39

La (tabla 3.1) muestran el promedio de la temperatura inicial de 41.86°C, disminuyendo al finalizar la copula a 38.75°C en promedio en la vagina artificial, la cual estaría influyendo directamente en los parámetros seminal del presente trabajo; (Raymundo y col., 2000) trabajo con 40 °C como temperatura inicial y mantuvo algunos parámetros evaluados dentro del estándar como la motilidad, (Zirena, 2014) también trabajó con temperatura entre 40°C a 42°C quien utilizó una frazadilla eléctrica para llevar una constante de temperatura de la vagina artificial y obtuvo parámetros espermáticos dentro del estándar, a diferencia que en el presente trabajo se utilizó bolsas de agua para mantener temperatura en la vagina artificial.

La temperatura tuvo efectos sobre los parámetros espermáticos en el presente estudio; pero un no existen otros estudios en cuanto a la temperatura optima que se puede utilizar sobre la vagina artificial; se observó efectos de la temperatura durante la colecta de semen, sobre la motilidad y vitalidad espermática, siendo factor principal en disminuir estos parámetros seminales por un efecto de shock térmico cual es perjudicial en calidad espermática en la criopreservación seminal o inseminación artificial con semen fresco.

### 3.2. Evaluación del tiempo de copula

**Tabla 3.2.** Tiempo de copula (minutos)

<b>N° de muestras</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Promedio ± D.E. (minutos)</b>	<b>C.V. %</b>
28	7	55	19.32 ± 0.01	51.85

La (tabla 3.2) muestra el tiempo de cópula promedio en machos colectados fueron 19.32 minutos evaluado a finales de época reproductiva (abril a junio), estos resultados son superiores a los parámetros encontrados por (Dávalos y Olazábal, 2002), (Mendoza, 2015) y (Bravo y col., 1997a) quienes obtuvieron 15.9, 15.61 y 15.3 minutos respectivamente. El resultado encontrado es superior, debido a que la colecta se realizó en épocas del año donde las alpacas están aun con alto grado de lívido sexual; por lo que estos animales fueron alimentados con pastos verdes cultivados (alfalfa y avena) ad libitum durante el día y desde la selección los machos no estuvieron en contacto con las hembras cual podría también elevar el apetito sexual por competencia al maniquí, esto explica por qué se tuvo resultados superiores a los autores citados, indicando que (Mendoza, 2015) trabajó con edades y en época reproductiva similares. Por otro lado el resultado obtenido es inferior a los obtenidos por (Meza, 2011), (Bravo y col, 1997b) y (Raymundo y col., 2000) quienes obtuvieron resultados muy cercanos entre si  $21.65 \pm 5.91$ ,  $21.6$  y  $26.5 \pm 3.8$  minutos respectivamente. La inferioridad posiblemente pueda darse por la época del año en que se trabajó, la edad del animal y diferencias individuales; pero se encuentra dentro del rango reportados por los autores. En el presente trabajo se observó en las alpacas que tienen mayor edad, el tiempo de copula se extiende con mayor frecuencia. La alimentación con pastos cultivados en la finalización de época reproductiva, aumenta la lividez sexual incluso puede recuperar la calidad espermática.

### 3.3. Evaluación del volumen de semen

**Tabla 3.3.** Volumen en semen fresco (ml)

<b>N° de muestras</b>	<b>Mínimo</b>	<b>máximo</b>	<b>Promedio ± D.E. (ml)</b>	<b>C.V. %</b>
28	0.4	4	1.68 ± 0.88	52.53

La (tabla 3.3) indica el volumen de semen fresco promedio de 1.68 ml obtenido mediante vagina artificial, este resultado es superior al reporte de (Mendoza, 2015) quien obtuvo  $1.18 \pm 0.78$  ml en finales de época reproductiva, este debe posiblemente a la cantidad de animales con que se trabajó para colección de muestras de semen, además la calidad de alimentación es básico e influyente en los parámetros espermáticos y la lividez sexual en los machos, igualmente nuestro trabajo supera al reportes de (Cavalcanti, 2013) de  $1.17 \pm 0.91$  ml en inicios de época reproductiva (noviembre y diciembre) y similares a los autores (Garnica y col.,1993); (Bravo y col., 1997a); (Flores y col., 2002) y (Alarcón y col., 2012) quienes obtuvieron promedios de  $1,7 \pm 0,2$  ml;  $1.8 \pm 0.8$  ml; 1.5 ml y 1.5 ml respectivamente. A si mismo encontramos resultados superiores por (Raymundo y col., 2000) 2.7 ml quien trabajo durante los meses de febrero y marzo; (Bravo y col., 2002) y (Baca, 1998) quienes indican 2.4 y 2.3 ml respectivamente. Se podría afirmar que en la época reproductiva media hay mayor producción de semen correlacionado a la producción hormonal, esto demuestra la influencia de la época reproductiva al volumen espermático; también los volúmenes obtenidos en los diferentes trabajos se diferencian principalmente a la técnica utilizada (Bustinza, 2001), y la geografía de su habitat donde se realiza el estudio.

Hay reportes en llamas machos donde se observa la superioridad en volumen a comparación de las alpacas, tales son los casos reportados de 3.5 ml y 4 ml por (Von Baer y Helleman, 1998) y (Skidmore y col., 2004) respectivamente, debido al tamaño del testículo y las glándulas anexas que producen mayor cantidad de plasma seminal en este especie.

### 3.4. Evaluación del volumen de espuma de semen

**Tabla 3.4.** Volumen de espuma en semen fresco (ml)

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio $\pm$ D.E. (ml)
28	0	10	$1.13 \pm 2.09$

La (tabla 3.4) muestra el volumen promedio de espuma en semen fresco en alpacas que fué  $1.13 \pm 2.09$ ml, inferior al reporte de (Mendoza, 2015) quien obtuvo  $1.44 \pm 1.98$  ml, trabajando con 28 muestras de eyaculados al igual que el presente trabajo; por otra parte hay trabajos que muestran la superioridad al presente estudio de (Olaguivel y Naveros,

2014) demostraron  $3.60 \pm 1.11$  ml de espuma en promedio utilizando hasta 84 eyaculados; (Cavalcanti, 2013), quien encontró un promedio de  $3.03 \pm 3.32$  ml trabajando con 48 eyaculados para la evaluación respectiva. Por lo tanto es posible que a mayor números de eyaculados y mayor tiempo de cópula se observará mayor medida de la espuma colectados a través de la vagina artificial, dónde genera movimientos de rotación del pene a través del proceso uretral dentro del tubo de la colecta en la cual el animal intenta simular lo que sucede en la hembra al eyacular en uno y otro cuerno uterino (Giuliano, 2012), por ende la colección de semen con vagina artificial presenta altos porcentajes de presencia de espuma (Von Baer y Hellemann, 1998) a comparación a la electroeyaculación; también está influenciada con la edad y las características individuales del macho.

### 3.5. Evaluación del pH

**Tabla 3.5.** pH en semen fresco

<b>N° de muestras</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Promedio <math>\pm</math> D.E.</b>	<b>C.V. %</b>
28	6	8	$7.14 \pm 0.49$	6.83

La (tabla 3.5) muestra el pH encontrado de semen fresco es de 7.14 en promedio, similar al encontrado por (Raymundo y col., 2000) no muestra numéricamente pero reporta que el pH mostro una tendencia a la alcalinidad al igual a nuestro, mientras el trabajo evaluada por (Villanueva y col., 2018) en verano e invierno reportan casi neutro de 7.01 y 7.1 de pH correspondientemente con tiras reactivas de color, reporte de (Garcés, 2017) sin oligoelementos y con oligoelementos encontró 7.13 y 7.15 respectivamente en alpacas, similar al presente trabajo. Por otra parte hay otras investigaciones superior a nuestro trabajo, reportados por (Rivera, 1998) que obtuvo 7.91 en alpacas, (Godoy, 2014) quien obtuvo 7.97 utilizando al igual que en el presente trabajo las tiras reactivas indicadoras de pH, y (Aller y col., 2003) logró 7.4; todos los autores mencionados utilizaron vagina artificial y los dos últimos trabajados en llamas.

Las diferencias y similitudes puede deberse a la conjugación numéricas fisiológica de los valores del pH en los órganos accesorios como del epidídimo y conducto deferente fluctúa entre 6.72 a 6.39; en la próstata y glándulas bulbouretrales se encuentra entre 6.06 y 6.18 y el pH de la uretra es de 7.24 en alpacas adultas, siendo esta última más

alcalina producto de su contaminación con orina (Huamantuco, 2005). Se ha demostrado que la frecuencia de eyaculados no tiene mayores efectos en los valores de pH (Sumar, 2002), a las vez los cambios en el pH seminal afectan la viabilidad y motilidad espermática. Los bajos o elevados niveles de la secreción de las glándulas sexuales accesorias son determinantes para que el pH del semen tenga una reacción más ácida o alcalina (King y Macpherson, 2005).

### 3.6. Evaluación de la filancia seminal

**Tabla 3.6.** Filancia seminal en semen fresco (cm)

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio ± D.E. (cm)	C.V. %
28	0	6	1.86 ± 1.51	80.88

La (tabla 3.6) representa la evaluación de la filancia (cm) en semen fresco fué  $1.86 \pm 1.51$ cm superior al reportado por (Raymundo y col., 2000) quien determinó  $1.04 \pm 0.28$ cm realizado en tiempo reproductivo que fluctúan de 6 a 8 años de alpacas machos, reportados por (Huanca y col., 2011) quienes obtuvieron un promedio de 0,99 cm. El reporte de (Bravo y col., 2000) en alpacas y llamas demuestran 1.5cm con un rango de  $0.4 \pm 4.9$ , mantenidos en pastos naturales y con una hembra al lado del maniquí. Reporte de (Mendoza, 2015) demuestra 1.89cm en promedio similar al presente trabajo de investigación, por otro lado hay reportes superiores al presente trabajo, (Naveros y Contreras, 2014) quienes reportaron 2.23cm trabajando con los mismos machos a (Mendoza, 2015), en efecto se afirma que la variabilidad de filancia difiere entre machos, épocas del año (Bravo y col., 1997a), y propias de la especie (Giuliano, 2012), (Mendoza, 2015); también inferior a reportados por (Meza, 2011); (Olaguivel y Naveros, 2014) en  $2.08 \pm 1.57$ cm;  $3.73 \pm 1.24$ cm en promedio respectivamente, (Villanueva y col., 2015) encontró valores de ( $5.9 \pm 3.4$  cm) y ( $3.7 \pm 2.0$  cm) evaluadas en verano e invierno de forma respectiva, la superioridad posiblemente es debido a la edad del macho con que se trabajó, podría también ser explicada por posibles mecanismos de protección del plasma seminal sobre la calidad de los espermatozoides en cada estación del año (Troedsson y col. 2005), a la vez en el presente trabajo se observó, que a mayor tiempo de cópula, generalmente fué alta la filancia en alpacas mayores a 7 años.

### 3.7. Evaluación de motilidad espermática

**Tabla 3.7.** Motilidad espermática en semen fresco (%)

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio ± D.E. (%)	C.V. %
28	20	85	52.50 ± 22.67	43.18

La (tabla 3.7) muestra la motilidad espermática encontrada en semen fresco un promedio de 52.50%, superior al encontrado por (Zirena, 2014) quien obtuvo 43.33% de motilidad en condiciones similares colectado mediante vagina artificial, considerando un tiempo máximo de monta de 20 minutos; esta se debe probablemente por la frecuencia de colecta 6 a 7 veces por semana a cada animal, donde pudo haber ocurrido la sobrecarga en la producción de espermatozoides y la condición ambiental es muy diferente la costa con la sierra, mientras hay reporte similar en la cual demuestra 54.0 ± 8.0 % motilidad realizado en finales del tiempo reproductivo que fluctúan de 6 a 8 años colectado a través de la vagina artificial, también hay trabajos que muestran superioridad al nuestro (Mendoza, 2015) quien obtuvo 79.6%, puede deberse a que el autor obtuvo la muestra en menor tiempo a la vez utilizó la frazadilla eléctrica cual mantuvo la temperatura constante. Esta características tiene la variabilidad dependiendo el tipo de colección y la individual, de manera que (Fernández-Baca y Calderón 1965); (Mogrovejo, 1952) y (Bravo, 1989) usando electroeyaculación encontró entre 50 al 60% de motilidad; con funda vaginal encontró una motilidad de 20-40% y con vagina artificial encontró una motilidad de 30% respectivamente.

### 3.8. Evaluación de vitalidad espermática

**Tabla 3.8.** Vitalidad espermática en semen fresco (%)

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio ± D.E. (%)	C.V. %
28	42	89	70.64 ± 8.80	12.46

La (tabla 3.8) muestra la vitalidad espermática en un promedio de 70.64%, similar a (Dávalos y Olazabal, 2002); (Alarcón y col., 2012) y (Bravo y col., 1997b), quienes lograron demostrar 72.1%, 70.8% y 69.6 % en promedios respectivamente de vitalidad de espermática en alpacas, a (Zirena, 2014) quien obtuvo 68.52 ± 14.07% en

condiciones similares colectado mediante vagina artificial, considerando un tiempo máximo de monta de 20 minutos; así mismo hay reportes superiores a nuestro como de (Mendoza, 2015) quien obtuvo  $88.0 \pm 16.86 \%$ , trabajados en animales menos de 6 años al igual a (Naveros y Contreras, 2014) quienes también demostraron  $78.27 \pm 5.88\%$  de vitalidad, esta característica se debe a factor edad de los machos (Mendoza, 2015) y mayor a los tres años que posibilitan los mejores rangos de calidad seminal, entre ellas de vitalidad (Medina y Bautista, 2012), a la vez se debe a la influencia de efectos naturales (temperatura, rayos solares) durante la colección. Por otro lado hay reportes inferiores, de (Cavalcanti, 2013) quien obtuvo  $66.50 \pm 12.42\%$ ;  $52.9 \pm 18.4$  y  $64.5 \pm 15.9$  en invierno y verano correspondientemente encontrados por (Villanueva y col., 2015) colectados por vagina artificial a comparación al presente trabajo, puede deberse a que el autor obtuvo la muestra en mayor tiempo (tiempo de cópula).

### 3.9. Evaluación de concentración espermática

**Tabla 3.9.** Concentración espermática en semen fresco (Mill/ml)

N° de muestras	Mínimo	Máximo	Promedio $\pm$ D.E. (Mill/ml)	C.V. %
28	2	382.5	$81.13 \pm 74.54$	91.87

La (tabla 3.9) muestra el promedio de concentración espermática en semen fresco de alpacas que fué 81.13 millones/ml, similar a 80,48 y 80.3 millones/ml encontrados por (Huanca y col., 2011) y (Alarcón y col., 2012) respectivamente; al comparar variación individual en dos épocas del año (lluvia y seca) encontraron  $78.58 \pm 68.50$  y  $85.65 \pm 71.73$  millones/ml respectivamente (Huanca y col., 2011), por ende el factor macho influye en las características seminales, obteniendo mejores resultados durante la época de lluvia similar al presente trabajo, a la vez hay reporte con suplemento y sin suplemento de oligoelementos a las alpacas de 6 años quien demostró 61.67 y 51.25 millones/ml (Garcés, 2017), si puede afirmar cuando hay suplemento nutricional hay mejora en calidad espermática, sin embargo es inferior a nuestro trabajo; por otro lado es inferior a  $112.36 \pm 19.09$  millones/ml y  $134.5 \pm 93.55$  millones/ml en promedio obtenidos por (Naveros y Contreras, 2014) y (Mendoza, 2015) utilizando los mismos machos trabajados en época reproductiva y finales de la época reproductiva, a 150 y 152.98 millones/ml obtenidos por (Garnica y col.,1993) y (Meza, 2011) de forma respectiva, también a  $135.9 \pm 88.7$  y  $242.4 \pm 140.9$  logrado en verano e invierno por



(Villanueva y col., 2015) respectivamente. Esto nos demuestra que en las alpacas hay mucha influencia la época reproductiva en la concentración espermática y es muy variable, posiblemente debido a diferencias individuales y de método de colección (Sumar, 1997); también influye la frecuencia de colección.

La consistencia del semen influye en la concentración espermática de (translúcida a blanco cremoso) y a menudo se observa color grisáceo (Tibary y Memon, 1999), cual no se tomó en cuenta en el presente trabajo.

### 3.10. Evaluación de filancia seminal post dilución

**Tabla 3.10.** Filancia post dilución de semen según tratamientos en cada etapa del tiempo (cm)

Etapas	Tratamientos		
	Colagenasa al 5%	Pipeteo (10 veces)	Incubación (10 minutos)
Promedio ± D.E. (cm)			
i: Disuelto	0.95 ± 1.04 <sup>a</sup>	0.89 ± 0.95 <sup>a</sup>	0.91 ± 0.89 <sup>a</sup>
ii: 20 minutos	0.71 ± 0.81 <sup>b</sup>	0.71 ± 0.85 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.55 <sup>b</sup>
iii: 40 minutos	0.60 ± 0.76 <sup>c</sup>	0.53 ± 0.58 <sup>c</sup>	0.65 ± 0.74 <sup>c</sup>
iv: 1 hora	0.49 ± 0.70 <sup>d</sup>	0.44 ± 0.56 <sup>d</sup>	0.51 ± 0.61 <sup>d</sup>
v: 2 horas	0.26 ± 0.45 <sup>e</sup>	0.27 ± 0.47 <sup>e</sup>	0.33 ± 0.67 <sup>e</sup>

*Tratamientos:* T1; T2 y T3.

*Etapas:* Ei; Eii; Eiii; Eiv y Ev.

<sup>a</sup> Superíndice iguales indican que no existe diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).

<sup>a, b, c, d, e</sup> Superíndices diferentes indican que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

La (tabla 3.10) muestra la disminución de la filancia seminal con tratamientos (T1: colagenasa al 5%; T2: pipeteo 10 veces y T3: incubación por 10 minutos), evaluadas en diferentes tiempos en intervalos de 20 minutos. En el presente cuadro se observa entre tratamientos en la primera etapa (disuelto); T1: 0.95 ± 1.04; T2: 0.89 ± 0.95; T3: 0.91 ± 0.89 respectivamente que no demostraron ser estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ), al igual que en las siguientes etapas en evaluaciones correlativas entre tratamiento hasta dentro de dos horas (Ev: T1: 0.26 ± 0.45; T2: 0.27 ± 0.47; T3: 0.33 ± 0.67); pero existe diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre etapas (Ei; Eii; Eiii; Eiv y Ev) evaluadas durante dos horas para cada tratamiento (T1; T2 y T3). No existen reportes similares utilizando tratamientos químico, mecánico y físico en diferentes etapas del tiempo, pero hay reportes utilizando colagenasa, papaína y tripsina en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y

4.0mg/ml evaluadas desde 5, 10, 20 y 40 minutos, donde el efecto de colagenasa es gradual de (10, 20, 40 minutos) en  $2.9 \pm 0.7\text{mm}$ ;  $1.9 \pm 0.7\text{mm}$ ;  $1.7 \pm 0.7\text{mm}$ ;  $1.4 \pm 0.7\text{mm}$  para 1.0mg/ml de concentración, y  $1.4 \pm 0.6\text{mm}$ ,  $2.1 \pm 0.7\text{mm}$ ,  $0.8 \pm 0.4\text{mm}$   $0.3 \pm 0.2\text{mm}$  para 4.0mg/ml de concentración. Por otro lado, la papaína fue más efectiva en disminuir de la viscosidad del semen en todas las concentraciones (Morton y col., 2012). A comparación del presente trabajo con el uso de colagenasa (T1), la reducción de la filancia fue gradual desde la primera etapa hasta las 2h post dilución (Ei; Eii; Eiii; Eiv) en  $0.95 \pm 1.04$ ;  $0.71 \pm 0.81$ ;  $0.60 \pm 0.76$ ;  $0.49 \pm 0.70$ ;  $0.26 \pm 0.45$  de forma respectiva en un porcentaje de 86%. Respecto al uso de colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa y tripsina en concentración 1mg/ml a la eyaculación, evaluadas en 0 min (tiempo de recogida de esperma), 2, 5 minutos, menciona que la colagenasa fue eficaz en muestra de semen de alpaca una vez que estaba en contacto con la enzima en la disminución de la viscosidad (filancia) en 99% en 5 minutos (Bravo y col., 1999, 2000b). El mejoramiento de las características del semen en llama utilizando una solución de colagenasa al 0,1% en H-TAL-BSA por 4 y 8 minutos disminuyó la filancia en 100% pero no la viscosidad del semen (Giuliano y Casaretto, 2011). Otros estudios en llama demuestran el efecto de cinco concentraciones (25%, 50%, 75%, 80%, 100%) de extracto de piña sobre la reducción de la filancia a los 0 seg, 10 seg, 25 seg, 50 seg y 1 minutos, donde determinaron que a partir de 75 % de concentración de extracto de piña, elimina la filancia de la plasma seminal del semen de llama, en un tiempo promedio de 50 segundos (Delgado y Choque 2015), mencionan que la bromelina disgrega la viscosidad (filancia) de semen de llama en un promedio de 5 minutos (Mardonez y Delgado, 2012), más rápido estadísticamente que las demás enzimas colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa y tripsina (Bravo y col., 2000).

Hay una serie de factores que pueden explicar las diferencias y contradicciones encontradas usando enzimas proteolíticas en el presente trabajo con los otros estudios, la más probable sea la fuente, la pureza y el tipo de enzimas utilizada (Morton y col., 2012).

Respecto al tratamiento mecánico (pipeteo por 10 veces) en disminución de la filancia seminal fue gradual en un 85% evaluada durante 2h. Existen reportes similares en llamas que realizaron un experimento probando diferentes métodos de reducción de la filancia en el semen de llama: método mecánico (pasajes por aguja 0.5mm), diluciones

con suero puro de llama y diluciones con suero de llama + PBS, dónde las determinaciones de la filancia se realizó en 0, 30, 60 y 90 minutos, demostrándolo que sólo el método mecánico disminuyó la filancia en 80%, con respecto al control y los demás tratamientos (Bérgamo y col., 2012), también demuestran que hay tratamientos para romper la viscosidad del seminal usando 10 pasajes por una aguja n°18 con una jeringa de 5ml; luego sometieron a la centrifugación a 802r por 10 minutos en la cual se redujo la viscosidad sin alteraron los parámetros seminales (Zirena, 2014), pero hay contradicción con respecto los pasajes por aguja que no son eficientes para reducir la viscosidad del semen y los parámetros del semen se alteran (Morton y col., 2008). Estudios con otros métodos mecánicos tal como centrifugación y centrifugación en gradientes no son eficaces en la eliminación del plasma seminal viscoso (Morton y col., 2012).

Respecto al tratamiento físico (incubación por 10 minutos a 37°C) para disminuir filancia seminal fue gradual en un 82% evaluada durante 2h. Un reporte similar demuestra la incubación de la muestras de semen de alpacas en un baño de agua a 37°C al menos 8h eliminan la viscosidad (Leyva y col., 1984) y (Garnica y col., 1993), 22h en llamas (Bravo y col., 2000); por otra parte cuando las muestras incubadas a 37°C, con 4: 1 y 8: 1 en H-TAL-BSA por 4 y 8 minutos respectivamente, no se observó la disminución de la filancia (Giuliano y Casaretto, 2011), comparación al presente trabajo de investigación se observó disminución ligera de filancia incubado en una gradilla térmica de 37°C por 10 minutos (tabla 3.10).

### 3.11. Evaluación de motilidad espermática post dilución

**Tabla 3.11.** Motilidad espermática post dilución de semen según tratamientos en cada etapa del tiempo (%)

Etapas	Tratamientos		
	Colagenasa al 5%	Pipeteo (10 veces)	Incubación (10 minutos)
	Promedio $\pm$ D.E. (%)		
<b>i:</b> Disuelto	38.04 $\pm$ 18.82 <sup>a</sup>	35.36 $\pm$ 19.62 <sup>a</sup>	35.54 $\pm$ 19.31 <sup>a</sup>
<b>ii:</b> 20 minutos	38.57 $\pm$ 21.55 <sup>b</sup>	33.57 $\pm$ 17.63 <sup>b</sup>	35.36 $\pm$ 18.30 <sup>b</sup>
<b>iii:</b> 40 minutos	36.43 $\pm$ 20.41 <sup>c</sup>	36.25 $\pm$ 18.14 <sup>d</sup>	32.68 $\pm$ 17.77 <sup>c</sup>
<b>iv:</b> 1 hora	35.18 $\pm$ 19.82 <sup>e</sup>	33.39 $\pm$ 16.05 <sup>e</sup>	33.93 $\pm$ 19.17 <sup>e</sup>
<b>v:</b> 2 horas	33.21 $\pm$ 18.92 <sup>f</sup>	31.25 $\pm$ 18.49 <sup>f</sup>	31.25 $\pm$ 19.51 <sup>f</sup>

*Tratamientos:* T1; T2 y T3.

*Etapas:* Ei; Eii; Eiii; Eiv y Ev

<sup>a</sup> Superíndice iguales indican que no existe diferencia significativa ( $p>0.05$ ).

<sup>c,d</sup> Superíndices diferentes indican que existe diferencia significativa ( $p<0.05$ )

<sup>a, b, c, e, f</sup> Superíndices diferentes indican que existe diferencia significativa ( $p<0.05$ )

La (tabla 3.11) muestra el porcentaje de la motilidad espermática post dilución de los tratamientos (T1: colagenasa al 5%; T2: pipeteo 10 veces y T3: incubación por 10 minutos), evaluados en diferentes tiempos: disuelto; 20min; 40min; 1hora y 2 horas respectivamente; en la cual en las dos primeras etapas y en las dos últimas etapas (i, ii y iv, v) de los tres tratamientos no existen una diferencia estadística ( $p>0.05$ ); pero en la etapa iii (40 minutos) del tratamiento T2: 36.25  $\pm$  18.14% existe una diferencia estadística ( $p<0.05$ ) sobre los T1: 36.43  $\pm$  20.41% y T3: 32.68  $\pm$  17.77%, a la vez existe una diferencia estadística ( $p<0.05$ ) entre etapas (Ei; Eii; Eiii; Eiv y Ev) evaluadas durante dos horas para cada tratamiento. No existen reportes similares utilizando tratamientos químicos, mecánicos y físicos en diferentes etapas del tiempo; pero hay reportes utilizando colagenasa, papaína y tripsina en concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0mg/ml, el efecto de colagenasa redujo la motilidad en tan solo 5 minutos en concentraciones altas de 2.0mg/ml en 1.4  $\pm$  0.6; 0.0  $\pm$  0.0; 0.0  $\pm$  0.0; 0.0  $\pm$  0.0% y 4.0mg/ml en 0.4  $\pm$  0.4; 0.0  $\pm$  0.0; 0.0  $\pm$  0.0; 0.0  $\pm$  0.0% evaluadas desde (5, 10, 20 y 40minutos) respectivamente, mientras las concentraciones bajas(0.5, 1.0mg/ml) redujo después de 10 minutos en 3.8  $\pm$  1.2; 0.6  $\pm$  0.6; 0.7  $\pm$  0.7 y 0.4  $\pm$  0.4%; además la papaína y tripsina redujo después de 20 minuto de evaluación en todas las

concentraciones (Morton y col., 2012). Respecto al uso de colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa y tripsina a 1mg/ml de concentración adicionado en la eyaculación, evaluadas en 0 min (tiempo de recogida de esperma), 2, 5 minutos en llamas y alpacas; donde la colagenasa afectó mínimamente en la motilidad normal (oscilatoria) en semen de alpacas 70% y llamas 80%, tampoco mostraron un movimiento progresivo incluso después de 5 minutos de adición de enzimas a la muestra, al igual las otras enzimas utilizadas (Bravo y col., 2000a), de la misma manera los reportes de (Bravo y col., 1996) y (Greer y col., 1968) en llamas, alpacas y monos de forma respectiva, observaron una mínima efecto sobre la motilidad. Al comparar con el presente trabajo, la colagenasa tuvo efecto adverso mínimo sobre la motilidad espermática, de una motilidad media de 52.50% en general al 33.21% dentro de 2 horas. En la presente investigación no se tomó en cuenta la motilidad progresiva. En relación al uso de T2: no hubo diferencia estadística ( $p>0.05$ ) con los demás tratamientos; al comparar un reporte usando 10 pasajes por una aguja n°18 con una jeringa de 5ml; luego sometieron a la centrifugación a 802r por 10 minutos en la cual la motilidad se redujo hasta  $46.11 \pm 20.76$  (Zirena, 2014), a diferencia de nuestro trabajo se evaluó durante 2h encontrando una motilidad de 31.25%.

T3: incubación por 10 minutos en 37°C, no hubo diferencia estadística ( $p>0.05$ ) con los demás tratamientos en todas las etapas en disuelto; 20; 40; 1h y 2h en  $35.54 \pm 19.31$ ;  $35.36 \pm 18.30$ ;  $32.68 \pm 17.77$ ;  $33.93 \pm 19.17$  y  $31.25 \pm 19.51$  correspondientemente. Aun no se ha encontrado estudios parecidas o iguales al tercer tratamiento con un efecto de incubación; pero hay reporte de (Giuliano y Casaretto, 2011) muestra una movilidad progresiva de 5.7% incubando a 37°C, con 4: 1 y 8: 1 en H-TAL-BSA por 4 y 8 minutos respectivamente, sin embargo no hay reportes sobre la motilidad masal o una motilidad media que deja un efecto durante el tiempo de estudio.

### 3.12. Evaluación de vitalidad espermática post dilución

**Tabla 3.12.** Vitalidad espermática post dilución de semen según tratamientos en cada etapa del tiempo (%)

Etapas	Tratamientos		
	Colagenasa al 5%	Pipeteo (10 veces)	Incubación (10 minutos)
	Promedio $\pm$ D.E. (%)		
<b>i:</b> Disuelto	72.61 $\pm$ 6.98 <sup>a</sup>	71.96 $\pm$ 10.16 <sup>a</sup>	72.21 $\pm$ 7.53 <sup>a</sup>
<b>ii:</b> 20 minutos	69.86 $\pm$ 8.17 <sup>b</sup>	69.00 $\pm$ 14.03 <sup>b</sup>	69.96 $\pm$ 14.17 <sup>b</sup>
<b>iii:</b> 40 minutos	71.25 $\pm$ 10.56 <sup>c</sup>	71.93 $\pm$ 10.73 <sup>c</sup>	69.29 $\pm$ 9.56 <sup>c</sup>
<b>iv:</b> 1 hora	69.64 $\pm$ 9.26 <sup>d</sup>	69.96 $\pm$ 9.27 <sup>d</sup>	70.32 $\pm$ 8.88 <sup>d</sup>
<b>v:</b> 2 horas	67.46 $\pm$ 10.91 <sup>e</sup>	69.07 $\pm$ 8.96 <sup>e</sup>	65.39 $\pm$ 11.59 <sup>e</sup>

*Tratamientos:* T1; T2 y T3.

*Etapas:* Ei; Eii; Eiii; Eiv y Ev

<sup>a</sup> Superíndice iguales indican que no existe diferencia significativa ( $p>0.05$ ).

<sup>a, b, c, d, e</sup> Superíndices diferentes indican que existe diferencia significativa ( $p<0.05$ ).

La (tabla 3.12) muestra el porcentaje de la vitalidad espermática post dilución divididos en tratamientos (T1: colagenasa al 5%; T2: pipeteo 10 veces y T3: incubación por 10 minutos), evaluadas en diferentes tiempos: disuelto; 20min; 40min; 1 hora y 2 horas, en la cual no existen una diferencia estadística ( $p>0.05$ ) entre tratamientos (T1, T2, T3) en cada etapa; pero existe diferencia estadística ( $p<0.05$ ) entre etapas (Ei; Eii; Eiii; Eiv y Ev) evaluadas durante dos horas para cada tratamiento. Un trabajo similar aún no se ha visto utilizar tratamientos químico, mecánico y físico en diferentes etapas del tiempo; pero hay reportes con el uso de colagenasa, fibrinolisina, hialuronidasa y tripsina en concentración 1mg/ml a la eyaculación, evaluadas en 0 min (tiempo de recogida de esperma), 2, 5 minutos en llamas y alpacas mantuvo en 80% y 90% respectivamente, donde el efecto de colagenasa fue menor sobre los espermatozoides vivos a comparación con fibrinolisina, hialuronidasa y tripsina, porcentaje de espermatozoides vivos fueron mínimamente afectados por la adición de enzimas (Bravo y col., 2000a), muy parecidos al presente trabajo que también los espermatozoides sufrieron mínimamente a la colagenasa durante 2h de evaluación, al igual a los reportes de (Bravo y col., 1998) y (Bravo y col., 1996) en alpacas y llamas, (Freund, 1969) evaluados en cobayas. En relación al (T2) pipeteo por 10 veces, no existen un diferencia estadística ( $p>0.05$ ) en etapas del tiempo (i, ii, iii, iv, v) por cada tratamiento; pero si hay

diferencias numéricas con mínimo efecto sobre la vitalidad espermática evaluadas durante 2h. A comparación al reporte de (Zirena, 2014) quien muestra el porcentaje de vitalidad de 61.47% con 10 pasajes por una aguja n°18 con una jeringa de 5ml; luego sometieron a la centrifugación a 802r por 10 minutos, con agitación manual encontró 62.87% de vitalidad (Zirena, 2014) inferior a nuestro trabajo, quizá porque trabajó con pocas muestras y porcentaje de vitalidad seminal media inferior al presente trabajo. Respecto al (T3) incubación por 10 minutos a 37°C, también no existe una diferencia estadística ( $p>0.05$ ) en las etapas (i, ii, iii, iv, v) de los tres tratamientos y con una influencia mínima numérica sobre la vitalidad espermática en alpacas. Sin haber otros estudios similares o iguales al método utilizado no se puede comparar al presente trabajo.

## CONCLUSIONES

1. El efecto de colagenasa al 5% fue eficiente en la disminución de filancia seminal en 86%, manteniendo una motilidad de 33.21% y 67.46% de vitalidad espermática del semen de alpacas (*Vicugna pacos*) dentro dos horas de evaluación.
2. El efecto del pipeteo 10 veces fue eficaz en la disminución de filancia seminal en 85%, manteniendo una motilidad de 31.25 % y 69.07 % de vitalidad espermática del semen de alpacas (*Vicugna pacos*) durante dos horas de evaluación.
3. El efecto de incubación por 10 minutos fue eficaz en disminuir la filancia seminal en 82%, manteniendo una motilidad de 31.25 % y 65.39 % de vitalidad espermática del semen de alpacas (*Vicugna pacos*) dentro dos horas de evaluación.



## **RECOMENDACIONES**

1. Continuar con el trabajo de investigación en crio preservar los espermatozoides tratados con los tres métodos (químico, mecánico, físico) y evaluar los parámetros seminales post criopreservación de semen de alpacas (*Vicugna pacos*).
2. Desarrollar la inseminación artificial en las alpacas receptoras con semen tratados de alpacas.
3. Realizar más trabajo de investigación con otros métodos para poder disminuir la filancia seminal sin que afecte la motilidad espermática.
4. Evaluar la significancia estadísticas entre etapas de evaluación de cada uno de los tratamientos del presente trabajo.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. 2005.** Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas y llamas. Biol. Reprod. Canadá. p: 452-457
- Aisen E., Medina V. y Venturino, A. 2002.** Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen in different trehalose concentrations. Theriogenology 57: 1801-1808.
- Alarcón, V., García, W. y Bravo, P. W. 2012.** Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, Lima, 23(1).
- Álvarez, J.G. y Storey, B.T. 1984.** Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. Biol Reprod; 30:833-841.
- Aller, J.F., Rebuffi, G.E., Cancino, A.K. y Alberio, R.H. 2003.** Influencia de la crio preservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch. Zootec. 52: 15-23.
- Amann, R. P. y Schanbacher, B.O. 1983.** Physiology of male reproduction. J. Anim.Sci., Vol 57, Suppl. 2: 380-403.
- Apaza, N., Sapaná, R., Huanca, T. y Huanca, W. 2001.** Inseminación artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. Rev. Invest. Vet. Perú. Suppl 1: 435-438
- Baca, L. 1998.** Evaluación del tiempo Óptimo de equilibrado con tres dilutores en el congelamiento del semen de alpacas. Tesis Ing. Zoot. UNSAAC. Cuzco-Perú Pag. 102.
- Banda, R.J. 2009.** Evaluación de los dilutores en base a Tris, Tes y Leche descremada en la crio preservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Bérgamo, N.S., Medina, V.H., Martínez, C.Y., Vagnoni, Y.C. y Aisen, E.G. 2012.** “Efecto de diferentes métodos de reducción de la filancia en el semen de *Lama glama*”. VI Congreso mundial de camélidos sudamericanos. Arica-Chile.116p.
- Bell, D.J. y Lake, P.E. 1962.** A comparison of phosphor mono esterase activities in the seminal plasmas of the domestic cock, turkey tom, boar, bull, buck, rabbit and man. J Reprod. Fertil. 3: 262-268.

- Benson, G.S. 1994.** Male sexual function: erection, emission, and ejaculation. Raven Press, New York. EE.UU; Pp.189-306.
- Bravo, P.W., Ordoñez, C., y Alarcón, V. 1996.** Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. Proc. 13th ICAR, Sydney, Australia 2, pp. 2±3.
- Bravo, P.W., Flores, D. y Ordoñez, C. 1997a.** Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. *Biology of reprod.* 57: 520-524.
- Bravo PW, Flores, U., Garnica. J. y Ordoñez C. 1997b.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626.
- Bravo, W., Pacheco, C., Quispe, L., Vilcapaza, L. y Ordoñez, C. 1999.** Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Arch. Of Androl.* Vol 43:239-246.
- Bravo, P. W., Skidmore, J. A. y Zhao, X. X. 2000a.** Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. *Animal Reproduction Science* 62. 173-193.
- Bravo, P.W., Ccallo M. y Garnica, J. 2000b.** The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. *Small Ruminant Res.*, 38, 91-95.
- Bravo, P.W., Alarcón, R. y Ordoñez, V. 2002.** Ejaculatory process and related semen characteristics. *Arch Andrology* 48: 65-72.
- Bravo, P. y Sumar, J. 1989.** Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Anim. Reprod. Sci.* 21: 271-281.
- Bravo, P.W. 1994.** Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *Vet. Clin. N. Am. Food A.* 10: 265-279.
- Bravo, P.W. 1995.** Physiology of reproduction and fertility evaluation in themale alpaca. *Proceedins of Post Gradúate Foundation in Veterinary Science of University of Sydney* 257: 61-66.
- Bravo, W. 1998.** Avances en la fisiología reproductiva del macho llama y alpaca, XXI Reunión científica anual APPA, Facultad MVZ UNA-Puno, Perú.
- Brooks, D.E. 1990.** Marshall's physiology of reproduction. En: Lamming GE, ed. *Biochemistry of the male accessory glands.* 4a ed. Edimburgo: Churchill Livingstone. p 569-690.
- Brown, B.W. 2000.** A reviewon reproduction in South American camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 58: 169-195.
- Bravo, W.P. 2002.** The reproductive process of South American camelids. Utah: Seagull Printing. 100p BUSTINZA, V. 2001. *La Alpaca*, Primera Edición, Editorial UNA-PUNO, Puno, Perú.

- Buendía, P. C., Soler, F., Paolicchi, G., Gago, B., Urquieta, F., Pérez-Sánchez, y E. Bustos-Obregón. 2002.** «Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer computer-assited system». *Theriogenology* 57: 1207-1218.
- Bustinza, V. 2001.** La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje. Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 343 p.
- Callo, M., Garnica, J. y Bravo, P.W. 1999,** Efecto de la fibrinolisis, hialuronidasa, colagenasa y tripsina sobre la viscosidad del semen en alpacas. Paper presented to Proceedings of the 2nd Congreso Mundial sobre Camelidos Cusco, Peru.
- Cárdenas, M., Vivanco, M. y Bravo, W. 1987.** Comparación de dos métodos de colección de semen en alpacas. X Reunión científica anual del APPA. UNA - PUNO Perú.
- Carpio, M.C., Ordóñez, V., Alarcón y W. Bravo. 1999.** presencia de espermatozoides, niveles de testosterona y tamaño testicular en alpacas, II Congreso Mundial sobre Camélidos Sudamericanos, Cusco - Perú.
- Cavalcanti, G. 2013.** "Efecto de la administración de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) en la calidad seminal de alpacas (*Vicugna pacos*), CJP -Quimsachata- Puno 2012" Tesis Med. Vet. UNSCH.
- Cohen, J. y Aafjes, J.H. 1982.** Proteolytic enzymes stimulate human spermatozoal motility and *in vitro* hamster egg penetration', *Life Sci* vol. 30, pp. 899.
- Copa, S., Gonzales, V. y Maceda, E. 2003.** Técnica de bulbouretrectomía en llamas machos. III Congreso mundial de camélidos. Potosí Bolivia
- Chahuayo, C. y Paytán, I. 2013** "Influencia de los dilutores tris, sp·talp y andromed sobre la viabilidad de espermatozoides epididimarios refrigerados de alpacas (*lama pacos*) Huancavelica". Tesis Ig. Zootec. UNH.
- Chenoweth, P. 1997.** Clinical reproductive anatomy and physiology of the bull. En: Youngquist: Current therapy in large animal theriogenology. Saunders, 1a Edición, pag. 217.
- C. Olaguivel, M. Naveros. 2014.** "Efecto de la enzima colagenasa en la congelación de semen en alpacas (*Vicugna pacos*)". Revista científica Spermova. 4(1): 64p.
- Dávalos, R. y Olazabal, J. 2002.** Evaluación de dos Formas de Colección de Semen en Alpacas. *Rev Inv Vet Perú*: 13 (2): 98-99.

- Delgado, P., Flores F., Fernández, R., Gonzales, V., Maceda, E., Copa, S. y Medina J., 2003.** Técnicas de colección de semen en llamas. I Congreso mundial de camélidos. Potosí Bolivia.
- Delgado, P.A. y Choque, E. 2015.** Efecto de dos dilutores y cinco concentraciones de extracto de piña (*Ananas comosus*) sobre la filancia y las características microscópicas del semen de llamas (*Lama glama*). El Alto. Bolivia.
- De Lamo, D. 2011.** Camélidos sudamericanos. Historia, usos y sanidad animal. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Servicio Nacional de Sanidad y calidad agroalimentaria. SENASA.
- Demianowicz, W. y Strezek, J. 1996.** The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod Domest Anim* 31: 279-280.
- Elwishy, A.B. 1988.** Reproduction in the male Dromedary (*Camelus dromedarius*): a review. *Anim. Reprod. Sci.* 17: 217-241.
- England, B.G., Foote, W.C., Cardoza, A.G., Matthews, D.H. y Riera S. 1971.** Oestrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). *J. Endocrinol.* 45: 505-513.
- Ekstedt L., Soderquis L. y Ploen L. 1986.** Fine structure of spermatogenesis and sertoly cells (*Epiteliocytus sustentans*) in the bull. *Anat. Histol. Embryol.* 15: 23-48.
- Fernández-Baca, S. y Calderón, W. 1965.** Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev Fac Med Vet Perú.* 18-19-20: 13-17.
- Fernández-Baca, S. y Calderón, M. 1966.** métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM.* Vol. 18-20: 13-26.
- Fernández Baca, S 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.
- Fernández-Baca S, Sumar J, Novoa C. 1972.** Comportamiento de la alpaca macho frente a la renovación de las hembras. *Rev. Inv. Pec. IVITA – UNMSM* 1: 115-128.
- Fernández, R., Copa, S. y Guzmán, L. 2003.** Efecto de la edad y periodicidad de colección sobre las características macro y microscópicas del semen de llama. III Congreso mundial de camélidos. Potosí Bolivia

- Fernandez-Baca S. 1993.** Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 33: 307-323.
- Foote RH, Brockett CC, Kaproth MT. 2002.** Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 71: 13-23.
- Fowler ME. 1998.** *Medicine and surgery of South American camelids: llama, alpaca, vicuña, guanaco.* 2a ed. Iowa: Blackwell publishing. 564 p.
- Flores, P., Garcia-Huidobro J., Munoz C. B., Bustos-Obregon E. y Urquieta B. A. 2002.** Alpaca semen characteristics previous to a mating period *Animal Reproduction Science* 72: 259-266.
- Franco, E., Sumar, J. y Varela M. 1981.** Eyaculación en la alpaca (*Lama pacos*). IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas: Corporación Nacional Forestal, Instituto de la Patagonia, Chile.
- Freund, M. 1969.** Interrelationships among the characteristics of guinea-pig semen collected by electroejaculation. *J. Reprod. Fertil.* 19, 393±403.
- Galindo, W. 1995.** Efecto de eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nacional del Altiplano.
- Galloway, D. B. 2000.** The development of the testicles in alpaca in Australia. En: *Proceedings of the Australian Alpaca Association Conference.* Canberra.
- Garcés, J. 2017.** “Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas de semen fresco de alpacas en la estación experimental Aña Moyocancha con la aplicación de oligoelementos”. 2017. Tesis Ing. Zootecnista. - Ecuador.
- Garner, D. L. y Hafez ESE. 2002.** Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E. S. E., Hafez B., eds. *Reproducción e inseminación artificial en animales.* 7a ed. México: McGraw Hill Interamericana. p. 98-112.
- Garnica J, Achata R, Bravo, P. W. 1993.** Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim. Reprod. Sci.* 32: 85-90.
- Garnica, J., Flores, E. y Bravo, P. W. 1995.** Citric acid and fructose concentrations in seminal plasma of the alpaca. *Small Rumin. Res.* 18: 95-98.
- Garnica, J. 2003.** Physical and biochemical characteristics of alpaca semen *Anim. Reprod. Sci.* pp. 85-90.
- Garner, D. L, Hafez, E.S.E. 2002.** Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E. S.E., Hafez B., eds. *Reproducción e inseminación artificial en animales.* 7a ed. México: McGraw Hill Interamericana. p. 98-112.

- Gilbert, S. F. 2005.** Biología del desarrollo. Ed Médica Panamericana. 882pp.
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V. y Miragaya, M. 2006.** 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.
- Giuliano, S. M, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2008.** Collectionmethod, season and individual variationon seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). Anim. Reprod. Sci. 104 (N° 2): 359-369.
- Giuliano, S., Carretero, I., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M., Miragaya, M. 2010.** Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Ani. Reprod. Science* 118: 98-102.
- Giuliano y Casaretto. 2011.** Uso de colagenasa mejora las características seminales de llama (*Lama glama*). Revista científica Spermova. 1(1): 64-65.
- Giuliano S. M. 2012.** Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericano. Spermova 2(1): 6 – 9.
- Greer, W.E., Roussel, J.D., Austin, C.R., 1968.** Prevention of coagulation in monkey semen by surgery. J. Reprod. Fertil. 15, 153±155.
- Godoy, D. 2014.** Caracterización físico-química y parámetros de calidad seminal del semen de llama colectado mediante vagina artificial. Memoria de título, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia-Chile.
- Gómez, M.; Girela, J.; Fernández, P. y Romeo, A. 2005.** Estudio de las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos con microscopia electrónica de barrido (sem). Rev. Iberoam. Fertil. Reprod. Hum., 22 (1): 59-66.
- Gonzalez, D. ; Quintero-Moreno, A. ; Palomares, R. ; Rojas, N. ; Araujo, O. ; Soto, G., 2003.** Use of *Gliricidia sepium* in feed supplementation of crossbred heifers and its effect on growth and the onset of puberty. Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, 13 (1): 45-52.
- Graham, J. K., Kunze E., Hammersted R.H. 1990.** Analysis of sperm cell viability acrosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry. Biol Reprod. 43:55-64.
- Griswold, M. 1995.** Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. Biol. Reprod. 52: 211-216.

- Hafez, C. 1989.** Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5ta Ed. Interamericana McGrawHill. México 694 pp.
- Hafez, E.S.E., 2000.** Reproducción e Inseminación Artificial en Animales, Traducido por: Roberto Palacios Martínez, Sexta Edición, Editorial Interamericana - Mc Graw - Hill, México.
- Hafez, E.S.E., Hafez, B. 2002.** Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. McGrawhill. Pp.199-215.
- Hafez, B. 2002.** Reproducción e inseminación artificial. (7ª ed). Carolina del Sur: Interamericana. p. 519.
- Hoffmann, W.E, Kramer J, Main, A.R, Loch W.F. y Quimby, F.W. 1989.** The clinical chemistry of laboratory animals. New York: Pergamon Press. P. 237-278.
- Hu Jh, Qw. Li, Ls. Zan, Zl. Jiang, Jh. An, Lq. Wang, y Yh. Jia. 2010.** The cryoprotective effect of low-density lipoproteins en extenders on bull spermatozoa following freezing-tawing. Anim Reprod Sci; 117:11-17.
- Huanca W, Adams, G.P. 2007.** Semen collection and artificial insemination in llamas and alpacas. En: Youngquist R, Threlfall W. Current therapy in large animal theriogenology. 2º Edición: Saunders – Elsevier Inc. P. 869-873.
- Huanca T., Mamani R. H., Naveros M. L., Pacheco J. y Condori N. 2011.** Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos*) Spermova 1(1): pp 98-100.
- Illera M. 1994.** Reproducción de los animales domésticos. 1a ed. España: Aedos.
- Jara, 2000.** Centro de Inseminación Artificial de la Universidad Austral de Chile, tercer curso Internacional sobre producción animal, Universitaria, Chile.
- Jonson M. y Everitt, B. 1980.** Essential reproduction. Blackwell Scientific Publications, 1 an Edición, pag 33.
- King, G.J. y Macpherson, J.W. 2005.** Alkaline and Acid Phosphatase Activity, pH and Osmotic Pressure of Boar Semen, 2005, Can. J. Comp.Med. Vet. Sci., 30: 304-307.
- Knobil y Neill S. 2006.** Phisiolgy of reproduction. In Vol. 1 Male reproductive system. Third ed. Elsevier Inc.
- Kubiceck, J. 1974.** sanementnahme beim alpaka durch eine harnrihrenfistel. Z Tierzuechtung Zuechtungsbiologe 90:335.



- Lamia A, Daniel T, Laë titia J, Chantal T, Olivier G, Jean LC, Marc A. 2004.** Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl 1, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology* 61: 895-907.
- Leyva, V., Sumar, J., Franco, E., 1984.** Estudio preliminar de la concentración de espermatozoides de semen de alpaca obtenido con vagina artificial (Preliminary study of alpaca semen concentration obtained with artificial vagina). 3ra. Reunión anual de la Asociación peruana de Producción Animal, Lima.
- Leyva J. 1981.** Ejaculatory pattern of llamas during copulation. *Theriogenology* .pp:285-291.)
- Losno, W. y J. Coyotupa, 1981.** Testosterona sérica en alpacas machos pre púberes, Resúmenes compendiados de los proyectos de investigación realizados por la UNMSM, Periodo 1975 - 1979, Tomo II, Lima, Perú, pp 116.
- Lubos, H. 1983.** Bases de la reproducción bovina, Primera Edición, Editorial Diana, México.
- Maddocks S., Kern S., Setchell B. 1995.** Investigating local regulation of the testes of ruminants. *J. Reprod. And Fertil.* 49: 309-319.
- Maldjiana A; Pizzic, F.; Gliozzic, T; Cerolinib, S.; Pennya, P.; Noblea,R. 2005.** Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen *Theriogenology* 63, 411-421.
- Mann, T., y C. Lutwak-Mann. 1981.** «Male reproductive function and semen». En *Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*, 495. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- Mann, T. 1954.** The Biochemistry of Semen. Methuen and Co Ltd, London.
- Mardonez, J.E. 1, Delgado, P.A. 2012.** “efecto de seis enzimas sintéticas y naturales sobre las características macro - microscópicas en semen de llama (*Lama glama*)”. VI Congreso mundial de camélidos sudamericanos. Arica-Chile. 146p.
- Marín, J.C., B. Zapata, B.A. González, C. Bonacic, J.C. Wheeler, C. Casey, M.W. Bruford, R.E. Palma, E. Poulin, M.A. Alliende y A.E. Spotorno. 2007.** «Sistemática, taxonomía y domesticación de alpacas y llamas: nueva evidencia cromosómica y molecular». *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 121-140.

- Martin I.C.A. 1998.** The principles and practice of electroejaculation of mammals. *Symposium of the Zoological Society of London*. pp:127-152
- Maxwell Wmc, Sp. D.E. Graaf, Re-H. Ghaoui, and G. Evans. 2007.** Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64, 13–38.
- Maxwell W. and L. Johnson. 1999.** Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52, 1353–1362.
- Medina G. y Bautista J. L. 2012.** Calidad de semen por edad fisiológica de la alpaca resúmenes y trabajos VI congreso mundial de camélidos sudamericanos arica-chile.pg 60.
- Mellisho E. 2010.** Manual de Laboratorio de Reproducción animal. UNALM. Perú.
- Mendeluk, G., González F., F.L., Castello, P., Bregni, C. 2000.** Factors involved in the biochemical etiology of human seminal plasma hyperviscosity. *J. of Androl.* 21: 262-267.
- Mendoza, E. 2015.** "Evaluación de dos protocolos para la congelación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*)". 2013. Tesis Med. Vet. UNSCH. Ayacucho-Perú.
- Meza D. 2011.** Efecto de dos dilutores en la refrigeración de semen de alpaca (*Vicugna pacos*)" en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata – INJEA - distrito de Santa Lucia-Puno a 4,200 msnm.2008. Tesis Med. Vet. UNSCH.
- Mogrovejo D. 1952.** Estudios del semen de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 21 p.
- Montalvo C, Cevallos E, Copaira M. 1979.** Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. Res Proyectos de Investigación. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima: 37.
- Mortimer, D 1994,** Practical Laboratory Andrology. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Morton, K. M., Vaughan, J.L. y Maxwell, W.M.C. 2008.** Continued development of artificial insemination technology in alpacas. RIRDC Publication 08/057.
- Morton K.M., Z. Gibb, T. Leahy, W.M.C. Maxwell. 2012.** Effect of enzyme treatment and mechanical removal of alpaca (*Vicugna pacos*) seminal plasma on sperm functional integrity. *Journal of Camelid Science.* 5:62-81.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. 2002.** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.

- Muñoz-Blanco et al. 2008.** Comparación y evaluación del plasma seminal de alpaca, llama y toro. Quinsachata-INIA. Puno – Perú.
- Mc Donald 1991.** Endocrinología veterinaria y reproducción. Edit Interamericana, México. Cuarta Edición.
- McDonnell S.M. 1992.** Ejaculation: physiology and dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. pp: 57-70.
- Nabiev, D., Gilles, M., &Mahabir, E. 2003:** Comparison of AndroMed® and tris-egg yolk extender bovine post-thaw sperm function parameters and in vitro fertility. *Theriogenology*.p. 226.
- Naveros M. L. y Contreras M. 2014.** Evaluación de dos dilutores comerciales en la congelación de semen con fines de inseminación artificial en alpacas (*Vicugna pacos*). Memorias de la XXXVII reunión científica anual de producción animal, Apurímac - Perú. Pág. 244
- Novoa C, Leyva V. 1996.** Reproducción en alpacas y llamas. Publicación científica IVITA- UNMSM 26: 32.
- Novoa C. 1970.** Reproduction in camelidae. *J. Reprod. Fertil.* 22: 3-20.
- Núñez, M.E., Genovese P, Cordero A, Picabea N, Cárdenas O. y Huanca W. 2007.** Desarrollo heterogéneo, alternante y altamente ordenado en los túbulos seminíferos de la alpaca adulta (*Vicugna pacos*): resultados preliminares. ALPA. Cuzco, Perú.
- Pacheco, M., 1996.** Efecto de la tripsina y colagenasa sobre el acrosoma del espermatozoide y su relación con la fertilidad del semen de alpaca, Tesis FMVZ UCSM, Arequipa - Perú.
- Paricahua, E. 2001.** Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- Pérez y Pérez, F, 1990.** Reproducción Animal, Inseminación Artificial y trasplante de embriones. 1ra edición, España.
- Pérez, G. 1997.** Avances en la Inseminación artificial en Camélidos. La Técnica Completa, II Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos, Córdoba Argentina, pp. 97 -107.
- Pineda E; Pinilla S. M. 2007.** Comparación de dos diluyentes (lactosa-glicerol-yema de huevo; inra-dformamida-yema de huevo) en preservación de semen; trabajo para optar al título de médico veterinario; Universidad de la Salle Facultad de Medicina Veterinaria Bogotá D.C; pág. 19.

- Quintano, J. 2002.** Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpacas (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores, Tesis de la FMVZ UNA, Puno - Perú.
- Quispe, F. 1987.** Evaluación de las características físicas del semen de alpaca durante la época de empadre, Tesis de la FMVZ- UNA, Puno - Perú.
- Raymundo F, Huanca W, Huertas S, Gaulty M. 2000.** Influence of different extender son themotility in alpaca (*Lama pacos*) semen. En: 2<sup>nd</sup> Int camelid conference agroeconomics of camelfarming Almaty. Kazakhstan.
- Raymundo F.; Wilfredo Huanca L.; Teodosio Huanca M.; Sandra Huerta O. y Aída Cordero, R. 2000.** Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. RevInvVetPerú. 128-129p.
- 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.
- Robert M., Gagnon C., 1999.** Semenogelina I: un coágulo formando, multifuncional proteína de la vesícula seminal. Célula. Mol. Life Sci., 55, 944-960.
- Rodríguez, C. 2009.** Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Mag. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Pag. 72.
- Salisbury, G., Vandemark, N. y Lodge. J. 1978.** Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. Acribia. Zaragoza España. 832 p.
- Salamon S, Maxwell W. 2000.** Storage of ram semen. Anim Reprod Sci 62: 77-111.
- Sandoval, M. R. 2005.** Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeables y no permeables Tesis de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Santiani A., Huanca W., Sapana R., Huanca T., Sepulveda N. y Sanchez R. 2005.** Effects of the quality of frozenthawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. Asian J. Androl. 7(3):303-309.
- San Martin, F. 1961.** Fisiología de la reproducción de la alpaca. An. Symp. Sobre problemas ganaderos. Lima Perú.
- Sato, A. y C. Montoya. 1990.** Aparato Reprodutor de la Alpaca (*Lama pacos*) Anatomía Macroscópica, Revista de Camélidos Sudamericanos, N°07 IVITA, CICCOS, UNMS, Lima - Perú.
- Senamhi, 2013:** <http://www.senamhi.gob.pe/site/tesis/>.

- Sisson S. -1975.** Ruminant urogenital system. En: Sisson y Grossman's: The anatomy of the domestic animals. Saunders, 5a Edición, Vol.1.
- Skidmore J. A., Billah M., Short L. V. y Allen W. R. 2004.** Hibridization of new world and old world camelids (camelus dromedaries and *Lama glama* x *Lama glama* and *Lama guanicoe*) Workshop communications, 15th. ICAR Porto Seguro- Brazil. Pp 26-27.
- Solís R. 1997.** Producción de camélidos sudamericanos: Estudio zootécnico de la alpaca. Imprenta Ríos. Huancayo. p. 253-255.
- Sucapuca, V., 1991** Características físicas del semen de la alpaca obtenido por el método del preservativo. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- 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.
- Sumar, J. 1983.** Studies on reproductive pathology in alpacas. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. 115 p. 104.
- Sumar J. 1991.** Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago: Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe.
- Sumar J. 1996.** Reproduction in llamas y alpacas. Anim. Reprod. Sci. 42: 405-415.
- Sumar J. 1997.** Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. En: Avances en reproducción de rumiantes. I Symposium Internacional. APPA-Perú: 45-56.
- Sumar J. 2002.** Llamas y alpacas. En: Hafez ESE, Hafez B. eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. (7ª.ed). México: McGraw Hill Interamericana. pp. 224- 242.
- Smith, C. L., Peter, A. T., Pugh, D.G., 1994.** Reproduction in llamas and alpacas: a review. Theriogenology 41: 573-592.
- Sutovsky P, Manandhar G. 2006.** Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En: J. De Jonge C., Barratt L. R. C., Eds. The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration. Estados Unidos. Cambridge University Press. p. 1-30.
- Tibary A y Anouassi A. 1997.** Theriogenology in camelidae. Abu DhabiPrinting, Mina, Abu Dhavi, UAE.
- Tibary A, Memon, M. A. 1999.** Reproduction in themale South American Camelidae. J. CamelPrac. Res. 6: 235-248.

- Tibary A, Vaughan J. 2006.** Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Rumin. Res.* 61: 283-298.
- Tibary, J. 2006.** Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: a review and clinical observations. *Small Rumin. Res.* pp. 283-298.
- Turín J, Madrid N, Aranguren JA, Limache T, Huanca W. 2013.** Efecto de la remoción del plasma seminal y centrifugación sobre la calidad de los espermatozoides descongelados de alpacas (*Lama pacos*). Memorias de la XXXVI Reunión científica anual de la Asociación Peruana de Producción Animal.
- Uchijima Y, Yoshida K, Hiraga S. 1986.** Studies on gammaglutamyltranspeptidase (gamma-GTP) in seminal plasma. *Acta Urologica Japonica* 32: 553-9.
- Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. 2003.** Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). Rural Industries Research and Development Corporation, Kingston, ACT, Australia.
- Velasquez, C.V. y Novoa, M. C. 1999.** Superovulación con PMSG aplicada fase folicular y fase luteal en alpacas. *Rev. Int. Vet. Peru* 10: 1-8.
- Villanueva M.1, Willian F. Huanca M.1, Fred Hilari O.1, Melania Uchuari P.1, Francisco Rodríguez G.2, Wilfredo Huanca L. 2018.** “Efecto de la estación sobre las características seminales de alpacas (*Vicugna pacos*) criadas a nivel del mar” *Rev Inv Vet Perú.* 29(2): 559-564
- Von Baer, L and Hellemann, C 1998.** Semen characteristics in the llama (*Lama glama*). [Spanish] Variables seminales en llama (*Lama glama*)', *Arch. Med. Vet.* vol. 30, pp. 171-176.
- Von Baer L, Hellemann C. 1999.** Cryopreservation of llama (*Lama glama*) semen. *Reprod. Domest. Anim.* 34: 95-96.
- Von Kubineck J. 1974.** Samenentnahme bei Alpakadurchein Harnohrenfistel. *Z. Tierzucht* 90: 335.
- Watson P.F. 1978.** A review of techniques of semen collection in mammals. *Symposium of the Zoological Society of London.* pp: 97-126.
- Waberski D., Weitze K. F., Rath D. y Sallmann H. P. 1989.** Wirkung von bovinem Serumalbumin und Zwitterionenpuffer auf flüssigkonservierten Ebersamen. *Zuchthygiene* 24,126-133.

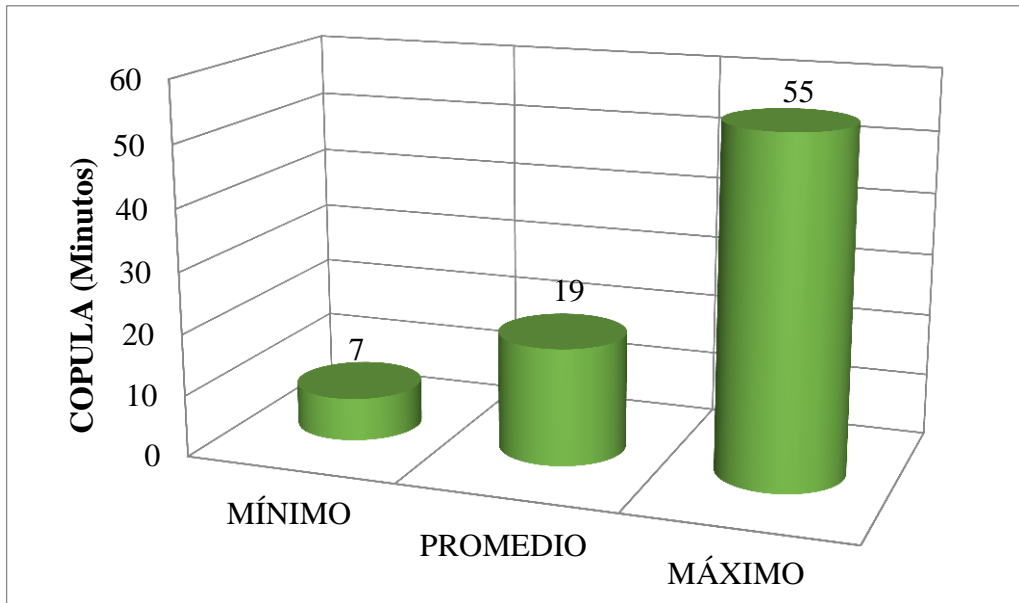
- Wheeler, J C. 1995.** «Evolution and present situation of the South American Camelidae». *Biological Journal of the Linnean Society* 54: 271-295.
- Wheeler J., Kadwell M., Fernández M., Stanley H. F. Baldi R., Rosadio R. y Bruford M.W. 2001.** «Genetic analysis reveals the wild ancestors of the llama and the alpaca». *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268 (1485): pp. 2575–2584.
- Wrobel K., Dellmann 1993.** Sistema reproductor masculino. En *Histología Veterinaria* de D. Dellmann. 2da Ed. Acribia. Zaragoza. 245-257.
- Youngquist R. and W. Threlfall, 2007.** Current therapy in large animal theriogenology: in *Reproductive Anatomy and Life Cycle of the Male and Female Llama and Alpaca*. 2th ed. by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
- Zalata A, Hafez T, Mahmoud A. 1995.** Relationship between resazurin reduction test, reactive oxygen species generation, and  $\gamma$ -glutamyltransferase. *Hum. Reprod.* 10:1136-40.
- Zirena, N. 2014** “Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación” Facultad de Medicina Veterinaria. 2013. Tesis Med. Vet. UNMSM. Lima-Perú

# ANEXOS

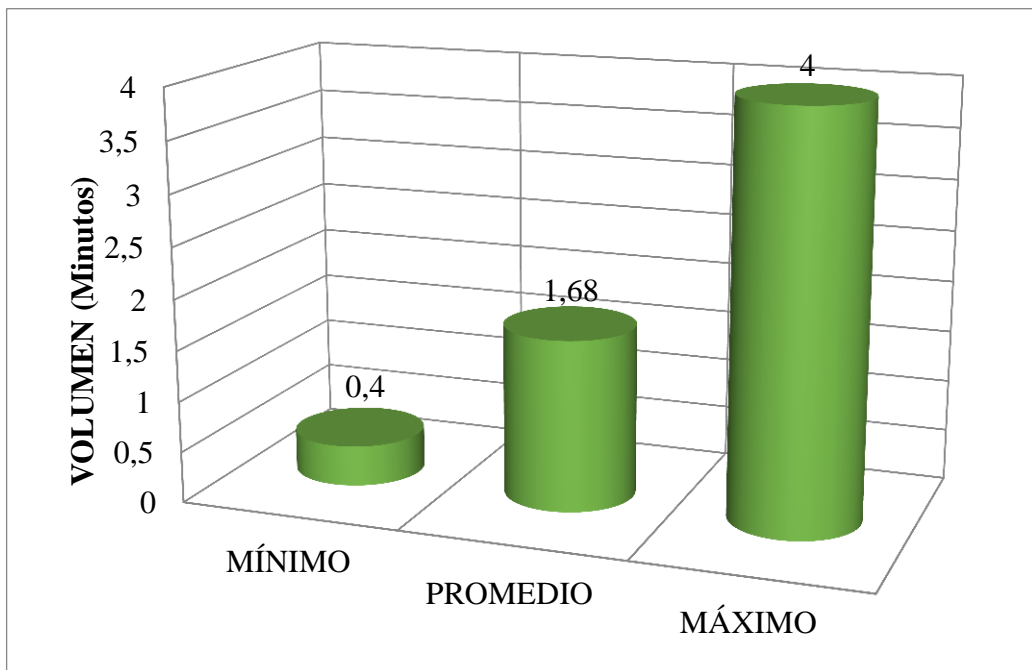


**Anexo 01.**

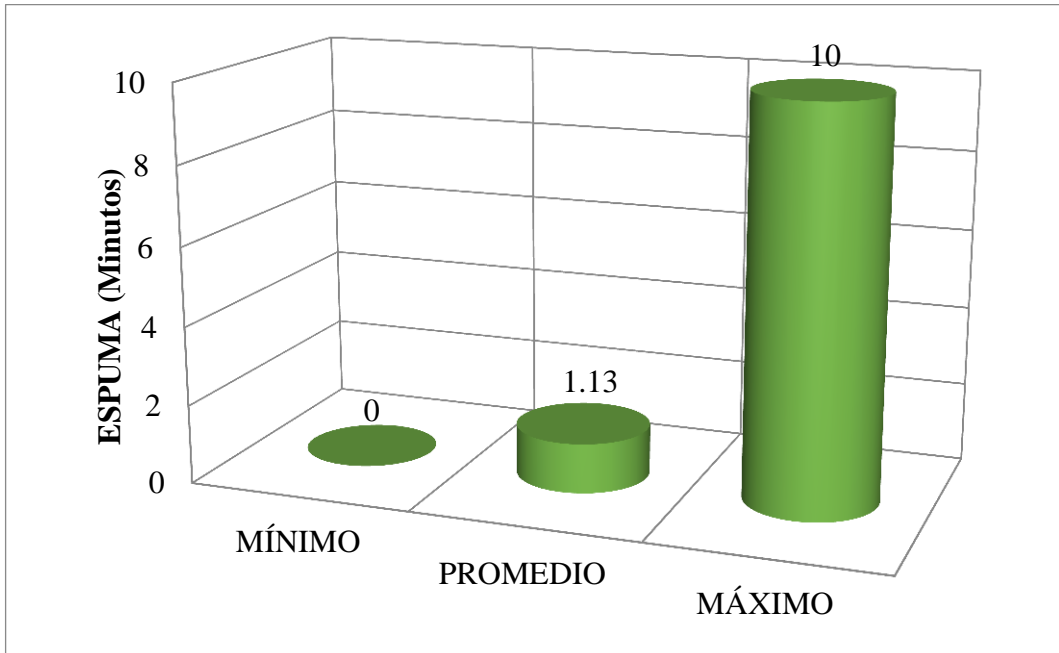
**Resultados de la investigación**



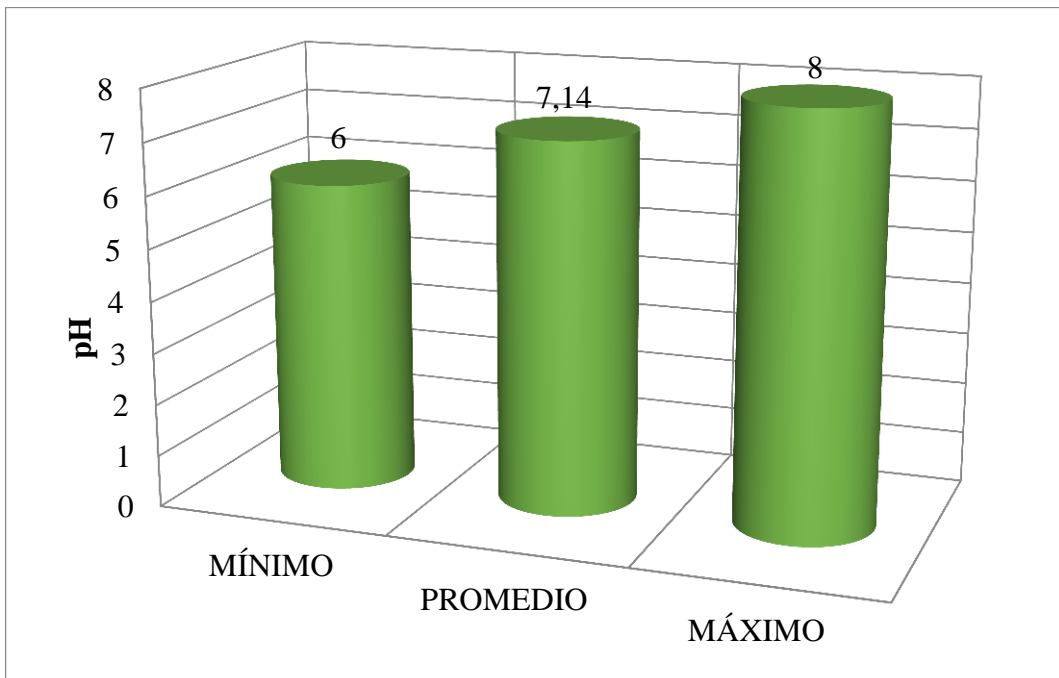
**Figura 01:** Tiempo de copula en minutos.



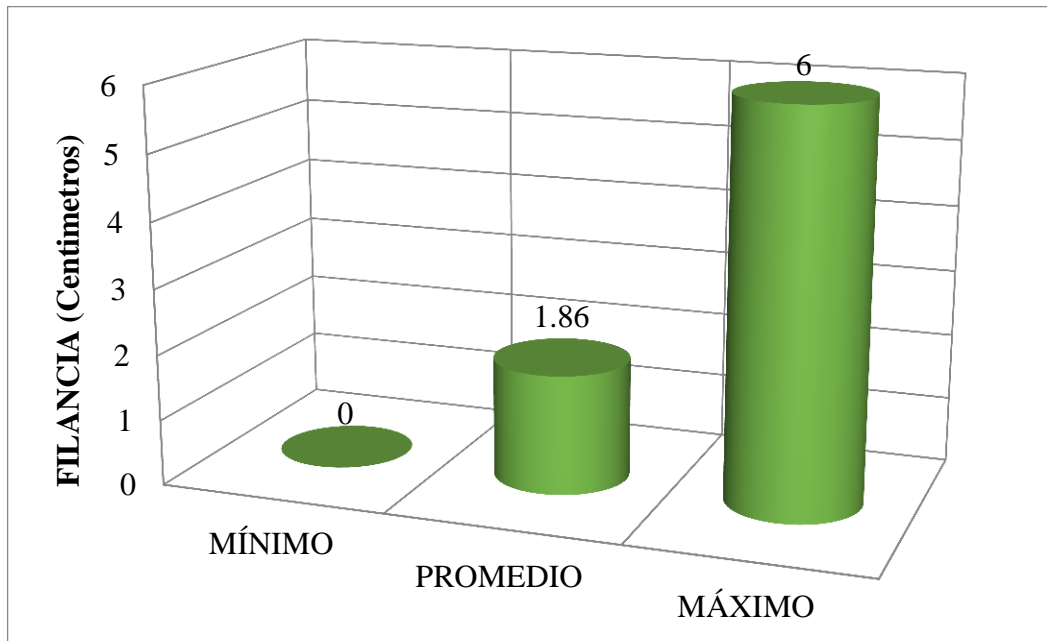
**Figura 02:** Volumen de semen fresco en ml.



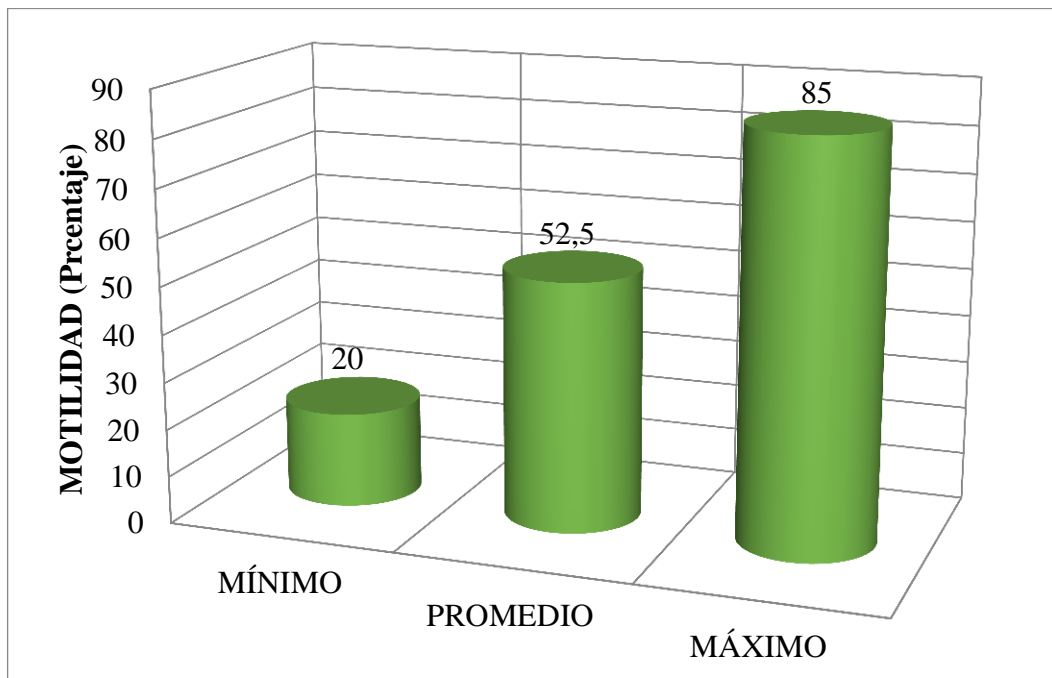
**Figura 03:** Volumen de espuma semen fresco en ml.



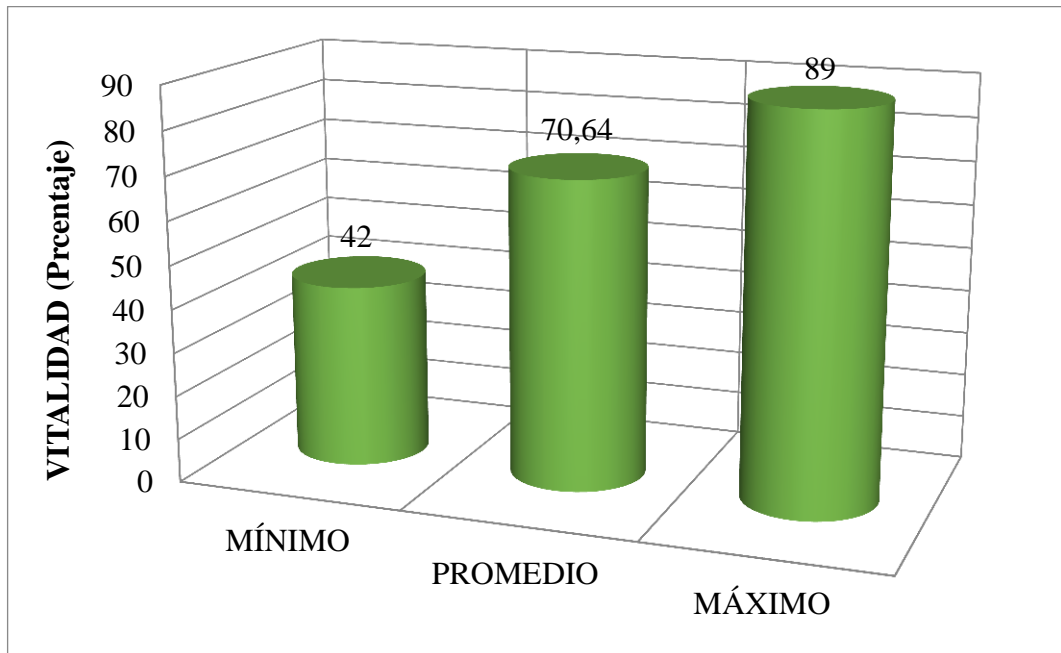
**Figura 04:** pH en semen fresco.



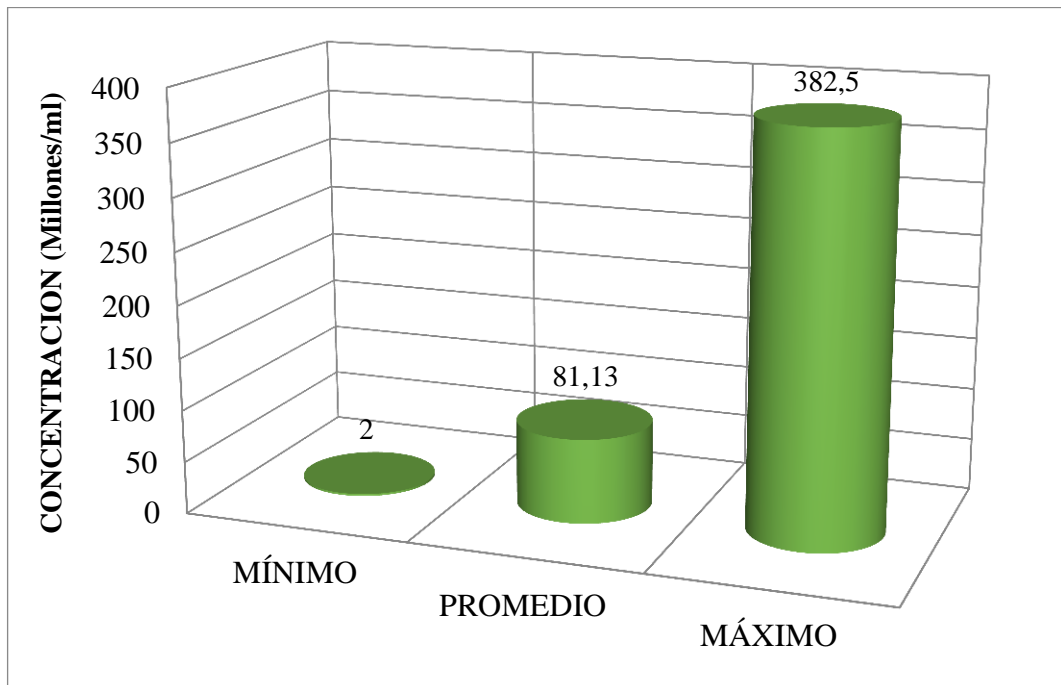
**Figura 05:** Filancia seminal de semen fresco en cm.



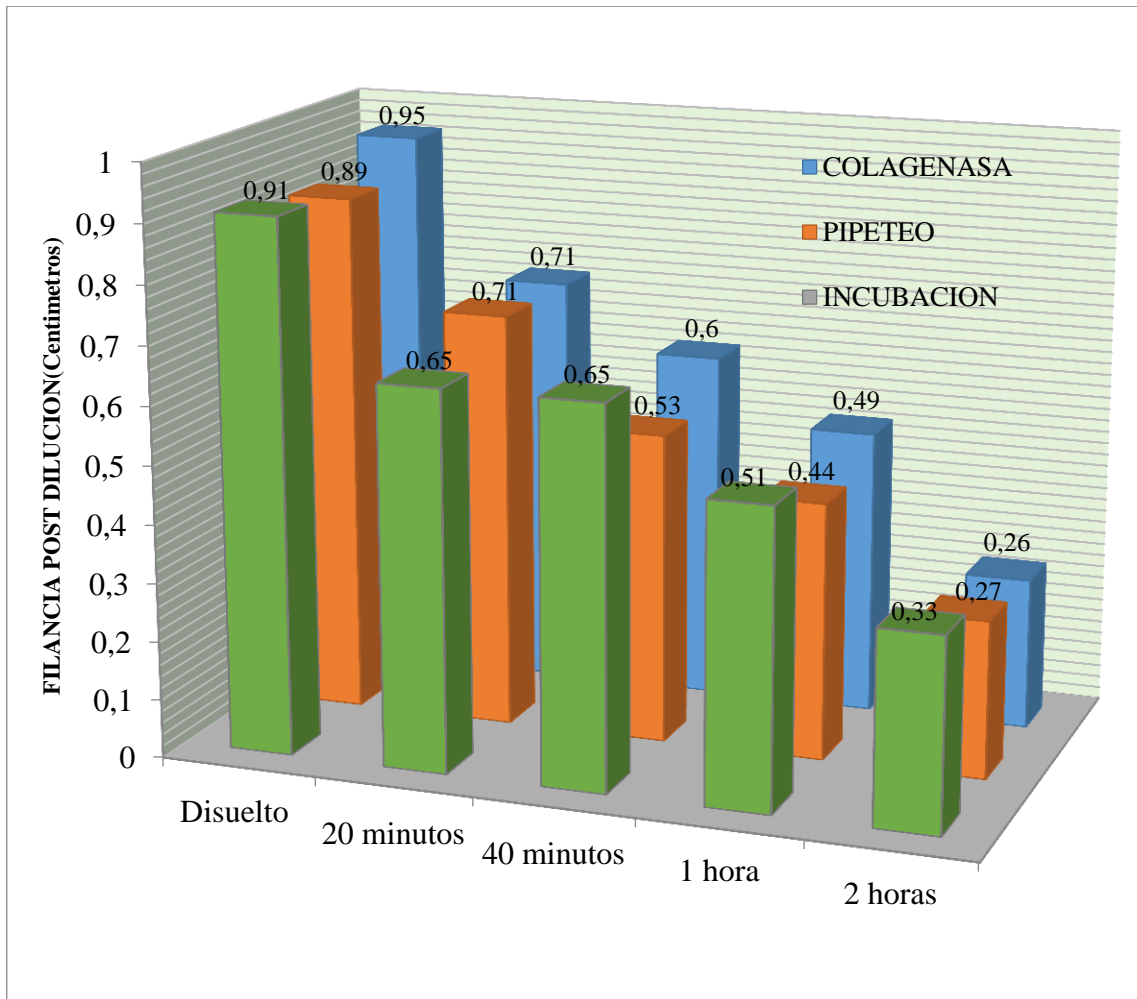
**Figura 06:** Motilidad espermática de semen fresco en %.



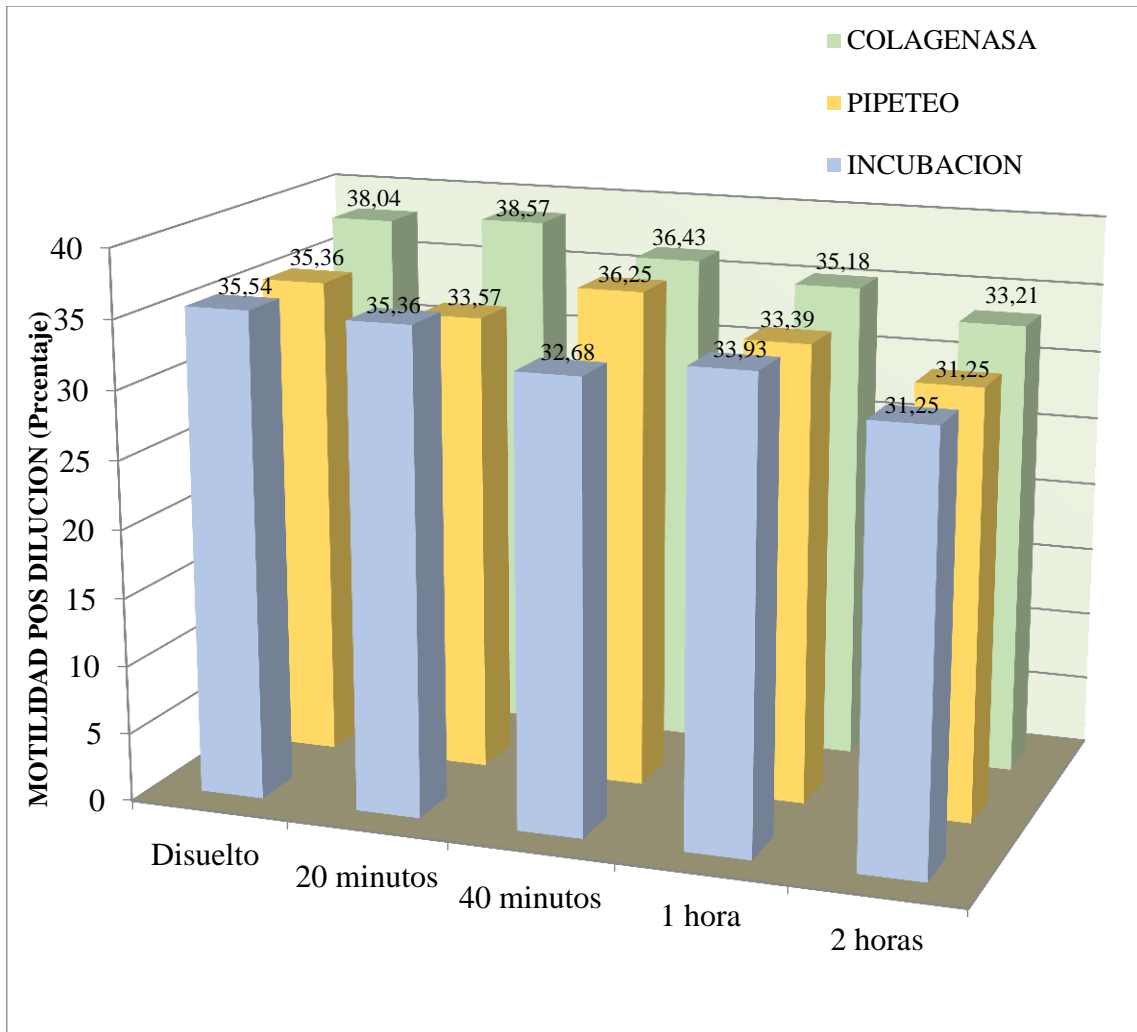
**Figura 07:** Vitalidad espermática de semen fresco en %.



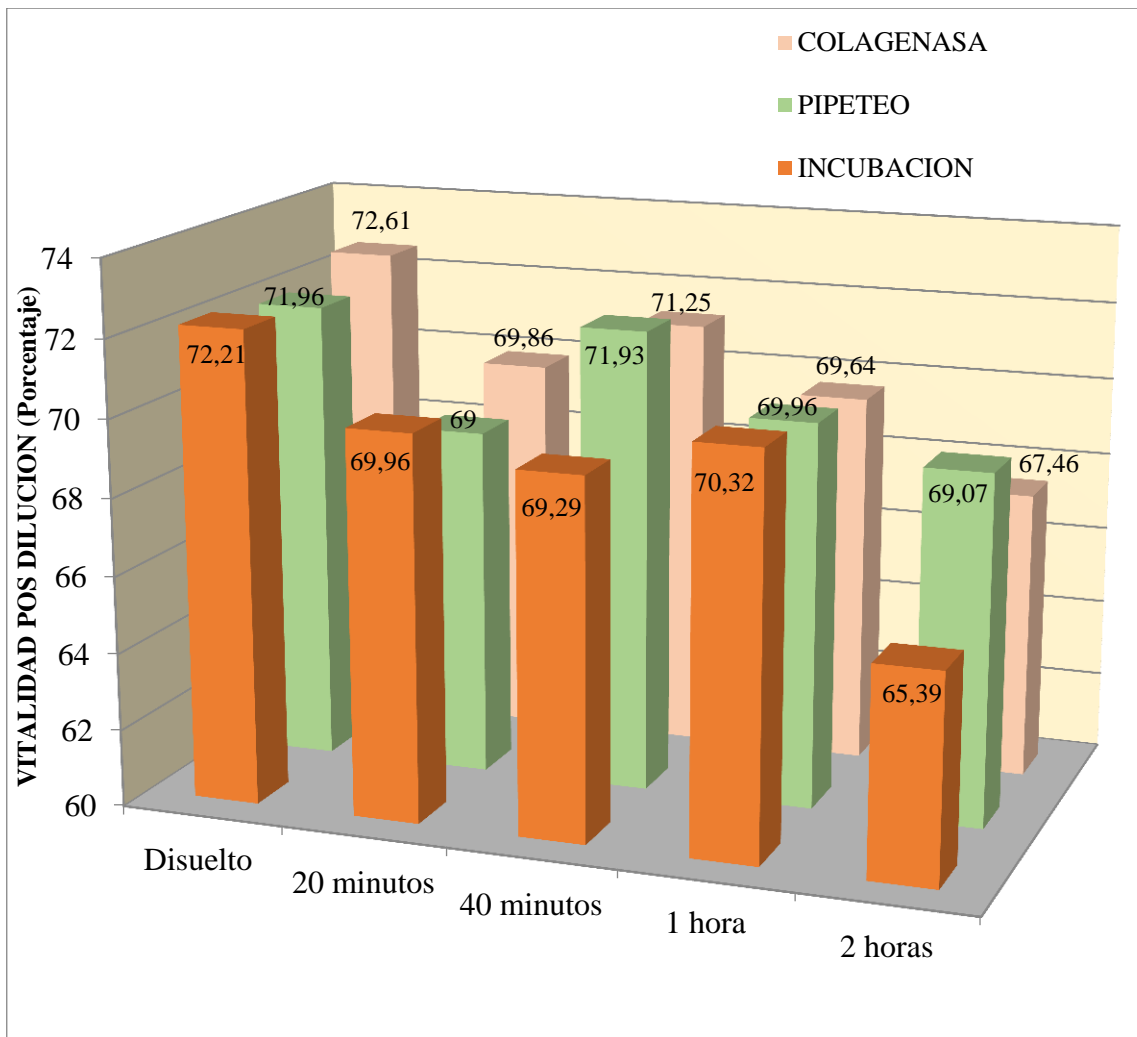
**Figura 08:** Concentración espermática de semen fresco en mill/ml.



**Figura 09:** Filancia post dilución de semen según tratamientos en cada etapa del tiempo (cm).



**Figura 10:** Motilidad espermática post dilución de semen según tratamientos en cada etapa del tiempo (%).



**Figura 11:** Vitalidad espermática post dilución de semen según tratamientos en cada etapa del tiempo (%).

## Anexo 2.

### Datos estadísticos

**Tabla 13.** Resultados de colección y evaluación en semen fresco de alpacas.

DATOS GENERALES			DATOS DE COLECCIÓN						EVALUACION MACROSCÓPICA				EVALUACIÓN MICROSCÓPICA		
N°	Fecha	N° Arete	Temperatura inicio (°C)	Temperatura final (°C)	Descenso temperatura (min)	Hora de inicio	Hora final	Tiempo Copula (min)	Volumen (ml)	Espuma (ml)	Filancia (cm)	pH	Motilidad (%)	Vivos (%)	Concentración promedio (mill/ml)
1	17.04.17	1	42	39	3	08:28	09:02	00:34	2	0.5	0.5	7	80	89	55
2	18.04.17	1	42	39	3	08:22	08:33	00:11	2	0.5	2.5	8	50	85	50.5
3	19.04.17	1	42	39	3	08:22	08:33	00:11	1	0.5	2	7.5	40	77	64
4	25.04.17	1	42	39	3	08:20	08:36	00:16	1.8	1	4	6.5	80	70	57
5	27.04.17	9210	42	38	4	08:15	08:32	00:17	1	0.5	1	7.5	60	68	32
6	28.04.17	9210	42	38	4	08:25	08:37	00:12	1	0	1	7	60	74	35.5
7	29.04.17	9210	42	38	4	08:57	09:15	00:18	0.8	0	1	7	40	69	74.5
8	02.05.17	1	40	39	1	08:19	08:26	00:07	1.5	0	1.5	8	65	75	47
9	02.05.17	13022	42	37	5	09:08	09:27	00:19	0.6	0	4	6	80	73	168
10	04.05.17	1	42	38	4	08:05	08:20	00:15	0.6	0	4	7.5	20	77	27.5
11	06.05.17	1	40	39	1	09:13	09:30	00:17	2	0.5	1	7.5	20	69	14.5
12	11.05.17	1	42	39	3	08:25	08:48	00:23	1.5	0.5	3	7	30	70	42.5
13	15.05.17	9210	42	40	2	08:31	08:46	00:15	2	1	1	7	80	70	89
14	15.05.17	1	42	40	2	08:32	08:47	00:15	1.5	1	6	7	85	72	67.5
15	16.05.17	544	42	39	3	08:26	08:41	00:15	1.8	0	1.5	7.5	60	74	26.5
16	17.05.17	1	42	40	2	08:38	08:51	00:13	2	0	0	7.5	30	74	30
17	18.05.17	9210	42	39	3	09:00	09:27	00:27	0.8	0	0.3	7	20	58	131
18	20.05.17	1	42	39	3	07:38	07:48	00:10	1	2	0.7	7	50	74	96
19	22.05.17	9210	42	39	3	08:34	08:42	00:08	0.4	0	0.4	7	20	62	98.5
20	23.05.17	544	42	40	2	08:27	08:51	00:24	2	10	0.3	7.5	60	54	77
21	24.05.17	1	42	39	3	08:24	08:45	00:21	1.2	1	1	7	50	68	144
22	29.05.17	1	42	40	2	08:20	08:33	00:13	1.8	1	1.5	7.5	30	74	78
23	02.05.17	544	42	38	4	08:12	08:34	00:22	3	4	0.8	8	30	72	8.5
24	02.05.17	30306	42	36	6	08:31	09:00	00:29	4	1	2.5	7	30	42	2
25	04.05.17	9210	42	38	4	08:30	09:25	00:55	2	5	0.5	7	80	70	95
26	05.05.17	1	42	39	3	08:38	08:59	00:21	1.8	0	4	6.5	80	70	382.5
27	06.06.17	9210	42	38	4	08:32	09:08	00:36	4	1	3	6.5	60	76	180
28	10.06.17	1	42	39	3	08:32	08:49	00:17	2	0.5	2	6.5	80	72	98.2
<b>PROMEDIO</b>	-	-	<b>41.86</b>	<b>38.75</b>	<b>3.11</b>	-	-	<b>00:19</b>	<b>1.68</b>	<b>1.13</b>	<b>1.86</b>	<b>7.14</b>	<b>52.50</b>	<b>70.64</b>	<b>81.13</b>
<b>DS</b>	-	-	<b>0.52</b>	<b>0.93</b>	<b>1.10</b>	-	-	<b>0.01</b>	<b>0.88</b>	<b>2.09</b>	<b>1.51</b>	<b>0.49</b>	<b>22.67</b>	<b>8.80</b>	<b>74.54</b>
<b>C.V.</b>	-	-	<b>1.25</b>	<b>2.39</b>	<b>35.41</b>	-	-	<b>51.85</b>	<b>52.53</b>	<b>186.07</b>	<b>80.88</b>	<b>6.83</b>	<b>43.18</b>	<b>12.46</b>	<b>91.87</b>
<b>MINIMO</b>	-	-	<b>40</b>	<b>36</b>	<b>1</b>	-	-	<b>00:07</b>	<b>0.4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>6</b>	<b>20</b>	<b>42</b>	<b>2</b>
<b>MAXIMO</b>	-	-	<b>42</b>	<b>40</b>	<b>6</b>	-	-	<b>00:55</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>85</b>	<b>89</b>	<b>382.5</b>



**Tabla 14.** ANVA para 3 tratamientos de la primera etapa (disuelto) en la disminución de la filancia seminal.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calcular</b>	<b>Pr &gt;F</b>
<b>Tratamiento</b>	2	0.04	0.02	0.02	0.98
<b>Error</b>	81	74.77	0.92		
<b>Total corregido</b>	83	74.81			

**Tabla 15.** ANVA para 3 tratamientos de la segunda etapa (20 minutos) en la disminución de la filancia seminal.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calcular</b>	<b>Pr &gt;F</b>
<b>Tratamiento</b>	2	0.08	0.04	0.07	0.93
<b>Error</b>	81	45.54	0.56		
<b>Total corregido</b>	83	45.62			

**Tabla 16.** ANVA para 3 tratamientos de la tercera etapa (40 minutos) en la disminución de la filancia seminal.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calcular</b>	<b>Pr &gt;F</b>
<b>Tratamiento</b>	2	0.22	0.11	0.23	0.8
<b>Error</b>	81	39.65	0.49		
<b>Total corregido</b>	83	39.88			

**Tabla 17.** ANVA para 3 tratamientos de la cuarta etapa (1 hora) en la disminución de la filancia seminal.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calcular</b>	<b>Pr &gt;F</b>
<b>Tratamiento</b>	2	0.08	0.04	0.11	0.9
<b>Error</b>	81	31.69	0.39		
<b>Total corregido</b>	83	31.78			

**Tabla 18.** ANVA para 3 tratamientos de la quinta etapa (2 horas) en la disminución de la filancia seminal.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	0.08	0.04	0.14	0.87
Error	81	23.68	0.29		
<b>Total corregido</b>	<b>83</b>	<b>23.76</b>			

**Tabla 19.** ANVA para 3 tratamientos de la primera etapa (disuelto) en la motilidad espermática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	125.6	62.8	0.17	0.84
Error	81	30030.36	370.75		
<b>Total corregido</b>	<b>83</b>	<b>30155.95</b>			

**Coefficiente de variación.** 53.03%

**Variable dependiente.** 36.31%

**Tabla 20.** ANVA para 3 tratamientos de la segunda etapa (20 minutos) en la motilidad espermática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	359.52	179.76	0.49	0.62
Error	81	29982.14	370.15		
<b>Total corregido</b>	<b>83</b>	<b>30341.67</b>			

**Coefficiente de variación.** 53.69%

**Variable dependiente.** 35.83%

**Tabla 21.** ANVA para 3 tratamientos de la tercera etapa (40 minutos) en la motilidad espermática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	21811.82	10905.91	44.67	<.0001
Error	81	19775.98	244.15		
<b>Total corregido</b>	<b>83</b>	<b>41587.8</b>			

**Coefficiente de variación.** 67.32%

**Variable dependiente.** 23.21%

**Tabla 22.** ANVA para 3 tratamientos de la cuarta etapa (1 hora) en la motilidad espermática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	47.02	23.51	0.07	0.93
Error	81	27494.64	339.44		
<b>Total corregido</b>	<b>83</b>	<b>27541.67</b>			

**Coefficiente de variación.** 53.92%

**Variable dependiente.** 34.17%

**Tabla 23.** ANVA para 3 tratamientos de la quinta etapa (2 horas) en la motilidad espermática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	72.02	36.01	0.1	0.91
Error	81	29173.21	360.16		
<b>Total corregido</b>	<b>83</b>	<b>29245.24</b>			

**Coefficiente de variación.** 59.48%

**Variable dependiente.** 31.90%

**Tabla 24.** ANVA para 3 tratamientos de la primera etapa (disuelto) en la vitalidad espermática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	5.88	2.94	0.04	0.96
Error	81	5636.36	69.58		
Total corregido	83	5642.24			

**Coefficiente de variación.** 11.54%

**Variable dependiente.** 72.26%

**Tabla 25.** ANVA para 3 tratamientos de la segunda etapa (20 minutos) en la vitalidad espermática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	95.17	47.58	0.82	0.45
error	81	4715.82	58.22		
Total corregido	83	4810.99			

**Coefficiente de variación.** 10.72%

**Variable dependiente.** 71.15%

**Tabla 26.** ANVA para 3 tratamientos de la tercera etapa (40 minutos) en la vitalidad espermática.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calcular	Pr >F
Tratamiento	2	105.5	52.75	0.5	0.61
error	81	8586.82	106.01		
Total corregido	83	8692.32			

**Coefficiente de variación.** 14.54%

**Variable dependiente.** 70.82%

**Tabla 27.** ANVA para 3 tratamientos de la cuarta etapa (1 hora) en la vitalidad espermática.

<b>Fuente de variación</b>	<b>grados de libertad</b>	<b>suma de cuadrados</b>	<b>cuadrado medio</b>	<b>F calcular</b>	<b>Pr &gt;F</b>
<b>tratamiento</b>	2	6.45	3.23	0.04	0.96
<b>error</b>	81	6763.5	83.5		
<b>total corregido</b>	83	6769.95			

**Coefficiente de variación.** 13.06%

**Variable dependiente.** 69.98%

**Tabla 28.** ANVA para 3 tratamientos de la quinta etapa (2 horas) en la vitalidad espermática.

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calcular</b>	<b>Pr &gt;F</b>
<b>Tratamiento</b>	2	190.45	95.23	0.86	0.43
<b>Error</b>	81	9007.5	111.2		
<b>Total corregido</b>	83	9197.95			

**Coefficiente de variación.** 15.67%

**Variable dependiente.** 67.31%

**Anexo 3.**  
**Panel fotográfico**



**Foto 01:** Materiales indispensables para el armado de vagina artificial.



**Foto 02:** Vagina artificial elaborada (A), colocación y fijación de la vagina artificial en el maniquí de alpacas (B).

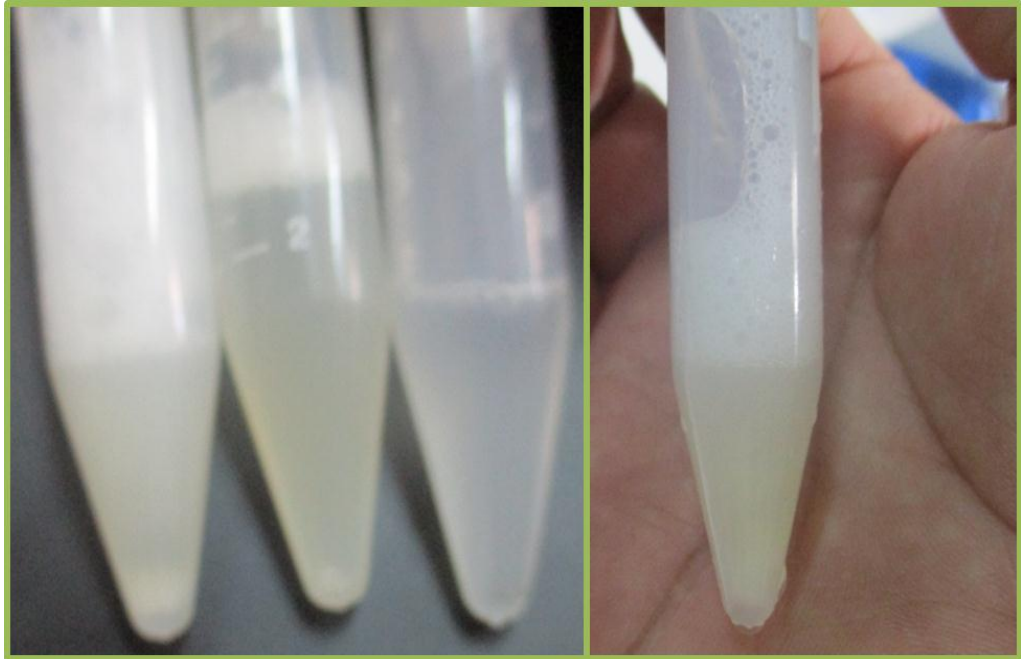


**Foto 03:** Monta y copula de reproductores en maniquís de alpacas.

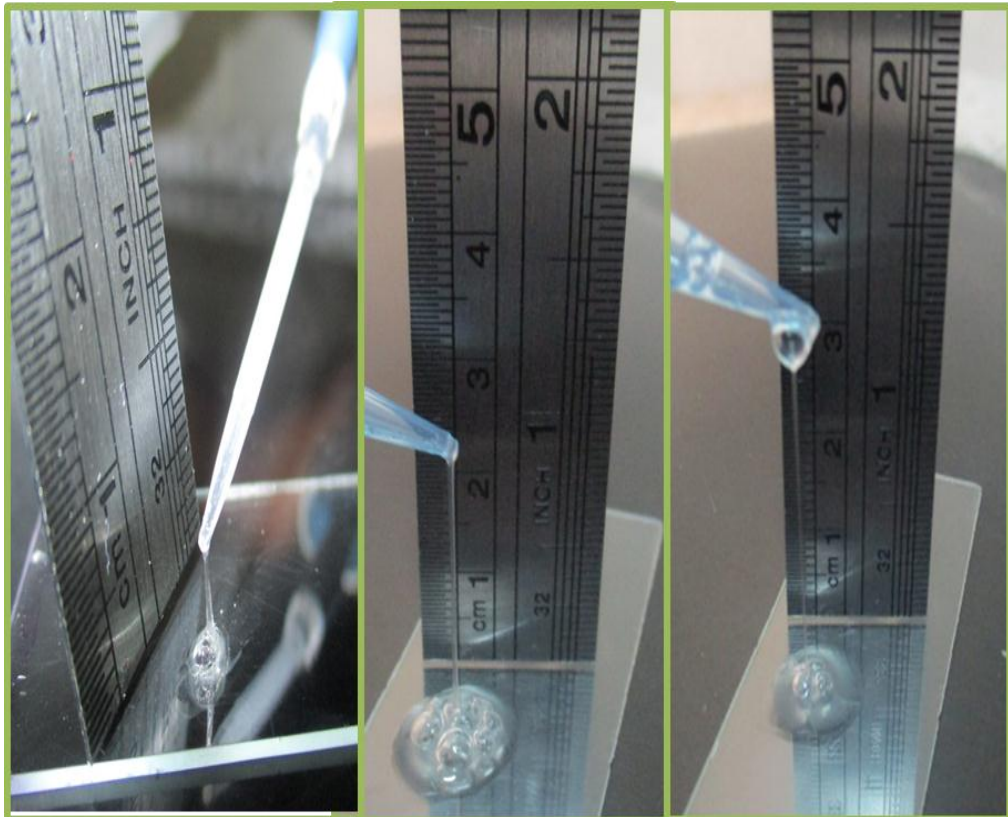


**Foto 04:** Evaluación de la temperatura final de la vagina artificial (A), evaluación macroscópica del semen en el laboratorio (B).



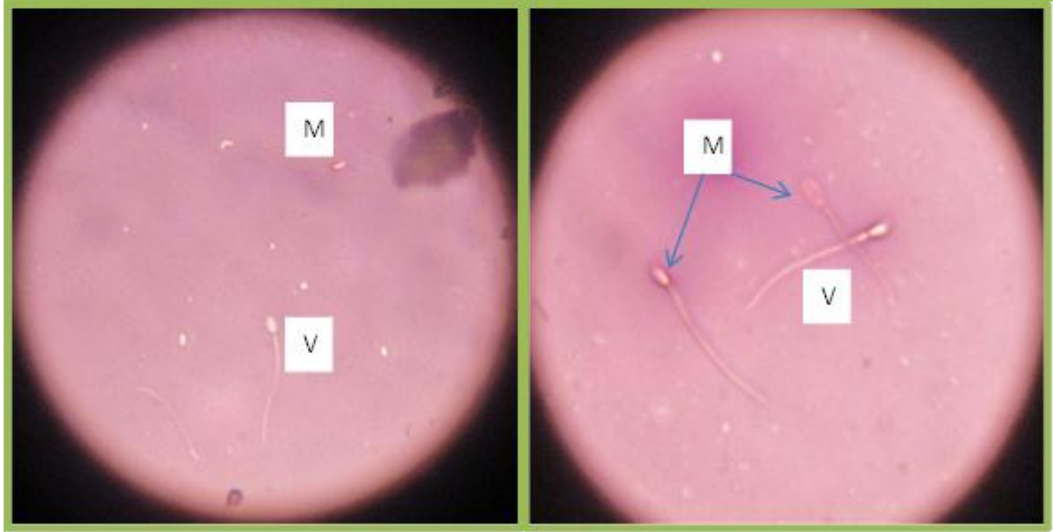


**Fotos 05:** Diferentes volúmenes del eyaculado y espuma del semen de alpacas.

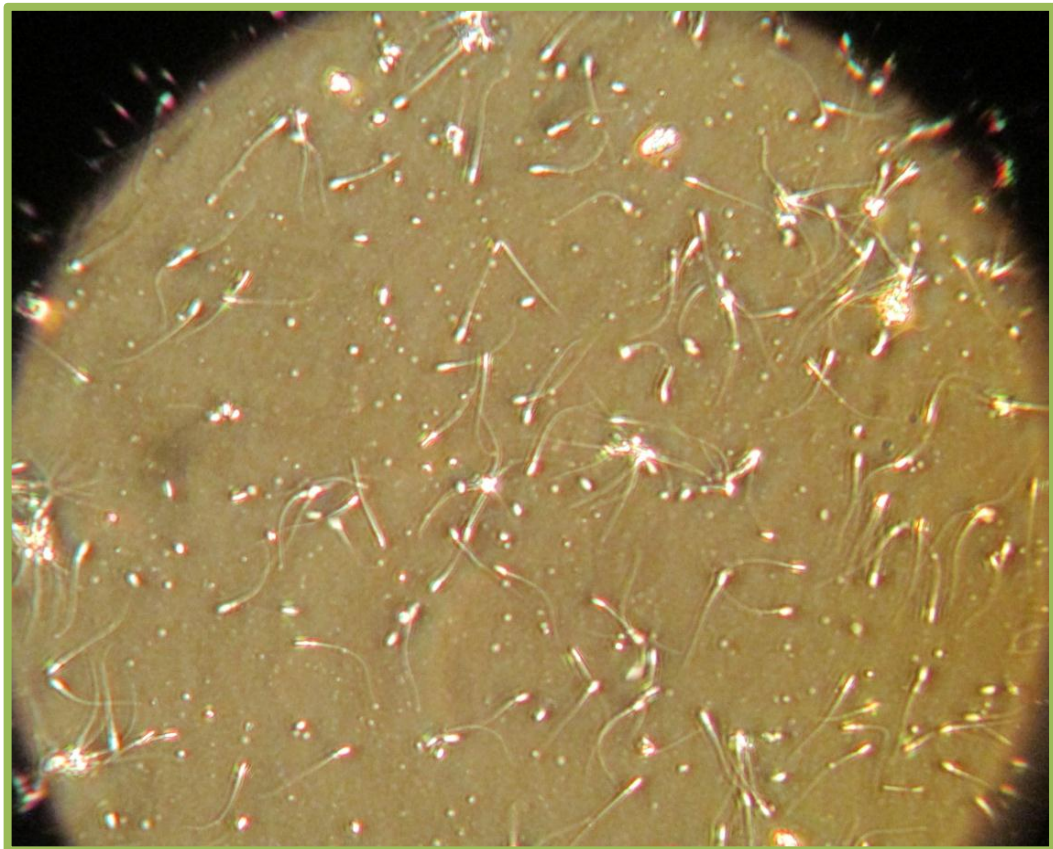


**Fotos 06:** Extensión y evaluación de la filancia seminal de alpacas.





**Fotos 07:** Espermatozoides vivos (V), espermatozoides muertos (M).



**Foto 08:** Movimiento de espermatozoides.