

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE MEDICINA

VETERINARIA



**“EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS PARA LA
CONGELACIÓN DE SEMEN DE ALPACA (*Vicugna pacos*)**

A 2736 m.s.n.m. – AYACUCHO 2013.”

Tesis para obtener el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

Presentado por:

EDWIN MENDOZA ALACUTE

AYACUCHO – PERÚ

2015

**“EVALUACION DE DOS PROTOCOLOS PARA LA
CONGELACION DE SEMEN DE ALPACA (*Vicugna pacos*) A 2 736
m.s.n.m. AYACUCHON-2013”**

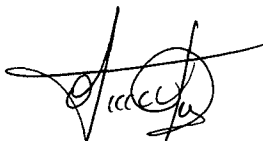
Recomendado : 21 de abril 2015.
Aprobado : 11 de junio de 2015.



M.Sc. M.V. CARLOS ALBERTO PISCOYA SARMIENTO
Presidente del Jurado



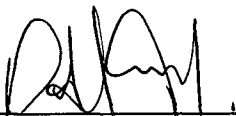
Mg. Sc. CESAR AUGUSTO OLAGUIVEL FLORES
Miembro del Jurado



M.V. MAGALY RODRÍGUEZ MONJE
Miembro del Jurado



M.Sc. TEODORO ESPINOZA OCHOA
Miembro del Jurado



Dr. RÓMULO AGUSTÍN SOLANO RAMOS
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

“La mejor manera de aprender es haciendo...”

Kant.

Con amor a Saturnina mi abuela y Andrés mi padre, *in memoriam*, que de algún lugar están viendo con alegría mis logros.

A mis padres Celestina y Armando por la invaluable herencia que me han dado en vida: Mi profesión.

AGRADECIMIENTO

A Dios por la vida, iluminarme, darme las oportunidades y la fuerza para salir adelante; sin Él nada sería posible en mi vida.

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 Escuela de Formación Profesional de Medicina Veterinaria que contribuyeron en mi formación profesional y personal.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho, por ceder los materiales necesarios para este trabajo de investigación, por despertarme el cariño a la investigación y amor a los camélidos sudamericanos.

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

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores, por su apoyo incondicional como coasesora de este trabajo de investigación, por sus consejos, sugerencias, amistad y comprensión.

A mis amados hermanos José, Rafael, Iván, Elizabeth y Zulma por su invaluable amor, cariño e infinita paciencia; a Lizbeth por su gran apoyo y aliento.

A mis queridos amigos Ronal, Mijail, Luis, Giuvika por su apoyo durante la ejecución de este trabajo.

A mi Tuna de Medicina Veterinaria, por vivir conmigo un sueño de trascendencia, integración y verdadera tradición universitaria y,

A todos aquellos que de una u otra manera me apoyaron en la vida y a concluir mi carrera a través de su ejemplo, apoyo, consejos y cariño agradezco profunda y sinceramente.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	viii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
Objetivos.	3
Objetivo general.	3
Objetivos específicos.	3
I REVISIÓN DE LITERATURA	4
1.1. Antecedentes.	4
1.2. La alpaca.	6
1.2.1. Razas de alpacas.	6
1.2.2. Taxonomía de la alpaca.	7
1.3. Anatomía reproductiva de la alpaca	8
1.3.1. Testículos	8
1.3.2. Epidídimo y conducto deferente.	8
1.3.3. Glándulas sexuales accesorias.	9
1.3.4. Pene.	9
1.3.5. Prepucio.	9
1.4. Fisiología reproductiva de la alpaca macho.	10
1.4.1 Pubertad.	10

1.4.2.	Espermatogénesis.	10
1.4.3.	Estacionalidad reproductiva.	12
1.5.	Métodos de colección de semen en alpacas.	13
1.5.1.	Recolección por vagina artificial.	13
1.5.2.	Recolección por electroeyaculación.	14
1.5.3.	Fístula uretral.	14
1.5.4.	Aspiración vaginal pos coital.	14
1.5.5.	Desviación de conductos deferentes.	15
1.5.6.	Bulbouretrótoma.	15
1.6.	Aspectos de colección de semen con vagina artificial.	16
1.7.	Evaluación del semen.	17
1.7.1.	Características macroscópicas.	17
1.7.2.	Características microscópicas.	18
1.8.	Dilutores frecuentes utilizados en semen de alpaca.	18
1.8.1	Tris yema de huevo	19
1.8.2	Dilutor a base de TES.	19
1.8.3.	Dilutor a base de leche.	19
1.9.	Agentes antibacteriales.	19
1.10.	Principios de la criopreservación.	20
1.11.	Crioprotectores.	21
1.11.1.	Yema de huevo.	22
1.11.2.	Etilenglicol.	22
1.12.	La taurina.	23
1.13.	Actualidad de la congelación de semen de alpacas.	25

II MATERIALES Y MÉTODOS.	27
2.1. Localización.	27
2.2. Duración.	27
2.3. Muestra.	28
2.4. Materiales.	28
2.4.1. De laboratorio.	28
2.4.2. Equipos y aparatos.	28
2.4.3. De campo.	29
2.4.4. Material biológico.	30
2.4.5. Medios y reactivos.	30
2.4.6. Otros.	30
2.4.7 Procedimiento experimental.	31
2.4.7.1. Preparación de la vagina artificial.	31
2.4.7.2. Colección de semen.	32
2.4.7.2.1. Comportamiento en la cópula.	32
2.4.7.3. Análisis laboratorial de semen.	33
2.4.7.3.1. Análisis macroscópico.	33
2.4.7.3.2. Análisis microscópico.	34
2.4.7.4. Preparación de dilutores.	35
2.4.7.5. Dilución de semen y refrigeración.	37
2.4.7.6. Envasado para congelación.	38
2.4.7.7. Congelación.	38
2.4.7.8. Evaluación pos congelación.	39

2.5. Diseño estadístico.	39
III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	41
IV CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
V REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	57
VI ANEXOS.	70

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

Cuadro N° 3.1.	Tiempo de cópula.	41
Cuadro N° 3.2.	Porcentaje de color en semen fresco.	42
Cuadro N° 3.3.	Volumen de semen fresco.	43
Cuadro N° 3.4.	Volumen de espuma en semen fresco.	45
Cuadro N° 3.5.	Filancia en semen fresco.	46
Cuadro N° 3.6.	Concentración espermática en semen fresco.	47
Cuadro N° 3.7.	Vitalidad espermática en semen fresco.	48
Cuadro N° 3.8.	Motilidad espermática en semen fresco.	49
Cuadro N° 3.9.	Motilidad espermática de semen disuelto, según tratamiento.	50
Cuadro N° 3.10.	Motilidad espermática de semen equilibrado, según tratamiento.	51
Cuadro N° 3.11.	Motilidad espermática de semen descongelado, según tratamiento.	53
Cuadro N° 6.1.	Componentes del dilutor Tris – yema de huevo de gallina más taurina 30mM.	71
Cuadro N° 6.2.	Componentes del dilutor AndroMed®	71
Cuadro N° 6.3.	Resultados de colección, análisis, procesamiento y congelación semen de alpaca con dos tratamientos.	72
Cuadro N° 6.4.	ANVA para 2 tratamientos en la etapa de semen recién disuelto (37 °C)	79
Cuadro N° 6.5.	ANVA en la etapa de semen disuelto a temperatura ambiente (20 °C aproximadamente), para ambos tratamientos.	79

Cuadro N° 6.6.	ANVA para 2 tratamientos en la etapa de semen disuelto en equilibramiento o refrigerado (5 °C aproximadamente).	80
Cuadro N° 6.7.	ANVA para 2 tratamientos en la etapa de semen descongelado (37 °C aproximadamente).	80
Figura N° 1.1.	Espermatogénesis, espermatozoide y cabeza espermática.	12
Figura N° 2.1.	Flujo de congelación de semen de alpaca.	31

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 6.1.	Proporción de color en el total de los eyaculados.	73
Gráfico N° 6.2.	Tiempo de cópula (minutos).	73
Gráfico N° 6.3.	Volumen de semen fresco (ml).	74
Gráfico N° 6.4.	Volumen de espuma en semen fresco (ml).	74
Gráfico N° 6.5.	Filancia en semen fresco (cm).	75
Gráfico N° 6.6.	Vitalidad espermática (%).	75
Gráfico N° 6.7.	Concentración espermática (millones/ml).	76
Gráfico N° 6.8.	Motilidad espermática en semen fresco (%)	76
Gráfico N° 6.9.	Motilidad espermática en semen disuelto, según tratamientos (%)	77
Gráfico N° 6.10.	Motilidad espermática en semen equilibrado a 5° C, según tratamientos (%)	77
Gráfico N° 6.11.	Motilidad espermática en semen descongelado, según tratamientos (%).	78
Gráfico N° 6.12.	Tendencia de la motilidad espermática según etapas de procesamiento de semen (%).	78

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán de INIA – Ayacucho, ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray, de la provincia de Huamanga del departamento de Ayacucho entre los meses de febrero a junio del 2013. El objetivo del trabajo fue determinar la motilidad pos congelación de semen de alpaca sometido a dos tratamientos consistentes en dilutores, el primero un dilutor comercial formulado para rumiantes (AndroMed®) y el otro a base de Tris – yema de huevo de gallina más el aminoácido taurina en concentración de 30 milimolar. Se trabajó con un pool de 28 muestras de semen procedentes de 4 machos entre los 4 a 6 años de edad a los que se les extrajo el eyaculado mediante vagina artificial. Solamente se trabajó con eyaculados que demostraron tener más de 60% de motilidad y más de 50 millones de espermatozoides por ml como mínimo. La motilidad inicial de semen fresco fue en promedio 79.4 % y las motilidades según tratamiento en etapa de dilución fue 63.39% y 67.86% para taurina y Andromed, respectivamente. Asimismo los resultados de semen a temperatura ambiente fueron como sigue 59% y 65% para tratamiento taurina y Andromed respectivamente; igualmente para semen disuelto equilibrado a 5°C se obtuvieron 48% y 56.2% de motilidad para taurina y Andromed, respectivamente. Finalmente la motilidad de semen descongelado se obtuvo 11.68% 17% para el tratamiento taurina y Andromed, respectivamente. Concluyéndose que para obtener índices de motilidad elevadas se tiene que trabajar con dilutores comerciales.

Palabras claves: Semen, Alpaca, Congelación, Taurina, Andromed, Motilidad.

INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos es la actividad económica más importante sobre los 4000 msnm donde están las zonas más pobres de la sierra con 2.9 millones de habitantes, que es el 12 % de la población nacional.

El Perú tiene más de 4.2 millones camélidos sudamericanos, con 3 685 000 alpacas que es más del 84 % de los camélidos sudamericanos del mundo. Ayacucho tenía 113 332 alpacas en el 2004, hoy en día cuenta con 230 910 animales el cual representa el 6.27 por ciento a nivel nacional (INEI, 2013).

Este crecimiento sería más acentuado si se contara con un manejo apropiado por parte de los productores, que en su mayoría no tienen acceso a alternativas tecnológicas de última generación como es el caso de la biotecnología reproductiva (en un inicio inseminación artificial con semen fresco y posteriormente congelado), esto llevado a una utilización masiva y rutinaria permitiría un gran avance en el mejoramiento genético en camélidos sudamericanos y muy especialmente en alpacas.

La utilización de semen fresco o semen refrigerado en la inseminación artificial en camélidos ya se da con regular éxito según reportan algunos trabajos de investigación porque se han llegado a obtener motilidades espermáticas aceptables que han logrado nacimiento de crías (Huanca, 2013).

Un paso más adelante sería lograr un método de criopreservación satisfactorio de gametos de genética superior sean estos espermatozoides, ovocitos, embriones, incluso tejidos los cuales pueden ser transportado de lugares muy distantes a los rebaños autóctonos abaratando los costos de transporte y mantenimiento si éstos fueran sementales.

La congelación de semen es cotidiana en otras especies domésticas y con resultados muy aceptables, pero en los camélidos aún no es posible de forma óptima. La falta de un protocolo efectivo para la congelación, como en otras especies, se debe a las diferencias fisiológicas de especie y la bioquímica de los espermatozoides (Holt, 2000).

Un aspecto muy importante que se manifiesta en trabajos previos de criopreservación de semen de camélidos, más puntualmente en la alpaca, es la alta viscosidad del eyaculado que impide una buena acción de los dilutores y crioprotectores resultando en parámetros muy pobres de viabilidad, por ende de fertilidad.

Se han utilizado protocolos que han resuelto en alguna medida el problema de la viscosidad causando una licuefacción aceptable, pero afectando negativamente la motilidad e integridad espermática. Para contrarrestar aquello algunos protocolos contemplan el uso de antioxidantes y aminoácidos como es el caso de la taurina. Aminoácido éste que resulta muy beneficioso en la función espermática de algunas otras especies, pero no se han reportado experiencias en congelación de semen de alpaca.

De allí la imperiosa necesidad de tener un protocolo que permita obtener parámetros aceptables de motilidad en la congelación de semen de alpaca para una posterior inseminación con niveles aceptables de motilidad que permitan obtener un producto viable; esto nos posibilita la evaluación de dos dilutores para el proceso de congelación de semen de alpaca colectado vía vagina artificial.

Por tanto el objetivo general de este trabajo fue:

- Evaluar cuál de los dos protocolos tenía efectividad en mantener la motilidad de espermatozoides en el proceso de congelación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*).

Los objetivos específicos fueron:

- Evaluar las características macroscópicas y microscópicas del semen de alpaca antes de su congelación.
- Determinar el porcentaje de motilidad espermática post-descongelamiento.
- Determinar el efecto en la motilidad espermática del dilutor que contiene yema de huevo de gallina más el aminoácido taurina.
- Determinar el efecto en la motilidad espermática del dilutor comercial AndroMed®

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA.

1.1. Antecedentes.

Los intentos de congelación de semen en camélidos sudamericanos han sido hasta la fecha insatisfactorios, debido a las características propias del semen de camélidos, la técnica de colección, falta de conocimiento sobre su composición, viscosidad y uso de dilutores (Bustinza, 2001).

Entre los estudios más importantes realizados en congelación de semen de alpaca se obtuvo un porcentaje de motilidad post descongelamiento de 46.7 % (Bravo et al., 1996) y el mismo autor en llamas 45 %, siendo estos uno de los mayores obtenidos hasta la fecha, sin embargo no ha sido posible reproducir la metodología. Estudios posteriores reportaron tasas inferiores de motilidad post descongelamiento en las cuales se obtuvieron porcentajes de 17.4 % (Vaughan et al., 2003).

Usando diferentes concentraciones de crioprotectores se lograron obtener motilidades de 22.5 a 41 % (Santiani et al., 2005).

En llamas también se reportan motilidades muy bajas tras el descongelamiento, por ejemplo en semen colectado vía electroeyacuación se obtuvo sólo un 10 % de motilidad (McEvoy et al., 1992).

Pero también se describen motilidades entre 16 y 28% en semen descongelado de llama, probando la adición de un surfactante como el Equex® al 0.5 % (Von Baer y Hellemann, 1999), mientras que otros reportan 20 % de espermatozoides móviles (Aller et al., 2003). En la alpaca se reportado un descenso considerable de la motilidad progresiva, donde valores de 60-98 % en muestras seminales frescas descienden hasta 15-20 % luego del descongelamiento (Valdivia et al., 1999).

Congelaciones posteriores hechas en dos pasos arrojaron una motilidad de 20 % de espermatozoides viables con acrosoma íntegro al descongelamiento de las muestras obtenidas con vagina artificial (Santiani et al., 2005)

Asimismo se han reportado diversos métodos que eliminan la viscosidad del plasma seminal con el fin de favorecer el manejo de muestras seminales. Mediante el uso de enzimas (fibrinolisisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina) o la acción mecánica del paso repetido a través de una jeringa de tuberculina (aspirado y eyectado múltiple), se ha logrado licuar las muestras de semen; sin embargo, aún es incierto el efecto de estos métodos sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides (Callo et al., 1999; Valdivia et al., 1999).

Los primeros trabajos de congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca, dieron como resultado 18 % de motilidad y 80 % de integridad acrosomal al descongelamiento (Morton et al., 2007) y otro una tasa de supervivencia de solo 5 % (González, 2008).

1.2. La alpaca. Es una especie doméstica de mamífero andino cuyo nombre científico es *Vicugna pacos*. Genéticamente deriva mayormente de la vicuña salvaje y, en una proporción mucho menor, de la llama (Wheeler et al. 2001). Su domesticación se viene realizando desde hace miles de años.

Las relaciones entre la alpaca y los demás camélidos sudamericanos han sido controvertidas durante muchos años. En los siglos XVIII y XIX, cuando recibieron nombres científicos, se creía que la alpaca era descendiente del guanaco (*Lama guanicoe*), y fue denominada por ello *Lama pacos*, ignorándose sus similitudes con la vicuña, tanto en tamaño, como en la fibra y la dentición. Su clasificación se complicó tras comprobarse que las cuatro especies de camélidos sudamericanos pueden cruzarse entre sí y dar descendencia fértil. No fue hasta el siglo XXI que, gracias al desarrollo de las técnicas de análisis de ADN pudo demostrarse finalmente que la alpaca y la vicuña están estrechamente relacionadas, y que el nombre científico correcto es *Vicugna pacos*, aunque se detectó un porcentaje de su ADN proporcionado por la llama, por lo que técnicamente es un taxón híbrido intergenérico (Wheeler, 2001).

1.2.1. Razas de alpacas.

1.2.1.1. Huacaya.

Representa más del 85 % de la población de alpacas, es un animal que presenta contornos curvos y armoniosos, con una apariencia de corpulencia y una talla mayor que la alpaca suri. Presenta una superficie externa de fibra áspera, opaca y esponjosa ya que las fibras y las mechas se disponen perpendicular a la superficie corporal. Los rizos se disponen a lo largo de la mecha presentando una fibra suave y brillante internamente.

La línea superior del dorso está muy bien cubierta haciéndola muy resistente a las condiciones climáticas adversas y a la altitud (Huanca y Mamani, 2013).

1.2.1.2. Suri.

Representa menos del 5 % de la población de alpacas, presenta contornos lineales, angulosos y armoniosos, con una apariencia menos corpulenta por la disposición de las mechas colgantes además de una talla menor que la Huacaya. La superficie externa de la fibra es suave y resbaladiza.

Las mechas presentan ondulaciones suaves y largas hasta el primer tercio y de allí a la punta rulos colgantes a ambos lados del cuerpo, incluso en el copete.

Es un animal de extraordinaria belleza sobre todo con un crecimiento de fibras alrededor de los 3 años (Huanca y Mamani, 2013).

1.2.2. Taxonomía de la alpaca.

Reino	: Animalia
Filo	: Chordata
Clase	: Mammalia
Orden	: Artiodactyla
Familia	: Camelidae
Género	: Vicugna
Especie	: <i>Vicugna pacos</i>

Fuente: Marín et al., 2007.

1.4. Fisiología reproductiva de la alpaca macho.

1.4.1. Pubertad.

Se define como la edad en la que se inicia la espermatogénesis o cuando se encuentran espermatozoides en el eyaculado. Los niveles de testosterona sérica a los 9 a 11 meses se logran valores alrededor de 60 a 90 picogramos/ml (Bravo, 2002), esto revela que a esta edad se inicia la pubertad, asimismo, estudios demuestran la correlación con el peso corporal que alcanza el animal, así se ha visto la presentación de libido sexual en algunos machos de un año de edad (Fernández-Baca et al., 1970; Vivanco et al., 1985).

La alpaca inicia su vida reproductiva plena con la desaparición de la adherencia pene - prepucio, ya que esta condición es una limitante, esto se logra a los tres años en su totalidad (Sumar, 1983).

1.4.2. Espermatogénesis.

La regulación hormonal para producción de espermatozoides está dada por GnRH que estimula la adeno hipófisis que libera la LH, que en las células testiculares intersticiales provoca la producción de andrógenos. También es liberada FSH (Hormona Foliculoestimulante), cuyo blanco de acción celular son las células de Sertoli con la consecuente producción de ABP y andrógenos que ayudan en la formación y la maduración espermática (Hafez, 2000).

Las colonias celulares a partir de la pubertad son los espermatogonio tipo A1 los cuales tras una división progresiva dan lugar las de tipo A2, A3 y A4. Estos últimos dan lugar a los de tipo intermedio (In), que tras una división se convierten en los de tipo B y a su vez se dividen y originan los espermátocitos tanto primarios y

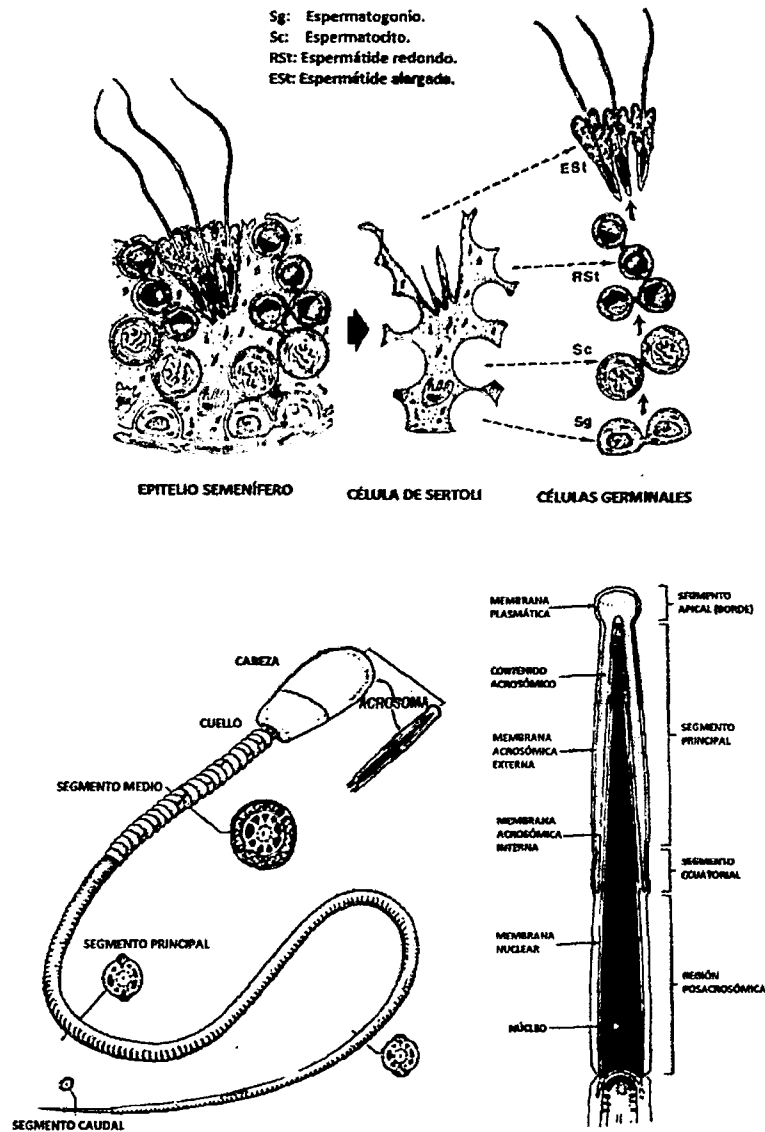
secundarios que al dividirse se convierten esta vez en células aploides llamándose espermátides (Hafez, 2000).

Desde aquí la metamorfosis espermática es muy marcada observándose hasta cuatro etapas en los cuales se producen cambios como la condensación de los gránulos celulares, formación del axonema, encasquetamiento celular para la formación del acrosoma, orientación de la cola hacia la luz tubular del conducto seminífero; la última etapa de la formación del espermatozoide es la modelación de la morfología espermática propia de cada especie, se puede decir que este proceso es común a todas las especies (Hafez, 2000).

El proceso descrito se denomina ciclo epitelial del túbulo seminífero y su etapas varían ligeramente según especie, así se habla de los camélidos sudamericanos la ocurrencia de 8 etapas divididas en 4 estadios A con etapas del 1 al 4 y 4 estadios B con etapas del 5 al 8, los cuales abarcan entre espermatogonios, espermátocitos y espermátides. La primera parte del ciclo (etapas del 1 a 4) generan hasta 54.6% de los espermátides (Bravo, 2002).

La última etapa testicular es la liberación del espermatozoide y su consiguiente almacenamiento y maduración en los depósitos epididimarios conocido como espermiación (Hafez, 2000).

Figura N° 1.1. Espermatogénesis (arriba), espermatozoide y cabeza espermática (abajo).



Fuente: Hafez, 2000.

1.4.3. Estacionalidad reproductiva.

En algunas especies domésticas, como el carnero, se observa variaciones estacionales en la calidad y cantidad de semen; así como, en los niveles de testosterona LH, los cuales están asociados a la función gonadal.

Observaciones de la conducta sexual en campo, de alpacas y llamas machos, muestran un incremento de la libido en estos animales a medida que se acercaba la

estación sexual (enero a abril), para luego disminuir notablemente en la época seca (mayo a noviembre). Lo que parece indicar una correlación entre época del año (abundancia o escasez de alimento y temperatura) con los niveles de testosterona, niveles que son muy superiores en la alpaca. (Sumar, 1990 citado por García Vera, 2005) da cifras de niveles de testosterona sanguínea en picogramos/ml para marzo en 1 142, para junio en 992.5; setiembre en 877.5 y para diciembre en 2445, respectivamente. Es decir valores muy cercanos a 1000 picogramos/ml a partir de los 21 meses de edad fluctuantes durante el año no variables con la altitud (Bravo, 2002).

La actividad sexual se manifiesta normal cuando después de estar separados hembras y machos, se los reúne para efectos de las montas, esto por el efecto de la hormona testosterona citado también por los autores (Bravo y col., 1992).

1.5. Métodos de colección de semen en alpacas.

El comportamiento sexual de los camélidos sudamericanos presenta características muy peculiares, como son la posición coital y su temperamento nervioso, esto dificulta la obtención de semen (Bustinza, 2001).

A esto hay que añadirle dificultades como el tiempo de cópula, la ubicación del eyaculado y la viscosidad del semen que dificultan el manejo del espermatozoide y bajan su viabilidad (Solís, 2001).

1.5.1. Recolección por vagina artificial. La vagina artificial es una imitación de la vagina de la alpaca que provee estimulación térmica y mecánica para producir la eyaculación. Es la forma habitual de colección de semen en camélidos. Esta vagina artificial está integrada en un maniquí. Es una de las formas de colección más

naturales, la única dificultad es hacer que el macho acepte al maniquí y se obtienen semen con las mismas características que el eyaculado pos coital (Sumar y Leyva, 1981).

1.5.2. Recolección por electroeyaculación. Esta técnica viene desde muchas décadas atrás (Fernández Baca y Calderón, 1966) con una intensidad de 40 voltios obtuvo semen de alpaca sin necesidad de hembras en celo, acortando el tiempo de colección y pudiendo hacerlo a lo largo de todo el año, pero se tiene que anestesiarse a los sementales (Johnson, 1989), entonces se hace necesario una inversión relativamente elevada y personal entrenado (Giuliano, 2012).

1.5.3. Fístula uretral. Este método 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 bulbo cavernoso aislado y se separa la uretra del cuerpo cavernoso; este método no interfiere en la cópula y las secuelas post operatorias parecen no afectar al animal (Kubiceck, 1974).

1.5.4. Aspiración vaginal poscoital. Muestras de semen pueden ser obtenidas por aspiración del fondo de la vagina después de la cópula, 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 cópula; la técnica es introducir un espejo por la vulva previamente aseada y con la ayuda de una fuente de luz se ubica la cervix, 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).

1.5.5. Desviación de conductos deferentes. Permite colectar espermatozoides libres de secreción de glándulas anexas, por ello es que se desarrolló esta técnica y la extirpación de la próstata; la primera técnica intenta colectar espermatozoides directamente de su reservorio, la cola del epidídimo, desviando quirúrgicamente los conductos deferentes hacia la región ventral del animal o la cara interna del muslo, formando una fistula permanente en la piel desde donde se puedan colectar continuamente sin la necesidad de tener hembra receptiva ni someter a los espermatozoides a la acción de enzimas proteolíticas que intenten licuefactar el coágulo del eyaculado para un mejor manejo espermático (Paricahua, 2001 y Quintano, 2002).

1.5.6. Bulbouretrotomía. Esta técnica fue desarrollada con la finalidad de obtener espermatozoides sin la secreción de las glándulas bulbo uretrales, 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).

1.6. Aspectos de colección de semen con vagina artificial.

El proceso de colección de semen vía vagina artificial adaptada de la que se utiliza en ovinos (Sumar y Leyva, 1981) se hace de manera aceptable (Vaughan et al., 2003), pero hay que tener en cuenta algunos pasos previos muy importantes como que si bien mejora la técnica de colección, aún presenta dificultades para mantener una temperatura adecuada durante el largo de la cópula. El uso de una frazadilla eléctrica cubriendo la vagina artificial, permite algunas mejoras en la técnica de colección, facilitando el mantenimiento de la temperatura (Gauly y Leindiger, 1995). Igualmente, el uso de un maniquí (Sumar y Leyva, 1981) o la colección con hembra receptiva (Gauly y Leindiger, 1995; Huanca y Gauly, 2001) se presentan como alternativas para la colección de una muestra de semen fisiológicamente normal; sin embargo, se requiere un entrenamiento de los animales y no siempre todos los machos llegan a aceptar el maniquí; mientras que el uso de hembra receptiva genera incomodidades en el operador.

1.6.1. Selección de machos: esto se hace atendiendo a ciertos aspectos deseables o propósitos del animal que puede ser fibra o carne. A demás se evalúa el estado sanitario, así como las anormalidades físicas y aptitud reproductiva. Solo el 8% de los machos jóvenes se hallan libres de adherencias pene-prepuciales; a la edad de dos años el 70% de machos ya no tienen estas adherencias y a la edad de 3 años el 100% están completamente libres de éstas, siendo sexualmente activos hasta la edad de 11-12 años aunque con una tasa baja de fecundidad (Sumar, 1983).

1.6.2. Entrenamiento del macho: el macho seleccionado debe prioritariamente ser entrenado para que permita una fácil colección con vagina artificial, para esto debe habituarse a un maniquí confeccionado con pellejo de una hembra vacía sacrificada.

Algunos machos a la edad de un año y con peso promedio de 34 kilos, ya muestran interés sexual por las hembras (Sumar, 1983).

La vagina artificial consta de un tubo rígido de PVC con una válvula exterior; por el lumen del tubo se introduce una manga de látex que se dobla sobre los extremos del tubo creando así una cámara de aire. A uno de los extremos se le coloca un cono de plástico con tubo colector. Para colectar es llenado con agua caliente entre 37 a 40 °C luego de asegurado se le insufla aire a una presión adecuada. Todo esto se envuelve con una frazadilla térmica que mantendrá la temperatura del agua y por ende la del semen (Alarcón et al., 2012). Va integrada en un maniquí que simula la posición de hembra receptiva.

Antes de colectar el semen se debe tener en cuenta dos aspectos importantes: la higiene y que se estimule el macho (Gallina y Valencia, 2006).

1.7. Evaluación del semen.

1.7.1. Características macroscópicas.

El semen colectado se mantiene en todo momento fuera de los efectos de la luz solar, se evalúa:

Color. Observado directamente a través del tubo Falcon, la gama de colores normales que se tiene que observar es entre blanco claro o blanco cremoso según la concentración que tenga (Bravo et al., 2000).

Volumen. Se observa en el mismo tubo graduado que puede ser de 1 a 10 ml dando un promedio de 3.5 (Bravo et al., 2000).

Filancia. Es la máxima resistencia del semen cuando se estira desde una lámina portaobjetos con una aguja con el bisel hacia arriba, para esta prueba se ayuda con

una regla. En los camélidos el semen es altamente viscoso, siendo muy difícil separar el plasma a menos que sea por centrifugación (Huanca, 1996).

1.7.2. Características microscópicas.

Viabilidad. El porcentaje de espermatozoides vivos es de 34.3 ± 4.2 por ciento (Dávalos et al, 2002) incluso mayores a 66.50 % (Cavalcanti, 2013).

Motilidad. Se hace la observación a un aumento de 100 a 400x, se reportado un porcentaje de motilidad de 34.2 ± 5.3 (Dávalos y Olazábal, 2002). Se efectúa con una gota de semen en una lámina atemperada.

Motilidad individual. Se hace una dilución en proporción de 9 a 1, es decir por un ml de semen se utiliza nueve de suero fisiológico. La viscosidad del semen de la alpaca dificulta el movimiento de los espermatozoides (Huanca, 1996).

Concentración. Se trata de la determinación del número de espermatozoides por ml o centímetro cúbico. Esto se logra con el uso del hematocitómetro con el mismo procedimiento que se utiliza para el conteo de glóbulos rojos. Se reporta concentraciones bajas en comparación a otras especies, así se tiene cifras cercanas a $32.8 \pm 4.3 \times 10^4/\text{ml}$ (Dávalos y Olazábal, 2002).

Evaluación de espermatozoides anormales. Consiste en determinar el porcentaje de espermatozoides anormales presentes en el eyaculado, mediante frotices coloreados con el objeto de observar la morfología espermática que en condiciones normales están cercanos a un porcentaje de 14.9 ± 1.1 (Dávalos y Olazábal, 2002) en muestras colectadas en maniquí.

1.8. Dilutores frecuentemente utilizados en semen de alpaca.

Los dilutores frecuentemente usados en trabajos de dilución con semen de alpacas ya sea con fines de refrigeración o congelación son:

1.8.1. 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).

1.8.2. 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), todo se prepara con agua ultra pura.

1.8.3. 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).

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). Además llevan antibióticos y crioprotectores según la finalidad de dilución.

1.9. Agentes antibacteriales.

Se busca evitar la variación de pH por la flora que contiene el semen recién colectado aun cuando se haya limpiado el orificio prepucial. Son empleados con frecuencia penicilina, estreptomicina, sulfanilamida, eritromicina y gentamicina.

1.10. Principios de la criopreservación.

Criopreservación es la aplicación controlada del frío para minimizar el metabolismo celular y mantenerla viable por tiempo indefinido mientras se mantenga la cadena de frío, para lograr ello se hace uso de propiedades benéficas crioprotectoras de diversos componentes que tienen los dilutores. El objetivo fundamental es el intento de preservar material genético de especies y razas con fines de transporte o de investigación.

A diferencia de la refrigeración del semen, el proceso de congelación necesita además el empleo de un agente crioprotector penetrante. Desde el descubrimiento del glicerol como agente crioprotector penetrante efectivo (Polge et al., 1949) y del establecimiento de las técnicas básicas de criopreservación, el semen de una variedad de especies se congela y utiliza con éxito en la inseminación artificial.

La reducción de la temperatura de 37 a 20 °C promueve alteraciones de naturaleza biofísica en el espermatozoide (Amann y Pickett, 1987), la mayor prueba que tiene es mantener la viabilidad entre -15 y -60 °C que soportan en la congelación y descongelación.

A -196 °C no hay reacciones térmicas, puesto que a -130 °C ya no hay presencia de agua en célula alguna (Mazur, 1984).

La membrana plasmática actúa como barrera, impidiendo la expansión de los cristales de hielo del medio exterior hacia el compartimento intracelular (Watson, 1979). Por tanto la deshidratación osmótica, más que la formación de hielo intracelular, es la principal causa de las alteraciones ultra estructurales de la membrana y una de sus consecuencias es la pérdida de la selectividad de la membrana (Parks y Graham, 1992). Dado que la formación de hielo intracelular es

dependiente del ritmo de congelación y descongelación, el estricto control del ritmo del descenso y del aumento de la temperatura puede minimizar las lesiones celulares causadas por el hielo intracelular. Además de la cristalización, también están implicadas alteraciones osmóticas, que conducen a daños celulares evidentes (Hofmo y Berk, 1989).

1.11. Crioprotectores.

El crioprotector debe preservar, en la mayor proporción posible, la integridad de las diferentes estructuras del espermatozoide (Watson, 1995), su utilización es indispensable para minimizar los daños que se producen en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación (Gao y col., 1995), asimismo en la descongelación, proporcionando protección contra las fuertes alteraciones que se producen en las estructuras celulares y extracelulares y en la composición química (Fahy y col., 1990).

Según su capacidad para atravesar la membrana se habla de penetrantes como glicerol, DMSO, etilenglicol y no-penetrantes como la yema de huevo, leche y determinados azúcares disacáridos como trehalosa y sucrosa (Hammerstedt y col., 1990) los cuales pueden proporcionar estabilidad de la membrana debido a su capacidad para asociarse a las membranas más fuertemente que un crioprotector permeable pudiendo causar remoción parcial del agua del espermatozoide, y así reducir la posibilidad de formación de hielo intracelular (Anchordoguy y col., 1987).

1.11.1. Yema de huevo.

La yema de huevo es un componente básico presente en casi todos los diluyentes para refrigeración y congelación por sus características protectoras contra el frío desde los primeros trabajos de congelación (Phillips y Lardy, 1940).

La yema de huevo contribuye beneficiosamente de dos maneras distintas en la criopreservación (Kampschmidt y col., 1953). Por resistencia la porción lipídica constituida por los fosfolípidos, lecitina y cefalina, es efectiva en la protección contra el choque térmico; la lecitina es el principal fosfolípido protector y, por conservación consigue la supervivencia del espermatozoide (Blackshaw, 1954).

Además las lipoproteínas de baja densidad son los componentes de la yema que consiguen el efecto crioprotector, evitando el choque térmico y preservando la integridad de la membrana (Graham y Foote, 1987).

1.11.2. Etilenglicol.

El etilenglicol (EG) es un polialcohol crioprotector cuyo peso molecular es 62.07, es decir más bajo que el glicerol.

La utilización de EG como crioprotector, en la congelación de diferentes especies indica que en semen de toro ejerce un menor efecto inhibitorio en la motilidad que el glicerol o el DMSO (Guthrie y col., 2002), reduciendo la extensión de las conocidas “lesiones osmóticas”. Asimismo en el ovino, el EG utilizado a concentraciones entre el 1,5 y al 6% ha proporcionado buenos porcentajes de motilidad pos descongelación (Molinia y col., 1994). En la congelación de espermatozoides de equino el EG podría sustituir al glicerol si se utiliza en la misma concentración que éste (3%), o incluso más reducida, basándose en los valores de la motilidad progresiva del espermatozoide descongelado (Mantovani y col., 2002)

En otras especies como el ratón, en que la congelación del eyaculado es más difícil que en las restantes especies domésticas (Sztein y col., 2001), el EG parece un crioprotector prometedor, capaz de minimizar las lesiones de la membrana plasmática.

1.12. La taurina.

La taurina (ácido 2-aminoetano sulfónico) es uno de los aminoácidos libres presentes en mayores concentraciones en los tejidos animales. Regula una vasta serie de funciones biológicas tan diversas como el ritmo cardíaco, la temperatura corporal, la excitación neuronal, la visión, la motilidad espermática, el metabolismo energético y la osmoregulación (Shaffer y col., 2000).

En la mujer se supone que, a parte de la osmoregulación, la taurina puede actuar en el mantenimiento de la motilidad del espermatozoide en el fluido uterino, protegiéndole contra la influencia adversa de las elevadas concentraciones de K^+ existentes en este ambiente (Casslén, 1987).

Proviene de la oxidación de la hipotaurina en los tejidos. Es decir es producto de la oxidación por una serie de reacciones del radical $OH\cdot$ con la hipotaurina (Fellman y Roth, 1985).

En el tracto reproductivo masculino de varias especies se encuentran niveles significativos de taurina e hipotaurina, como en la cola del epidídimo del ratón (Kochakian, 1975; Fraser, 1986), toro (Guérin y col., 1995) y el cerdo (Van der Horst y Grooten, 1966) sobretodo asociados a la fracción rica en espermatozoides del eyaculado y también del epidídimo (Johnson y col., 1972), como también en el semen de perro (Van Der Horst y Grooten, 1966) y gato (Buff y col., 2001).

La presencia de taurina y, sobretodo, de hipotaurina a elevadas concentraciones en el plasma seminal sugiere que el epidídimo o el testículo son sus lugares de origen (Johnson y col., 1972). Sin embargo, datos revelados por métodos inmunohistoquímicos dan a conocer que la localización de la taurina en el tracto reproductivo del ratón incluye las células intersticiales del testículo (células de Leydig), las células endoteliales vasculares y, principalmente, las células epiteliales del conducto eferente. Resultando el epidídimo así como los túbulos seminíferos inmuno-negativos, lo que permite a los autores sugerir que el lugar específico de producción de taurina sean los conductos eferentes (Lobo y col., 2000).

Los efectos de protección y osmoregulación de la taurina en situación de estrés hiperosmótico en el espermatozoide del chimpancé han sido demostrados (Ozasa y Gould, 1982).

Estudios realizados incubando el semen de hámster con taurina reportan que ésta estimula y mantiene la motilidad durante la capacitación (Mrsny y col., 1979; Leibfried y Bavister, 1981)

Trabajos en conejos dan a conocer que la taurina y la hipotaurina inhiben la peroxidación lipídica manteniendo la motilidad del espermatozoide (Álvarez y Storey, 1983).

Otra posibilidad de actuación de la taurina y la hipotaurina en el mantenimiento de la motilidad espermática, a través de la inhibición de la enzima $\text{Na}^+ - \text{K}^+ \text{ATPasa}$ anulando sus efectos inhibitorios negativos sobre la motilidad del espermatozoide (Mrsny y Meizel, 1985). Adicionalmente, otro posible mecanismo derivado de la inhibición de esta enzima es el aumento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , y, en consecuencia, la motilidad espermática (Mrsny y Meizel, 1985).

También se han observado la disminución de la motilidad tras el lavado de espermatozoides epididimarios de ratón y su posterior incremento después de la adición de taurina (Fraser, 1986).

La taurina, aparte de ejercer un efecto positivo en la motilidad espermática, influye positivamente en la fecundación (Leibfried y Bavister, 1981) y en el desarrollo embrionario.

Pese al papel fundamental que la taurina parece tener en el mantenimiento de la motilidad espermática en hámster (Mrsny y col., 1979; Leibfried y Bavister, 1981), su presencia no es imprescindible en el ratón, lo que hace deducir diferentes respuestas a la adicción de taurina e hipotaurina en las diferentes especies (Fraser, 1986).

Ya desde las primeras investigaciones se observan efectos en la estimulación de la capacitación del espermatozoide de hámster (Mrsny y col., 1979), además la taurina y la hipotaurina pueden mantener y estimular la motilidad espermática así como estimular la capacitación y/o la reacción acrosómica (Meizel y col., 1980).

1.13. Actualidad de la congelación de semen de alpacas.

Los reportes sobre semen congelado son muy escasos a comparación con otras especies; pero la alpaca ha recibido una atención cada vez más creciente para la aplicación de biotecnologías reproductivas, pero pocos son los centros de investigación que se ocupan del desarrollo de este aspecto de la investigación en el Perú.

Hoy en día se sigue buscando las formas de elevar los parámetros seminales pos descongelación, como el problema de la viscosidad seminal que ha posibilitado la

utilización de numerosos protocolos que parcialmente han dado resultados alentadores.

Lamentablemente los trabajos que involucran mayores tecnologías en criopreservación se hacen en centros de investigación del extranjero con animales criados en sus respectivos países y el acceso a este conocimiento es dificultoso.

Aun así han surgido investigadores jóvenes que han visto una gran oportunidad en este campo de la biotecnología reproductiva.

Los fines de la congelación de semen de alpacas, hoy en día, no solamente se encaminan a su aplicación en inseminación artificial, sino en biotecnologías diversas y complementarias como su utilización en FIV, ICSI, vitrificación y transferencia de embriones.

El semen congelado ofrece distintas posibilidades para el avance tecnológico en la explotación de los camélidos sudamericanos y brindaría una mayor rapidez al progreso genético en esta especie.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Localización.

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 2735 m.s.n.m. a 13°10'09'' latitud sur y 74°11'53'' longitud oeste, con una temperatura promedio de 12 - 18 °C, precipitación pluvial promedio de 500 mm y humedad relativa de 40 – 50 % (SENAMHI, 2013).

2.2. Duración.

El trabajo de investigación tuvo una parte pre-experimental (febrero-marzo) y una experimental con una duración de 3 meses (abril-junio) que se realizó en el laboratorio de Reproducción Asistida de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA-Ayacucho.

2.3. Muestra.

Se trabajó un pool de 28 muestras de semen colectado de 4 alpacas machos de entre 4 a 6 años, entrenados previamente para aceptar maniquí. El número de muestras se designó de manera no estadística.

2.4. Materiales.

2.4.1. De laboratorio

- Agujas 21 G x 1 y 1/2", 18 G x 1 y 1/2"
- Cámara de Neubauer.
- Guantes de látex.
- Jeringas desechables de 1, 5, 10, 15 y 20 ml.
- Láminas cubreobjetos y portaobjetos.
- Pipetas automáticas de 0-10, 10-20, 20-100 y hasta de 1000 microlitros (ul).
- Pipetas estériles de 5 y 10 ml.
- Tips para micropipeta de diferentes capacidades.
- Tubos Falcón de 15 ml.
- Tubos Falcón de 50 ml.

2.4.2. Equipos y aparatos

- Balanza analítica.
- Bolsas plásticas.
- Equipo de Baño María.
- Esterilizador de calor húmedo (autoclave).
- Estufa.
- Frazadilla eléctrica.

- Gel ecográfico.
- Hervidor eléctrico.
- Inflador o bomba de aire.
- Microscopio.
- Platinas térmicas.
- Refrigerador.
- Sellador de bolsas.
- Tanque criogénico de nitrógeno líquido de 33 litros.
- Termocupla o termómetro de lecturas bajo cero.
- Termómetro de alcohol.
- Termómetro digital.
- Vagina artificial para alpaca.

2.4.3. De Campo.

- Alfombra de yute.
- Balde pequeño.
- Botas de jebe.
- Esponja pequeña.
- Lapiceros.
- Libretas de apuntes.
- Mameluco.
- Maniquí de alpaca.
- Registros de colección y evaluación.
- Rollos de cable eléctrico.

2.4.4. Material biológico.

- Huevo fresco de gallina.
- Semen de alpaca obtenido por colección con vagina artificial.

2.4.5. Medios y reactivos.

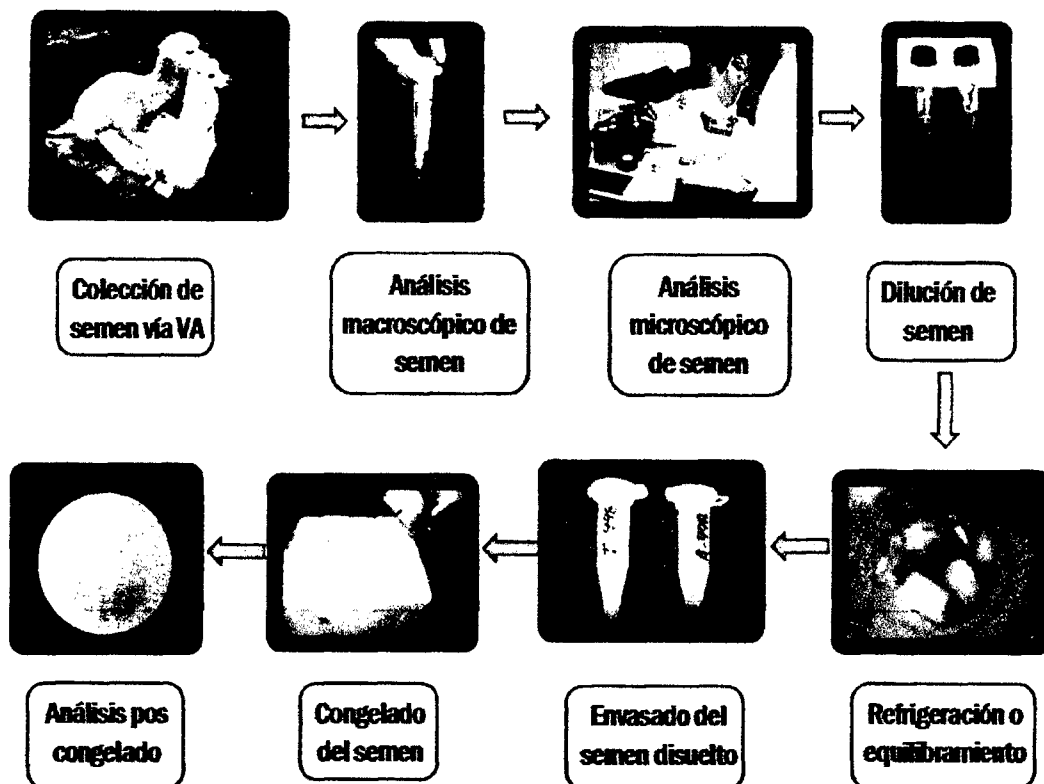
- Base tris (Hidroximetil amino metano).
- Crioprotector ETILENGLICOL.
- Dilutor ANDROMED.
- Ácido cítrico.
- Agua bidestilada.
- Fructosa.
- Taurina.
- Tinción vital (eosina y nigrosina)

2.4.6. Otros.

- Cámara digital.
- Cronómetro.
- Gorras descartables.
- Guardapolvo blanco
- Mascarilla quirúrgica.
- Regla.
- Rollos de papel toalla absorbente.
- Cintas maskingtape.
- Plumones.
- Alcohol.
- Suero fisiológico y formolado al 7 %.

2.4.7. Procedimiento experimental. Se realizó de la siguiente manera:

Figura N° 2.1. Flujo de congelación de semen de alpaca.



2.4.7.1. Preparación de la vagina artificial.

Los componentes de la vagina artificial previamente lavados y desinfectados se armaron conforme a los siguientes pasos:

- a. Se armó un tubo Falcon cuya capacidad fue de aproximadamente 15 ml con un cono de plástico, esto a fin de que el semen colectado se almacene en el tubo, esto se hizo previo al armado de la vagina artificial. El tubo Falcon se protegió con una funda a fin de mantener la temperatura del semen y evitar la exposición a la luz solar. Éste queda colocado en uno de los extremos de la vagina artificial.
- b. Se tomó una manguita de látex y se pasó por dentro del armazón de la V.A. doblandose el borde más cercano al pistón de aire sobre el cual se colocó el

- cono de plástico armado con anterioridad y se aseguró con tiras de hule de forma que no pudo escapar el agua ni el aire.
- c. Se colocó el agua atemperada entre 40 y 42 °C dentro del tubo calculando que llene hasta unos 3 centímetros debajo del borde superior. Se dobló el otro borde del látex y se sujetó fuertemente con otro hule.
 - d. Con la ayuda de una bomba de aire o inflador se insufló a una presión interna moderada en la vagina artificial por el pistón de aire.
 - e. Armada la vagina artificial se envolvió en una frazadilla eléctrica precalentada, conectada a una fuente de energía eléctrica cercana esto para ayudar a mantener la temperatura del agua constante.

2.4.7.2. Colección del semen.

La colección se hizo con un maniquí que simula la posición de hembra receptiva en el cual se colocó la vagina artificial armada conectada a una fuente de energía eléctrica a fin de conservar la temperatura. El maniquí se colocó en una superficie plana libre de contaminantes encima de una alfombra de yute.

A los sementales se les limpió el vientre y la parte del prepucio antes que suban al maniquí. Se tomó el tiempo de inicio de colecta y la finalización en cada animal, desde el momento en que el macho adoptó la posición de penetración con la pelvis muy pegada al maniquí, lomo encorvado.

2.4.7.2.1. Comportamiento en la cópula.

El patrón de apareamiento que se observó se puede clasificar en dos fases: una inicial de preparación y la segunda de cópula propiamente dicha. Durante la primera, el macho hace movimientos de acomodamiento sobre el maniquí, prolongándose algunos minutos. La segunda, en cambio, es de una duración mayor

y más variable durante la cual el macho introdujo el pene en la vagina artificial y realizó propiamente la cópula la cual se hizo en posición recumbente durante el cual el macho se ubicó levemente detrás del maniquí mostrando cambios deliberados durante la inserción peneana en la vagina artificial, con movimientos de pelvis y además se acompañó con sonidos guturales característicos conocidos como el “cutuneo” durante la cual muchas veces frotó el hocico con la parte del cuello del maniquí como se da en la cópula natural con la cual el macho trata de incentivar a la hembra con tales movimientos.

Esta conducta se prolongó de forma variable según sea la duración de la cópula. El macho que copuló de forma satisfactoria mantuvo curvada la parte del lomo, el “cutuneo” tuvo una intensidad variable en cada macho. Una vez el macho eyaculó éste se puso en pie y perdió todo interés en el maniquí por lo menos por algunos minutos. Algunos machos con libido exacerbado intentaron copular por segunda oportunidad.

2.4.7.3. Análisis laboratorial del semen.

El semen colectado se llevó al laboratorio lo más rápido posible y se colocó en el baño maría a fin de mantener la temperatura entre 36 y 36.5 °C.

2.4.7.3.1. Análisis macroscópico.

El semen colectado se analizó de forma visual en lo que respecta al volumen de eyaculado y espuma; color y aspecto; la filancia se midió con una regla graduada.

2.4.7.3.2. Análisis microscópico.

Motilidad. Se colocó una gota de semen sobre una lámina portaobjetos atemperada y se observó en el microscopio a un aumento de 100 y 400x.

Porcentaje de vivos (vitalidad).

Se tomó una gota de semen y una gota solución acuosa de tinción de eosina 5% y nigrosina 10% precalentada a 37 °C, se mezcló sobre una lámina portaobjetos atemperada y se realizó un frotis el cual se dejó secar y se observó al microscopio a un aumento de 400x, se contó vivos y muertos. Se hizo con un aumento mayor para observar espermatozoides muertos de color rojo violeta y vivos que se observan transparentes.

Concentración.

Con una jeringa de tuberculina se aspiró 0.9 ml de suero fisiológico formolado al 7%, luego 0.1 ml de semen.

Se vertió el contenido en un tubo de microcentrífuga y se pipeteó con la misma jeringa varias veces para dispersar uniformemente los espermatozoides y vencer la viscosidad del semen.

Se eliminó las 3 a 4 primeras gotas y el resto se utilizó para el análisis.

Se llenó el preparado en la cámara de Neubauer en el cual se hizo el conteo una vez los espermatozoides hubieran reposado por 5 minutos.

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

$$C=NxDx10\ 000$$

Donde:

C: Se determina en millones por ml.

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

D: Grado de dilución 0.1 ml de semen en 0.9 ml de suero fisiológico = 10.

2.4.7.4. Preparación de los dilutores.

2.4.7.4.2. Dilutor AndroMed®

Es un dilutor libre de yema de huevo indicado para procesamiento seminal de rumiantes, especialmente bovinos (Minitube, 2003).

AndroMed® contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (tilosina, gentamicina, espectinomicina, lincomicina).

El protocolo para congelación de semen en rumiantes recomendado por el fabricante es como se describe a continuación (Minitube, 2003):

Preparación del diluyente final: El contenido (200 ml) de un frasco de AndroMed® debe diluirse con 800 ml de agua destilada 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 con 1 parte de concentrado.

Para lograr las propiedades óptimas de conservación de AndroMed®, la cantidad requerida de agua debe agregarse al concentrado y no viceversa. El diluyente preparado AndroMed® debe temperarse antes de su uso en un baño-maría entre +30 °C y +32 °C.

Pre-dilución y análisis de semen: Inmediatamente tras su llegada al laboratorio, el eyaculado debiera ser evaluado (concentración, motilidad) y entonces pre-diluido 1+1. El eyaculado debiera mantenerse en el baño-maría entre +30 °C y +32 °C. Al momento de la dilución, el diluyente debe tener la misma temperatura que el eyaculado (+/-1 °C). El semen no debiera permanecer en el baño-maría por más de 10 minutos. Una vez evaluado debe efectuarse la dilución final. El eyaculado ha alcanzado hasta entonces la temperatura de laboratorio (+20 °C a +23 °C), y a esa temperatura es envasado en pajuelas. En forma alternativa, AndroMed® puede utilizarse para el envasado de las pajuelas a +5 °C. Para ello, el semen diluido debe ser equilibrado por al menos 2 a 3 horas a +5 °C

Congelación de pajuelas: La congelación de pajuelas se efectúa sobre rampas en vapor de Nitrógeno, a una altura de 4 cm sobre el nivel del Nitrógeno líquido, o en un congelador de semen profesional con una temperatura inicial de -120 °C. El proceso de congelación en un congelador automático debiera extenderse por al menos 7 minutos con mini-pajuelas de 0,25 ml y 10 minutos con pajuelas medianas de 0,5 ml (Minitube, 2003).

Este protocolo se modificó en algunos pasos para llevar un procedimiento uniforme para ambos tratamientos. Así para preparar 10 ml de dilutor, se tomó 8 ml de agua bidestilada por 2 ml de producto AndroMed®, siempre respetando la proporción recomendada. También se varió la temperatura de mantenimiento del eyaculado a 36.5 °C y se envasó en tubos de microcentrífuga a 5 °C y se congeló por aproximación al frío en un tanque de nitrógeno, como se detalla más adelante.

2.4.7.4.1. Dilutor yema de huevo de gallina al 20% v/v más taurina 30 Mm (milimolar).

En especial el componente taurina se calculó siguiendo un tratamiento especial para ser preparado en una solución molar la cual se consiguió según la fórmula (Clarke, 2011).

1Molar = peso molecular en gramos disuelto en 1 L de solvente.

Así para preparar 30 mM (0.03M) de taurina según su peso molecular (125.14g/mol) se necesita 3.8 gramos para un litro y consecuentemente 0.038 gramos para 10 ml.

Para la preparación de los dilutores se tomaron dos tubos Falcon rotulados cuya capacidad sobrepasaba 10 mililitros para los distintos protocolos o tratamientos en los cuales se colocaron los reactivos según las magnitudes indicadas para preparación de dilutores del Anexo 01. Cabe mencionar nuevamente que las cantidades indicadas fueron calculadas para la preparación de 10 ml de dilutor.

Seguidamente se agregó agua bidestilada, calculada sobre la diferencia de 10 mililitros y el volumen de la yema de huevo de gallina más el antibiótico, se homogenizó la mezcla hasta que los componentes sólidos se diluyeron completamente. El protocolo fue modificado del descrito para congelación de semen en ovinos (Aisen, 2002).

Se agregó el antibiótico.

Se tomó 2 ml de yema de huevo y se agregó a la solución y se homogenizó.

2.4.7.5. Dilución de semen y refrigeración.

Una vez aprovechado el semen para el análisis laboratorial se diluyó el semen de la siguiente manera:

Los dilutores se prepararon el mismo día y se atemperó en estufa o baño maría entre 36 y 36.5 °C.

Ambos dilutores fueron diluidos con el semen en cantidades iguales (proporción 1 a 1). Para este procedimiento tanto el semen y el dilutor se encontraban entre 36 y 36.5 °C, seguidamente se procedió atemperar la mezcla a temperatura ambiente laboratorial (hasta 22 °C aproximadamente) por espacio de 10 minutos, tratando de mantenerse en un parámetro de descenso de temperatura óptima de 0.5 a 0.6 °C/minuto para evitar el shock térmico. Pasado este lapso se llevó a refrigeración a fin que la temperatura baje a 5°C en aproximadamente una hora y media.

2.4.7.6 Envasado para congelación.

Para el llenado de los tubos de microcentrífuga “Eppendorf” el semen disuelto fue enfriado hasta 5°C y evaluado al microscopio para ver su motilidad espermática. Luego se llenaron en envases de 0.50 ml y se les tapó y rotuló con los respectivos tratamientos. Todo esto se realizó con materiales previamente enfriados. Los envases se colocaron en agua helada e inmediatamente llevados a congelación.

2.4.7.7. Congelación.

Los espermatozoides envasados se congelaron por la acción del frío dentro del tanque criogénico, temperatura más baja cuanto más próximo al nitrógeno líquido. Los tubos conteniendo el semen a 5 °C fueron secados perfectamente antes de ser colocados en una canastilla enfriada previamente adaptada para contener los tubos de microcentrífuga, para evitar la flotación de los tubos con el semen en el nitrógeno al momento de la inmersión final de la canastilla se adecuó una tapa con cinta maskingtape.

Para facilitar la lectura de las inmersiones se utilizó una regla graduada en centímetros en el extremo superior.

Los tubos colocados y tapados en la canastilla modificada se bajaron por tres veces a razón de 3 cm cada 5 minutos hasta su completa inmersión.

Vale decir que la canastilla se colocó a una altura de 10 centímetros sobre el nitrógeno líquido al principio del proceso de congelación.

Los dos tratamientos se congelaron simultáneamente utilizando la misma canastilla. Con este procedimiento de congelación de fácil aplicación se hizo descender la temperatura de manera gradual aunque no en parámetros estrictamente medidos y estandarizados.

2.4.7.8. Evaluación post descongelación.

El semen refrigerado a temperatura de 5 °C se evaluó en su motilidad antes de ser congelado.

La evaluación post descongelación de la motilidad se hizo tomando un tubo Eppendorf congelado de cada tratamiento pocos minutos después y sumergiéndolo en un termo conteniendo agua caliente a 38 °C por espacio de un minuto aproximadamente para descongelar el semen.

Se tomó algunas gotas las cuales se colocaron en una laminilla precalentada y se evaluó a aumentos de 100 y 400x.

2.5. Diseño estadístico.

Los datos de las variables tiempo de cópula, volumen de semen, volumen de espuma, filancia, motilidad, vitalidad y concentración espermática del eyaculado se reportan mediante estadísticos de tendencia central (promedio) y de dispersión

(desviación estándar, coeficiente de variabilidad y valores mínimo y máximo). Para analizar la motilidad en las diferentes etapas por efecto del dilutor utilizado se ha **analizado mediante un diseño completamente al azar (DCA)** cuyo modelo aditivo lineal (Kaps and Lamberson, 2004) es el siguiente:

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

Donde:

y_{ij} = Es la variable respuesta (motilidad).

u = Es la media general o constante común.

D_i = Es el efecto del factor dilutor.

e_{ij} = Es el error experimental o efecto ambiental no controlable del experimento.

Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey 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

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

3.1. Tiempo de cópula (minutos). Se midió desde el momento en el cual el semental introdujo el pene dentro de la vagina artificial, produciéndose una marcada curvatura del lomo, característico, hasta que se levanta del maniquí.

Cuadro N° 3.1. Tiempo de cópula.

N° de muestras	PROMEDIO ± D.E. (minutos)	MÍNIMO	MÁXIMO
28	15.61 ± 5.94	5.00	31.00

Los resultados del (cuadro 3.1.) demuestran que los tiempos de cópula promedio para los machos colectados fue de 15.61 minutos, estos resultados se encuentran muy cercanos a los parámetros obtenidos por (Dávalos y Olazábal, 2002) y (Bravo et al., 1997a) quienes obtuvieron 15.9 y 15.3 minutos respectivamente; sin embargo el resultado es superior al reporte de (Flores et al., 2002) que obtuvieron un

promedio de 12.3 minutos. Los resultados obtenidos no son iguales, son muy parecidos y ligeramente mayores, probablemente porque las colectas se hicieron en su mayor parte aún en la época reproductiva, en esta época la libido es acentuada y el animal puede permanecer más tiempo copulando, esto explica por qué se tuvieron lecturas superiores a los autores citados y también al hábito desarrollado por los sementales del presente trabajo que solamente son utilizados para la colección de semen por maniquí no permitiéndosele contacto con hembra alguna. Por otra parte los resultados son inferiores a los obtenidos por (Meza, 2011) y (Bravo et al., 1997b) quienes obtuvieron resultados muy parecidos entre si 21.65 ± 5.91 y 21.6 minutos respectivamente. (Cavalcanti, 2013) obtuvo 17.06 ± 8.01 minutos utilizando un tratamiento con aplicación de GnRH que aparentemente elevó los niveles de testosterona, esto nos permite afirmar que el tiempo de cópula está influenciada por la libido causado por factores hormonales estacionales.

3.2. Color.

Cuadro N° 3.2. Porcentaje de color en semen fresco.

COLOR	N° de muestras	%
Blanco claro	3	10.7
Blanco lechoso	25	89.3

Los resultados (cuadro 3.2.) demuestran que el eyaculado colectado por vagina artificial en el presente trabajo presenta un mayor porcentaje el color blanco lechoso que estuvo presente en un 89.3 %, seguido del color blanco claro presentándose en 10.7 %, esto en contraste con trabajos anteriores es superior para el color blanco lechoso (Alarcón et al., 2012; Bravo et al., 1997b), quienes obtuvieron color blanco lechoso en un 60 % en semen colectado por vagina artificial.

Estos resultados son explicados porque se obtuvieron mayormente eyaculados de concentración espermática de regular, buena y muy buena calidad superiores al 60 por ciento. Entonces esto se ajusta a la afirmación de que hay una relación positiva entre el color normal opaco o traslúcido y la concentración del semen (Huanca et al., 2011).

3.3. Volumen (ml).

Cuadro N° 3.3. Volumen de semen fresco.

N° de muestras	PROMEDIO ± D.E. (ml)	MÍNIMO	MÁXIMO
28	1.18 ± 0.78	0.20	3.00

Los resultados (cuadro 3.3.) demuestran que el volumen de eyaculado promedio de alpacas machos obtenidos mediante vagina artificial es 1.18 ± 0.78 ml, prácticamente iguales a los resultados obtenidos por (Cavalcanti, 2013) en condiciones similares, esta vez inicios de época reproductiva (noviembre y diciembre) quien obtuvo 1.17±0.91 ml y nosotros al finalizar la reproductiva, ambos períodos se caracterizan por disminución hormonal. Esto demostraría que el volumen seminal está influenciada por las épocas del año (Huanca et al., 2011). Nuestro resultado también es ligeramente inferior al volumen de semen de algunos trabajos previos de colección con el mismo método, como los reportes de (Flores et al., 2002); (Garnica et al.,1993); (Meza, 2011); (Alarcón et al., 2012) y (Bravo et al., 1997a) quienes obtuvieron promedios de 1.8 ± 0.8 ml; 1,7 ± 0,2 ml; 2.11 ± 1.06 ml; 1.5 ml y 1.5 ml respectivamente. Como rango menor se obtuvo 0.2 ml, muy

inferior a los mínimos reportados de 0.6 ml y 0.9 ml obtenidos por (Enríquez, 1994 y Bravo et al, 1996) respectivamente, esto indicaría que se pueden obtener eyaculados de volúmenes reducidos pero con parámetros espermáticos adecuados para la congelación. Al contrario se obtuvo como rango mayor 3 ml, superiores a los 2.8, 2.4 y 2.3 ml obtenidos, respectivamente, por (Sumar y Leyva, 1981); (Bravo et al., 2002) y (Baca, 1998), esto nos permite afirmar que los promedios de eyaculación se encuentran cerca de los 3 ml, aunque esporádicamente se puede obtener volúmenes muy elevados de hasta 12 ml en época reproductiva como señala (Sumar y Leyva, 1989).

También estos resultados nos permiten afirmar que los parámetros espermáticos se mantienen muy poco alterados sin importar la época del año ya que nuestro trabajo se realizó a fines de la temporada reproductiva a diferencia de los trabajos citados. Además el bajo promedio del volumen en el presente trabajo se deba probablemente a la presión de colección a los que fueron sometidos los sementales del estudio de hasta 4 veces a la semana ya que la frecuencia elevada de colectas afecta de forma negativa el volumen del eyaculado (Pacheco, 2008).

Sin embargo, el rango máximo para alpacas resulta inferior al comparar con el volumen obtenido de llamas 3.5 ml (Von Baer y Helleman, 1998) y 4 ml (Skidmore et al. ,2004), probablemente debido al mayor tamaño testicular y glándulas anexas que le ayudan a producir mayor cantidad de plasma seminal.

3.4. Volumen de espuma (ml).

Cuadro N° 3.4. Volumen de espuma en semen fresco.

N° de muestras	PROMEDIO ± D.E. (ml)	MÍNIMO	MÁXIMO
28	1.44 ± 1.98	0.00	7.00

Los resultados (cuadro 3.4.) demuestran que en el volumen de espuma promedio presente en el eyaculado de alpacas, en el presente trabajo de investigación fue de 1.44 ± 1.98 ml. Se ve un rango muy marcado, iguales en el mínimo 0 ml e inferiores en el rango superior a (Cavalcanti, 2013), quien encontró hasta un máximo de 14 ml y promedio de 3.03 ± 3.32 en colectas hechas con vagina artificial; sin duda estos resultados tan elevados se deben a que utilizó hasta 48 eyaculados para la evaluación elevando sus promedios y en nuestro caso solamente 28 minimizando el rango de ocurrencias de colectas seminales con volumen de espuma elevada.

Igualmente se tiene ausencia de espuma en 14 eyaculados (50%) lo cual es alentador pero nada comparables a colectas por electroeyaculación en los cuales la espuma está ausente prácticamente en la mayoría de los casos, lo que no sucede en colección con vagina artificial por los movimientos de rotación del pene y del proceso uretral que se mueve en el tubo de colección ya que el animal intenta simular lo que sucede en la hembra al eyacular en uno y otro cuerno uterino (Giuliano, 2012).

Aun así la colección de semen con vagina artificial presenta altos porcentajes de presencia de espuma (von Baer y Hellemann, 1998).

3.5. Filancia (cm).

Cuadro N° 3.5. Filancia en semen fresco.

N° de muestras	PROMEDIO ± D.E. (cm)	MÍNIMO	MÁXIMO
28	1.89 ± 1.17	1.00	4.00

Los resultados (cuadro 3.5.) demuestran que el promedio de la filancia de los eyaculados es de 1.89 cm, el que al contrastar con trabajos previos de colección de semen mediante vagina artificial resulta superior a los reportes de (Huanca et al., 2011) quienes reportaron un promedio de 0,99 cm. En cambio resultan inferiores a 2.08 ± 1.57 cm (Meza, 2011) y 2.23 cm reportados por (Naveros y Contreras, 2014), los últimos con los mismos machos pero hicieron el trabajo en época reproductiva, esto nos permitiría afirmar que la variabilidad de filancia difiere entre machos, épocas del año (Bravo et al., 1997a), pero esta filancia disminuye si se colecta repetidas veces (Bravo et al., 1997a) ,como parece indicar nuestro trabajo, y sin duda son propias de la especie (Giuliano, 2012).

El (cuadro 3.5.) además, nos muestra un rango de 1 a 4 cm, indicativo de la presencia de filancia en alguna medida en todas las muestras. Trabajos previos muestran igualmente la alta presencia de filancia como el rango máximo de 8 cm y promedio de 2.8 cm obtenidos por (Cavalcanti, 2013) e incluso en colectas vía electroeyaculación en especies como la vicuña se observa esto (Giuliano, 2002) lo que indicaría que la filancia es propia de semen obtenido mediante eyaculación.

El semen filante de los camélidos sudamericanos se debe a la secreción de proteína mucina 5B que se produce en su mayoría en las glándulas bulbo-uretrales, además

de la presencia de glicosaminoglucanos (GAG) que se encuentran en el plasma seminal 15 veces más elevado que en carneros y hasta 3 veces la cantidad que en humanos (Kershaw-Young y Maxwell, 2012).

3.6. Concentración espermática (millones/ml).

Cuadro N° 3.6. Concentración espermática en semen fresco.

N° de muestras	PROMEDIO ± D.E. (millones/ml)	MÍNIMO	MÁXIMO
28	134.5 ± 93.55	20.00	320.00

Los resultados (cuadro 3.6.) demuestran que el promedio de concentración espermática en el presente trabajo de investigación es de 134.5 ± 93.55 millones/ml en promedio, al comparar con trabajos de investigación previos colectando semen mediante vagina artificial, es superior a los reportes de (Huanca et al., 2011) y (Alarcón et al., 2012), quienes encontraron valores de 80,48 y 80.3 millones/ml respectivamente; incluso es superior a 112.36 ± 19.09 millones/ml encontrados por (Naveros y Contreras, 2014) en los mismos machos utilizados en el presente trabajo, cabe mencionar que este trabajo se hizo a finales de época reproductiva y aquel en la reproductiva. Sin embargo, es inferior a los reportes de (Garnica et al., 1993) y (Meza, 2011) quienes reportaron un promedio de 150 y 152.98 millones/ml. También se tiene reportes de hasta 339.4 millones/ml (Cárdenas et al., 1997), incluso mayores en ocasiones.

Las variaciones en la concentración espermática en el semen son atribuidas a diferencias inherentes a los machos, métodos de colección de semen y frecuencia

de colección, según (Tibary y Memon, 1999). La alpaca macho es capaz de producir eyaculados fértiles todo el año, pero al igual que en otras especies domésticas, la calidad del semen, se ve afectado por la estación del año y la disponibilidad del alimento (Montalvo et al., 1977).

3.7. Vitalidad espermática (%).

Cuadro N° 3.7. Vitalidad espermática en semen fresco.

N° de muestras	PROMEDIO ± D.E. (%)	MÍNIMO	MÁXIMO
28	88.00 ± 16.86	8.00	98.00

Los resultados (cuadro 3.7.) demuestran que la vitalidad de los espermatozoides obtenidas en el presente trabajo es de $88 \pm 16.86 \%$, la cual resulta similar a $78.27 \pm 5.88\%$ reportado por (Naveros y Contreras, 2014) probablemente porque se utilizaron los mismos machos para ambos trabajos; a la vez resultaron superiores a $66.50 \pm 12.42\%$ conseguido por (Cavalcanti, 2013) además de los reportes de (Dávalos y Olazábal, 2002); (Alarcón et al., 2012) y (Bravo et al., 1997b), quienes obtuvieron promedios de vitalidad de espermatozoides de alpaca de 72.1%, 70.8 % y 69.6 % respectivamente. Esto se debería al factor edad de los animales, mayor a los tres años que posibilitan los mejores rangos de calidad seminal, entre ellas de vitalidad (Medina y Bautista, 2012), además del estricto control de la temperatura y destreza que se consiguió durante el trabajo.

Aunque la presencia de espermatozoides vivos no necesariamente indican que estos espermatozoides sean funcionales (Petrunkina *et al.*, 2007), para lo cual se tiene que realizar pruebas complementarias.

3.8. Motilidad espermática en fresco (%).

Cuadro N° 3.8. Motilidad espermática en semen fresco.

N° de muestras	PROMEDIO ± D.E. (%)	MÍNIMO	MÁXIMO
28	79.6 ± 11.62	50.00	90.00

Los resultados (cuadro 3.8.) demuestran que la motilidad de semen promedio fue de 79.6 ± 11.62 %, al comparar con reportes de trabajos similares de colección de semen mediante vagina artificial es superior a los reportes de (Dávalos y Olazábal, 2002) y (Vencato et al., 2008) quienes obtuvieron una motilidad promedio de 34.2 ± 5.3 % y 33 ± 12 % respectivamente; igualmente siguen siendo superiores a los obtenidos por (Meza, 2011), (Cavalcanti, 2013) y (Naveros y Contreras, 2014), quienes obtuvieron 55.75 ± 9.63 %, 51.04 ± 19.05 % y 62.73 ± 6.47 %, este último resultado trabajando con los mismos machos. Esto se debe probablemente al rango mínimo considerado en 50 % de motilidad que elevó nuestro promedio.

Aun así es inferior a los resultados reportados por (Bravo et al., 1997b), quien obtuvo promedios de motilidad de semen de alpaca de 85 %; pero el promedio que encontramos es más que adecuado para la congelación de semen en camélidos sudamericanos (Aller et al., 2003).

Un factor que influye en la motilidad es el porcentaje de eyaculados viscosos, lo cual permite solamente motilidad oscilatoria (Sumar, 1983), además del método de evaluación propia de cada investigador que resulta muy subjetiva (Coulter y Foote, 1973).

También tiene influencia el tiempo de cópula, ya que tiempos más prolongados reducen significativamente la motilidad de los espermatozoides (Bravo et al., 1997a) ya que se reduce la fuente energética circundante necesaria para la actividad flagelar (Hafez, 2000).

3.9. Motilidad espermática de semen disuelto (%).

Cuadro N° 3.9. Motilidad espermática de semen disuelto, según tratamiento.

TRATAMIENTO	N° de repeticiones	PROMEDIO $\pm$ D.E. (%)	MÍNIMO	MÁXIMO
Dilutor Tris - Taurina	28	63.39 $\pm$ 16.16 ^a	30.00	85.00
Dilutor AndroMed®	28	67.86 $\pm$ 15.30 ^a	30.00	90.00

^aLiterales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

Los resultados (cuadro 3.9.) demuestran que la motilidad de semen disuelto promedio para el grupo Tris - taurina fue 63.39 $\pm$ 16.16 %, y grupo AndroMed® 67.86 $\pm$ 15.30 %, no existiendo diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre ambos tratamientos; no existen reportes similares de trabajos utilizando aminoácido taurina en dilutores en alpacas, pero sí se tienen reportes utilizando dilutor Tris-yema de huevo de gallina al 20 % como el 73.1 % obtenido por (Deza, 2004 citado por Ruíz 2011) y AndroMed® con 35 % de motilidad (Vaughan et al., 2003, citado

por Ruíz, 2011). En ninguno de nuestros tratamientos se observó desarrollo de motilidad progresiva probablemente por la persistencia de la viscosidad ya que esta desaparece por licuefacción entre 8 a 23 horas (Garnica et al., 1993). Al contrario se observó una marcada disminución de la motilidad de más del 10 por ciento en ambos tratamientos, esto se debe probablemente a factores de la viscosidad del semen que sigue manteniéndose imposibilitando la llegada del dilutor hacia la membrana espermática para que sus componentes desarrollen su acción crioprotectora.

3.10. Motilidad espermática de semen equilibrado a 5°C (%).

El semen disuelto se enfrió cuidando el rango de descenso de temperatura de 0.5 a 0.6 °C/minuto a fin de causar el mínimo shock térmico.

Cuadro N° 3.10. Motilidad espermática de semen equilibrado, según tratamiento.

TRATAMIENTO	N° de repeticiones	PROMEDIO ± D.E. (%)	MÍNIMO	MÁXIMO
Dilutor Tris - taurina	28	48.39 ± 20.46 ^a	5.00	80.00
Dilutor AndroMed®	28	56.18 ± 17.00 ^a	13.00	80.00

^aLiterales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa (p≥0.05).

Los resultados (cuadro 3.10.) demuestran que la motilidad de semen equilibrado promedio para el grupo Tris - taurina fue 48.39 ± 20.46 %, y grupo AndroMed® 56.18 ± 17.00 %, no existiendo diferencia significativa (p≥0.05) entre ambos tratamientos; no existen reportes similares de trabajos utilizando aminoácido

taurina como aditivo de dilutor alguno en camélidos, pero sí en perros, donde se reporta una motilidad total de $88,94 \pm 3,94 \%$ en dilutor Tris-yema de huevo de gallina con la misma proporción de componentes, durante 24 horas de refrigeración (Andrade Martins, 2005). Reportes en alpacas utilizando dilutor Tris-yema de huevo al 20 % dan $57.25 \pm 12.9 \%$ (Meza, 2011) al momento de llegar a los 4 °C, y en otro estudio con equilibramiento de 3 horas se obtuvo una motilidad de 63 % (Salinas, 1999) y 72.3 % (Deza, 2004), valores superiores a lo encontrado. En ningún momento se observa un mantenimiento de motilidad con el tratamiento dilutor en base a Tris con yema de huevo de gallina y taurina. Esto probablemente se debe a que la taurina no posea un efecto crioprotector evidente en esta especie. Los rangos de descenso de temperatura cercanos a los 15 °C son muy críticos para cualquier espermatozoide pudiendo causar un choque térmico ya que la membrana espermática pasa de un estado líquido cristalino a un estado de gel (Graham y Foote, 1987) y a partir de esta etapa se ve el efecto benéfico de los crioprotectores, lo que no sucede en este caso.

Por otra parte los reportes de motilidad de semen en equilibramiento con dilutor AndroMed® en alpacas hechos por (Naveros y Contreras, 2014) da $57.73 \pm 6.84 \%$ lo que se muestra parecido a nuestros resultados, probablemente porque se utilizaron colectas procedentes de los mismos machos para ambos estudios y se usó la misma metodología para congelación. (Vaughan et al., 2003) reporta un 32 % de motilidad, inferior al promedio obtenido en el presente trabajo para AndroMed®, pero no reporta cuánto fue la motilidad inicial.

3.11. Motilidad espermática de semen descongelado (%).

La eficacia de los diferentes crioprotectores penetrantes, como el etilenglicol en el primer dilutor y la presencia de glicerina contenida en el dilutor AndroMed®, se debe a que estos pueden cubrir la totalidad de la anatomía del espermatozoide, tanto interna y externa a la membrana espermática (Mazur, 1984).

Cuadro N° 3.11. Motilidad espermática de semen descongelado, según tratamiento.

TRATAMIENTO	N° de repeticiones	PROMEDIO ± D.E. (%)	MÍNIMO	MÁXIMO
Dilutor Tris - taurina	28	11.68 ± 12.92 ^a	0.00	60.00
Dilutor AndroMed®	28	16.96 ± 10.48 ^a	0.00	40.00

^a Literales similares en la misma columna indican que no hay diferencia significativa ($p \geq 0.05$).

Los resultados (cuadro 3.11.) demuestran que la motilidad de semen descongelado promedio para el grupo Tris - taurina fue 11.68 ± 12.92 %, y grupo AndroMed® 16.96 ± 10.48 %, no existiendo diferencia significativa ($p \geq 0.05$) entre ambos tratamientos.

Resultados conseguidos utilizando eyaculados de los mismos animales del presente trabajo de investigación (Naveros y Contreras, 2014) mostraron una motilidad de 26.18 ± 8.27 % para dilutor AndroMed®, resultados superiores que nos permitirían afirmar que la glicerina aparentemente tiene una mejor crioprotección en los espermatozoides de alpaca, además los altos índices conseguidos en especies bovinas (Janett, F. et al., 2005) serían extrapoladas a la alpaca con resultados

aceptables. Por otra parte estudios hechos con dilutores conteniendo etilenglicol reportan $6.2 \pm 5.8 \%$ (Choez et al., 2014) y $17.0 \pm 4.3\%$ (Banda et al., 2010). El primero a 7 % de concentración (1.25 M) y el último en concentración de 1.2 % (0.2 M). La correlación directa entre la concentración de etilenglicol y la motilidad espermática indica que es factible utilizar etilenglicol a concentraciones mucho menores al 7 por ciento, cantidad igual a la utilizada en este trabajo de investigación que explicaría la baja motilidad lograda a la lectura post descongelado. Los reportes provienen de trabajos en semen obtenido de epidídimo los cuales parecen no tener diferencia significativa con semen entero (Rodríguez, 2009). En congelación de semen en equinos esto se ha demostrado, así se puede utilizar concentraciones menores al 3 % con resultados iguales a la glicerina (Mantovani et al., 2002), igualmente se han logrado parámetros altos de motilidad en ovinos (Molinia et al., 1994).

El efecto de la taurina en esta etapa también no muestra tener efectividad en mantener la motilidad espermática y resulta indiferente, aunque es sabido que los efectos de los aminoácidos son independientes de crioprotectores (Trimeche y col., 1999).

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Ninguno de los dos protocolos demostró tener efectividad en mantener la motilidad espermática en el proceso de congelación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*), observándose un drástico descenso desde la motilidad inicial.
- Se determinó que no existen diferencias significativas en las características macroscópicas y microscópicas de semen con otros trabajos de investigación o protocolos en alpacas.
- Se determinó el porcentaje de motilidad post descongelamiento resultando 11.68 ± 12.92 % para el protocolo Tris-yema de huevo de gallina más aminoácido taurina y 16.96 ± 10.48 % para el dilutor comercial AndroMed®, inferiores en ambos protocolos a parámetros logrados en trabajos similares.
- Se determinó que la adición de 30 milimolar de taurina en dilutor Tris-yema de huevo de gallina no aumenta ni mantiene de forma satisfactoria los índices de motilidad espermática y que el dilutor AndroMed® resulta ser mejor pero no significativamente.

4.2. Recomendaciones.

Los resultados del presente trabajo de investigación permiten recomendar lo siguiente:

- Continuar con trabajos de investigación similares con el objetivo de estandarizar protocolos de congelación de semen en alpacas a fin de obtener mayores parámetros de calidad espermática como la utilización de espermatozoides procedentes del epidídimo, separación del plasma seminal o degelificación del semen utilizando enzimas.
- Utilizar dilutores comerciales y modificarlos mediante la adición de componentes de probada acción benéfica en congelación de semen en otras especies como aminoácidos diversos, surfactantes y antioxidantes.
- Utilizar en la investigación semen procedente de machos entrenados durante todas las épocas del año, ya que esto no reduce los parámetros espermáticos significativamente.

V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

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).

Aller J., Rebuffi G., Kancino A. y Alberio R. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama. *Arch. Zootec.* 52: 15-23.

Alvarez J. G. y Storey B. T. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 29: 548-555.

Amann R. y Pickett B. 1987. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 7: 145-176.

Anchordoguy T. J., Rudolph A. S., Carpenter J. F. y Crowe J. H. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24: 324-331.

Andrade Martins A. C. 2005. Influencia en la calidad espermática de la adición de distintas concentraciones de Crioprotectores para la conservación del semen canino. Tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid.

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 Pág. 102.

- Banda J., Evangelista S., Ruiz L., Sandoval R., Rodríguez C., Valdivia M, Santiani A. 2010.** Efecto de dilutores en base a tris, tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev. Inv. Vet Perú*, 21 (2), 145-153.
- Blackshaw A. W. 1954.** The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust Journ of Biol Sci* 7: 573-582.
- Bravo P. W. 2002.** The reproductive process of south american camelids. Framagann Grafics. Utah-USA. Pág. 53.
- Bravo P. W., Skidmore J. A. y Zhao, X. X. 2000.** Reproductive aspects and storage of semen in camelidae. *Animal Reproduction Science* 62. 173-193.
- Bravo P. W., Ordoñez C. y Alarcón V. 1996.** Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. 13th Int. Congr. Anim. Reprod., Sydney pp. 2-3.
- Bravo P. W., Fowler M. E., Stabenfeldt G. H., Lasley, B. L. y Frey R. 1992.** Testis growth and testosterone concentrations in the male llama. *Proc. 12th ICAR*.
- Bravo W., Flores D. y Ordóñez, C. 1997a.** Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. *Biol. Reprod.* 57, 520-524.
- Bravo W., Flores U., Garnica J. y Ordóñez C. 1997b.** Collection of semen and artificial insemination of alpaca. *Theriogenology* 47, 619-626.
- Bravo W., Moscoso R., Alarcón V. y Ordoñez. 2002.** Ejaculatory process and related semen characteristics of llamas and alpacas. *J. of Androl.* 48:65-72.
- Buff S., Donzé A., Guérin P., Guillaud J., Fontbonne A. y Ménéz J. 2001.** Taurine and hypotaurine in spermatozoa and epididymal fluid in cats. *J Reprod Fertil Suppl* 57: 93-95.

- Bustanza V. 2001.** La alpaca. Conocimiento del gran potencial andino. Oficina de Recursos del Aprendizaje. UNA. Puno-Perú.
- Callo M, Garnica J, Bravo W. 1999.** Efecto de la fibrinolisis, hialuronidasa, colagenasa y tripsina sobre la viscosidad del semen en alpacas. En: II Congreso Mundial sobre camélidos. Cusco, Perú.
- Cárdenas H., Vivanco, W. y Bravo, F. 1987.** Comparativo de dos métodos de colección de semen en alpacas. Resúmenes X reunión científica anual Asoc Peruana. Prod. Anim., 86, Puno, Perú.
- Casslén B. G. 1987.** Free amino acids in human uterine fluid-possible role of high taurine concentration. J of Reproductive Medicine 32: 181-184.
- Cavalcanti G. 2013.** “Efecto de la administración de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) en la calidad seminal de alpacas (*vicugna pacos*), CIP – Quimsachata – puno 2012” Tesis Med. Vet. UNSCH.
- Choez K., Evangelista S., Ruiz L., Sandoval R. y Santiani A. 2014.** Efecto de la concentración de tres crioprotectores sobre la motilidad, viabilidad e integridad acrosomal de espermatozoides criopreservados de epidídimo de alpaca. *Spermova*.; 4(1): 80 - 82
- Clarke E. 2011.** Manual de prácticas de biología de la reproducción, UACJ, México, Pág. 93
- Coulter G. H. y Foote R. H. 1973.** cambios de los espermatozoides durante el procesamiento en pajillas. J. Animal. Sci, 37: 306 (abs).
- Dávalos R. y Olazábal, J. 2002.** Evaluación de dos Formas de Colección de Semen en Alpacas. Rev Inv Vet Perú: 13 (2): 98-99

- Deza H. 2004.** Conservación de espermatozoides obtenidos a través del conducto deferente de alpacas (*Lama pacos*) y llamas (*Lama glama*) y su posterior viabilidad. Tesis Med. Vet. Zoot. UNA. Puno-Perú. Pág 71.
- Enriquez U. 1994.** Evaluación del semen colectado a diferentes tiempos con vagina artificial en alpacas. Tesis Med. Vet. Zoot. UNA. Puno-Perú. Pág. 77.
- Fahy G. M., Lilley T. H, Linsdell H., John Douglas M. S. T. y Meryman H.T. 1990.** Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. *Cryobiology* 27: 247-268.
- Fellman J. H. y Roth E. S. 1985.** The biological oxidation of hypotaurine to taurine: hypotaurine as an antioxidant. *Prog Clin Biol Res* 179: 71-82.
- Fernández-Baca S. y Calderón M. 1966.** Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM.* 18–20:13-26.
- Fernández-Baca S., Maden D. H. L. y Novoa C. 1970.** Effect of diferent mating on induction of ovulation in the alpaca. *J. Reprod. Fert.* 22: 261-267.
- Flores P., García-Huidobro J., Muñoz C. B., Bustos-Obregón E. Y Urquieta B. A. 2002.** Alpaca semen characteristics previous to a mating period *Animal Reproduction Science* 72: 259–266.
- Fraser L. R. 1986.** Both taurine and albumin support mouse sperm motility and fertilizingability in vitro but there is no obligatory requirement for taurine. *J Reprod Fert* 77: 271-280.
- Gallina C. y Valencia J. 2006.** Reproducción de animales domésticos, 2da.Ed. Limusa, Noriega editores, México.
- Gao D. Y., Liu J., Liu C., McGann L. E., Watson P. F., Kleinhans F. W., Mazur P., Critser E. S. y Critser J. K. 1995.** Prevention of osmotic injury to human

spermatozoa during addition and removal of glycerol. Human Reprod 10: 1109-1122.

García Vera. 2005. Manual del técnico alpaquero. ITDG. Pág. 25.

Garnica J., Achata R. y Bravo W. 1993. Physical and biochemical characteristic of alpaca semen. Anim Reprod Sci 32: 85-90.

Gaully M. y Leindinger H. 1995. Semen quality characteristics, volume distribution and hypo-osmotic sensitivity of spermatozoa of Lama glama and Lama guanicoe. In Gerken M, Renieri C. Eds: Procc. 2nd European Symposium on South American Camelids. Universita Degli Studi Di Camerino. Pp 235-244.

Giuliano S., Spirito S. E., Miragaya M. H., Captivieille F. E., Agüero A, Boquet M. D. y Ferrrari M. D. 2002. Electroeyaculation and seminal parameters in vicuña (vicugna pacos).theriogenology (abstract)

Giuliano S. M. 2012. Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericano. Spermova 2(1): 6 – 9

Gonzáles H. 2008. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. Scientia Vol. X. N° 10.

Graham, J. K. y Foote, R. H. 1987. Effects of several lipids, fatty acil chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. Cryobiology 24: 42-52.

Guérin P., Guillaud J. y Ménézo Y. 1995. Hypotaurine in spermatozoa and genital secretions and its production by oviduct epithelial cells in vitro. Human Reproduction 10: 866-872.

Guthrie H. D., Liu J. y Critser J. K. 2002.Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. Biol Reprod 67: 1811-1816.

- Hafez E. S. E. 2000.** Reproducción e inseminación artificial en animales. Mc Graw Hill. Séptima edición. México D. F. - México.
- Hammerstedt R. H., Graham J. K. y Nolan J. P. 1990.** Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88.
- Hofmo P.O. y Berk K. A. 1989.** Electron microscopical studies of membrane injuries in blue fox spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing. *Cryobiology* 26: 124-131.
- Holt W. V. 2000.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62: 3-22.
- Huanca T. y Mamani R. H. 2013.** Producción de reproductores con evaluación genética en alpacas. INIA-CONCYTEC. Puno-Perú. Págs. 9 y 13.
- 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.
- Huanca T. 1996.** Manual del alpaquero, Serie Manual, INIA. Lima-Perú. Pág. 53.
- Huanca, T. 2013.** Uso de la biotecnología reproductiva en la conservación de los recursos genéticos: banco de germoplasma ex situ. Ponencia III Congreso Peruano de Reproducción Animal. Lima-Perú
- Huanca W. y Gaulty M. 2001.** Conservación de semen refrigerado de llamas. *Rev. Inv. Vet. Perú Supl* 1: 460-461.
- INEI. 2013.** Resultados definitivos: IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Lima-Perú.

Janett F., Fuschini E., Keo S. y Thun R. (2005). Comparison of AndroMed® and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of buck semen. ESDAR Conference, Murcia.

Johnson L. A., Pursel V. G., Gerrits R. J. y Thomas C. H. 1972. Free amino acid composition of porcine seminal, epididymal and seminal vesicle fluids. J Anim Science 34: 430-434.

Johnson L. W. 1989. Llama reproduction. In: Johnson, L.W. _Ed., Llama Medicine, The Veterinary Clinics of North America. Saunders, Philadelphia, PA, pp. 159–182.

Kampschmidt R. F., Mayer D. T. y Herman H. A. 1953. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. J Dairy Sci 36: 733-742.

Kaps M. y Lamberson W. R. 2004. Biostatistics for animal science. cabi publishing, Cambridge, USA.

Kershaw-Young C. M. y Maxwell W. M. C. 2012. Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species. Reprod Dom Anim 47 (Suppl. 4), 369–375

Kochakian C. D. 1975. Free amino acids of sex organs in the mouse: regulation by androgens. Am J Physiol 228: 1231-1235

Kubiceck J. 1974. Sanementnahme beim alpaka durch eine harnrihrenfistel. Z Tierzuechtung Zuechtungsbiologe 90:335.

Leibfried M. L. y Bavister B. D. 1981. The effects of taurine and hypotaurine on in vitro fertilization in the golden hamster. Gamete Research 4: 57-63.

- Lobo M., Alonso J. y Martín del Río R. 2000.** Immunohistochemical localization of taurine in the male reproductive organs of the rat. *J of Histochemistry & Cytochemistry* 48: 313-320.
- Mantovani R.; Rota A., Falomo M. E., Bailoni L. y Vincenti L. 2002.** Comparasion between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: sperm quality assessment wiht standard analyses and wiht the hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev* 42: 217-226
- Marín J. C., Zapata B., González B. A., Bonacic C., Wheeler J. C. y Casey C. 2007.** Systematics, taxonomy and domestication of alpacas and llamas: new chromosomal and molecular evidence. *Revista Chilena de Historia Natural* 80 (2): 121 – 140.
- Mazur P. 1984.** Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 247: 125-142.
- McEvoy T. G., Kyle C. E. y Slater D. 1992.** Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *J. Reprod. Fert.* 9: 48
- Medina G. y Bautista J. L. 2012.** Calidad de semen por edad fisiologica de la alpaca resúmenes y trabajos VI congreso mundial de camélidos sudamericanos arica-chile.pg 60.
- Meizel S., Lui C. W., Workin P. K. y Mrsny R. J. 1980.**Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm in vitro and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. *Develop Growth and Differ* 22: 483-494.
- Mellisho E. 2010.** Manual de Laboratorio de Reproducción animal. UNALM. 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 – INIEA – distrito de Santa Lucía-Puno a 4,200 msnm.2008. Tesis Med. Vet. UNSCH.
- MINITUBE, 2003.** : <http://www.minitub-iberica.com/var/StorageMinitube/>
- Molinia F. C., Evans G. y Maxwell W. M. C. 1994.** Incorporating of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Therio* 42: 849-858.
- Montalvo C., Cevallos E. y Copaira N. 1977.** Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. In: proc V Cong Nac de Cienc Veterinarias, Arequipa, Perú.
- Morton K. M., Bathgate R., Evans G., Maxwell W.M.C. 2007.** Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate based, Tris-based and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fert Dev* 19: 792-796.
- Mrsny R. J. y Meizel S. 1985.** Inhibition of hamster sperm Na^+ , K^+ -ATPase activity by taurine and hypotaurine. *Life Sciences* 36: 271-275.
- Mrsny R. J., Waxman L. y Meizel S. 1979.** Taurine mantains and stimulates motility of hamster sperm during capacitation in vitro. *J exp Zool* 210: 123-128.
- 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*, Apurimac – Perú. Pág 244
- Ozasa H. y Gould K. G. 1982.** Protective effect of taurine from osmotic stress on chimpanze spermatozoa. *Archives Andrology* 9: 121-126.

- Pacheco, J. 2008.** Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 2008 Volumen IX Número 5.
- Paricahua E. 2001.** Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. Tesis Med. Vet. Zoot. UNA. Puno-Perú.
- Parks J. y Graham J. 1992.** Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology 38: 209-222.
- Petrunkina A. M., Waberski D., Günzel-Apel A. R. y Töpfer-Petersen E. 2007.** Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. Review of Reproduction. Reprod Fert 134:3-17.
- Phillips P. H. y Lardy H. A. 1940.** A yolk-buffer pabulum for the preservation of bull semen. J Dairy Science 23: 399-404.
- Polge C., Smith A. y Parks A. 1949.** Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164: 666.
- Quintano J. 2002.** Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (lama pacos) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis Med. Vet. Zoot. UNA. Puno-Perú.
- 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. Pág. 72.
- Ruíz J. 2011.** Producción y tecnología en camélidos sudamericanos. “Proyecto FOCAM: Establecimiento de un protocolo de vitrificación de ovocitos de alpaca (*vicugna pacos*)”
- Salinas J. 1999.** Niveles óptimos de glicerina en la congelación de semen de alpacas. Tesis Ing. Zoot. UNSAAC. Cuzco-Perú Pág. 62

Santiani A., Huanca W., Sapana R., Huanca T., Sepúlveda N. y Sánchez R. 2005. Effects of the quality of frozenthawed alpaca (*Lama paco*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J. Androl.* 7(3):303-309.

SAS Institute INC. *SAS/STAT*® 9.2 2009. User's Guide, Second Edition. Cary, NC.

SENAMHI, 2013: <http://www.senamhi.gob.pe/site/tesis/>

Shaffer S., Takahashi K. y Azuma J. 2000. Role of osmorregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* 19: 527-546.

Skidmore J. A., Billah M., Short L. V. y Allen W. R. 2004. Hibridization of new worl 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.

Solis R. 2001. Producción de camélidos sudamericanos. Imprenta Ríos. Huancayo – Perú.

Sumar J. y Leyva A. V. 1981. Colección de semen mediante la vagina artificial en alpaca. Proceeding of the IVth International Conference on South America Camelids. Punta Arenas – Chile. 12 pp.

Sumar J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. MSc. thesis. Fac. Med. Vet. Swedish University of Agric. Sci. Uppsala.

Sztejn J. M., Noble K., Farley J. S. y Mobraaten L. E. 2001. Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryoprsvation. *Cryobiology* 41: 28-39.

Tibary A. y Memon M. A. 1999. Reproduction in the male South American Camelidae, *J. Camel Prac. Res.* vol. 6, pp.235-248.

- Trimeche A., Yvon J. M., Vidament M., Palmer E. y Magistrini M. 1999.** Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Therio* 52: 181-191.
- Valdivia M., Ruíz M., Bermúdez L., Quinteros S., Gonzáles A., Manosalva I., Ponce C., Olazabal J., Dávalos R. 1999.** Criopreservación de semen de alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.
- Van Der Horst C. J. G. y Grooten H. J. G. 1966.** The occurrence of hypotaurine and other sulfur-containing aminoacids in seminal plasma and spermatozoa of boar, bull and dog. *Biochimica Et Biophysica Acta* 117: 495-497.
- Vaughan J. L. y Tibary A. 2006.** Reproduction in female South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research* 61:259–281.
- Vaughan J., Galloway D. y Hopkins D. 2003.** “Artificial insemination de alpacas”. Rural Industries Research y Development Corporation. 2003. Publicación N° 03/104. Edición. publicación N° 03/104. Australia.
- Vencato J., Ponce D., Huamán E., Gamarra G., Vivanco W. 2008.** Comparación de tres métodos de colección de semen en alpacas. Resúmenes reunión científica anual de la asociación peruana de producción animal APPA. UNALM. Lima- Perú.
- Vivanco W., Foote W. y Pinares C. 1985.** Estudio del desarrollo de algunas características reproductivas en alpacas machos “Huacaya” en la sierra central del Perú, del nacimiento a los 13 meses de edad y sus correlaciones con el desarrollo corporal. V Conv. Internac. Cam. Sudam. Cusco, Perú. p 5.
- Von Baer L. y Hellemann C. 1999.** Cryopreservation of llama (*Lama glama*) semen, *Reprod. Domest. Anim.* Vol. 34, pp. 95-96.

Waberski D., Weitze K. F., Rath D. y Sallmann H. P. 1989. Wirkung von bovinem Serumalbumin und Zwitterionenpuffer auf flussigkonservierten Ebersamen. *Zuchthygiene* 24, 126–133.

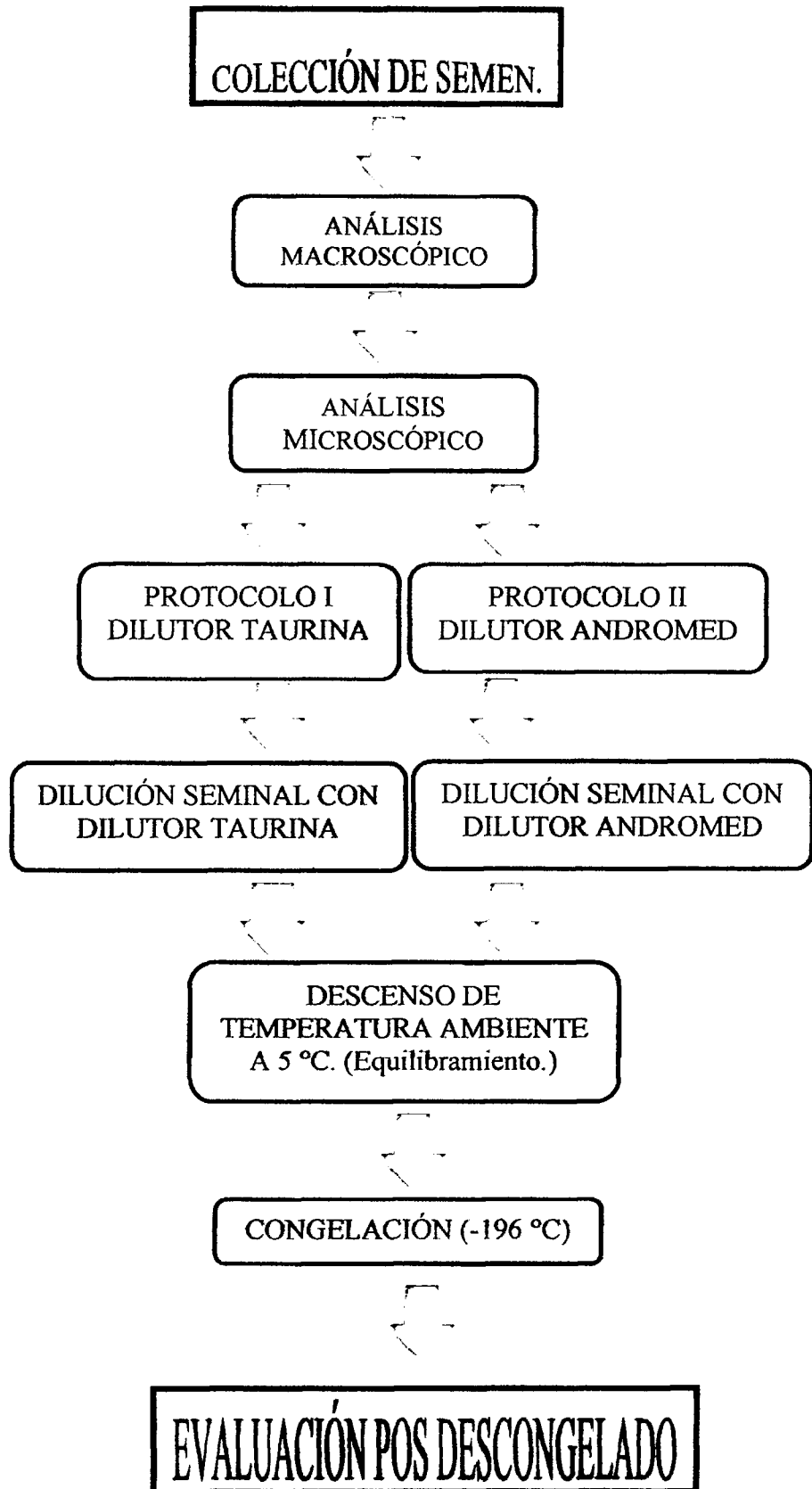
Watson P. 1979. The preservation of semen in mammals. In: *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, Finn, C. A. ed. Oxford University Press, Oxford, pp 283-350.

Watson P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fert Dev* 7: 871-891

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.

VI. ANEXOS.

ANEXO N° 01. Diagrama de ejecución del trabajo de investigación.



ANEXO N° 02. Composición de los dilutores utilizados.

Cuadro N° 6.1. Componentes del dilutor Tris – yema de huevo de gallina más taurina 30mM.

COMPONENTES	CANTIDAD (Para 10 ml)
Tris.	0.3 g
Ácido cítrico.	0.19 g
Fructosa.	0.05 g
Taurina.	0.038g
Yema de huevo.	2 ml
Agua bidestilada.	8 ml
Penicilina 5000 UI, Estreptomicina 5 mg/ml.	0.01 ml
Etilenglicol.	7% V/V(700 µl)

Cuadro N° 6.2. Componentes del dilutor AndroMed®

COMPONENTES	CANTIDAD
Fosfolípidos.	Desconocida.
Tris.	Desconocida.
Ácido cítrico.	Desconocida.
Azúcares.	Desconocida.
Antioxidantes.	Desconocida.
Tampones.	Desconocida.
Agua ultrapura.	Desconocida.
Tilosina.	Desconocida.
Gentamicina.	Desconocida.
Espectinomicina.	Desconocida.
Lincomicina.	Desconocida.
Glicerina	Desconocida.

Fuente: MINITUBE, 2003.

ANEXO 03. Resultados del trabajo de investigación.

Cuadro N° 6.3. Resultados de colección, análisis, procesamiento y congelación semen de alpaca con dos tratamientos.

N° DE COLECTA	Tiempo de cópula	ANÁLISIS MACROSCÓPICO				ANÁL. MICROSCÓPICO				MOTILIDAD							
		VOL. (ml)	ESPUMA. (ml)	FILANCIA	COLOR	% MOTILID.	% VIVOS	% MUERTOS	CONC. Mill/ml	DISUELTO		T° AMBIENTE		A 5 °C		DESCONGEL	
										Taurina	Andromed	Taurina	Andromed	Taurina	Andromed	Taurina	Andromed
1	11	1.5	1	4	B.LECHOSO	90	80	20	110	60	50	50	40	30	40	30	20
2	16	2	5	2	B.LECHOSO	70	75	25	20	60	60	40	50	5	30	0	5
3	19	1	0.5	4	B.LECHOSO	90	96	4	240	75	80	75	80	75	80	20	40
4	13	0.5	0.5	1	B.LECHOSO	85	95	5	48	70	70	65	70	60	70	15	15
5	23	1	0	1	B.CLARO	90	93	7	210	80	80	70	70	60	70	10	15
6	16	1.5	0	4	B.LECHOSO	90	80	20	110	50	60	50	60	40	50	20	30
7	21	3	1	1	B.LECHOSO	80	97	3	146	85	70	70	70	60	60	5	5
8	15	3	7	2	B.LECHOSO	80	98	2	155	60	80	60	70	60	70	5	0
9	15	0.2	0	1	B.LECHOSO	90	97	3	285	80	80	80	80	70	70	30	10
10	5	2	1	2	B.CLARO	50	98	2	24	40	40	40	40	30	40	2	5
11	12	1	0	1	B.LECHOSO	80	98	2	117	80	80	80	80	80	60	60	20
12	25	1	0	1	B.LECHOSO	50	86	14	52	30	40	30	40	20	40	0	20
13	15	0.5	0	1	B.LECHOSO	80	95	5	72	70	70	70	70	60	70	10	25
14	23	1	0	1	B.LECHOSO	80	93	7	190	70	80	70	80	70	70	5	20
15	21	2	1	1	B.LECHOSO	90	96	4	320	60	80	60	70	50	60	10	20
16	12	0.4	1	1	B.LECHOSO	90	85	15	210	80	80	80	80	20	30	0	10
17	31	0.2	4	1	B.LECHOSO	80	93	7	200	50	60	50	60	60	60	5	25
18	15	1	4	4	B.LECHOSO	70	87	13	22	50	50	50	50	40	50	5	10
19	11	2	0	2	B.LECHOSO	70	86	14	111	30	50	20	40	15	13	0	5
20	15	1	4	3	B.LECHOSO	85	85	15	200	60	75	50	60	40	60	10	30
21	19	0.2	5	1	B.LECHOSO	80	95	5	50	70	70	60	70	50	70	10	30
22	5	1	1	2	B.LECHOSO	90	97	3	303	80	80	80	80	70	80	5	10
23	14	1.5	0	4	B.LECHOSO	80	90	10	53	50	70	60	70	60	50	10	10
24	16	2	1	2	B.CLARO	60	8	20	27	40	30	40	30	20	30	10	20
25	13	1	0	1	B.LECHOSO	90	90	10	276	85	85	70	80	70	70	30	40
26	5	0.5	0	1	B.LECHOSO	70	86	14	66	70	70	50	60	30	50	5	10
27	13	0.8	3	3	B.LECHOSO	80	94	6	57	60	70	60	70	50	60	5	10
28	18	0.3	0	1	B.LECHOSO	90	91	9	92	80	90	80	90	60	70	10	15

Gráfico N° 6.1. Proporción de color en el total de los eyaculados.

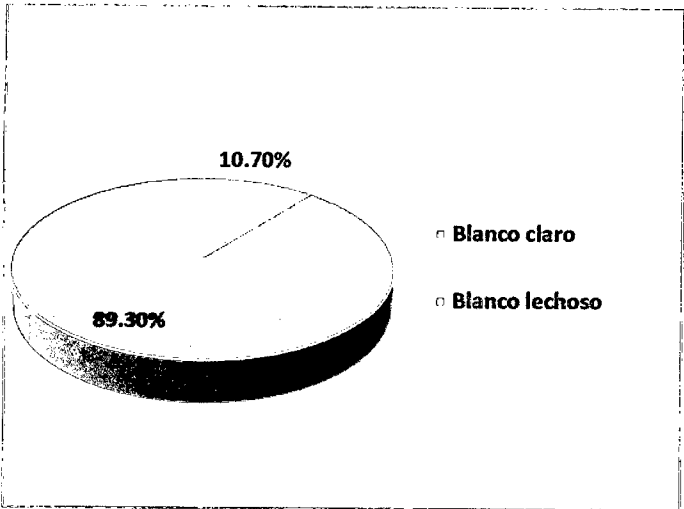


Gráfico N° 6.2. Tiempo de cópula (minutos).

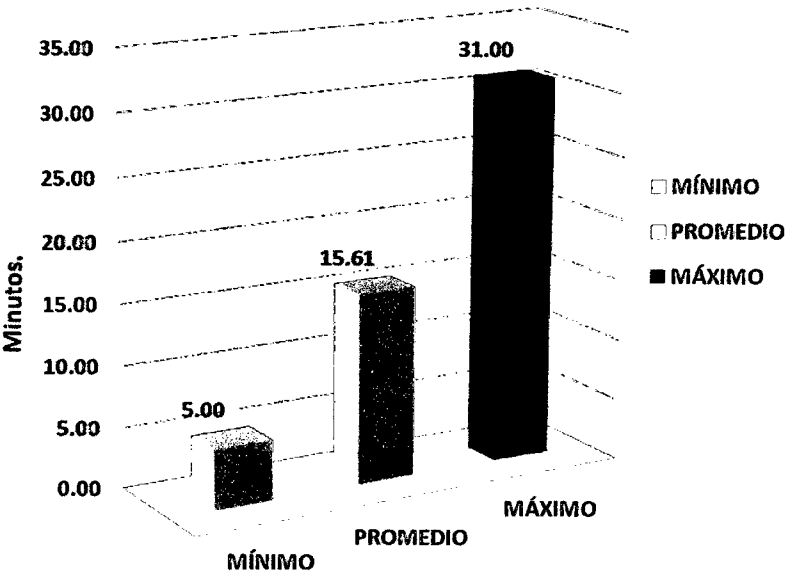


Gráfico N° 6.3. Volumen de semen fresco (ml).

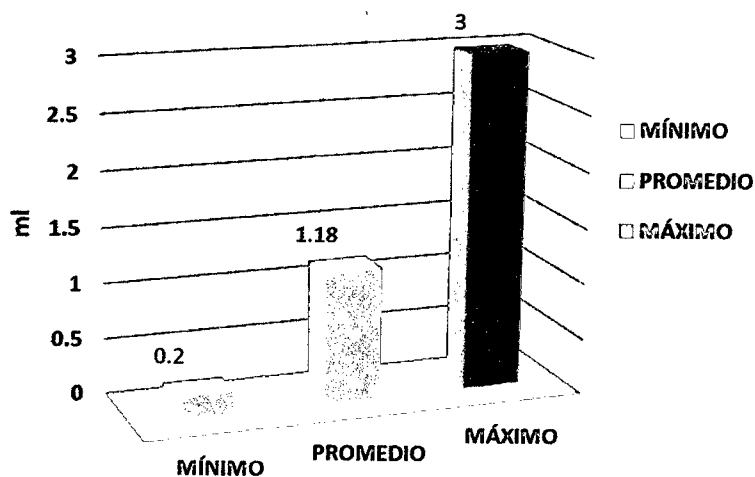


Gráfico N° 6.4. Volumen de espuma en semen fresco (ml).

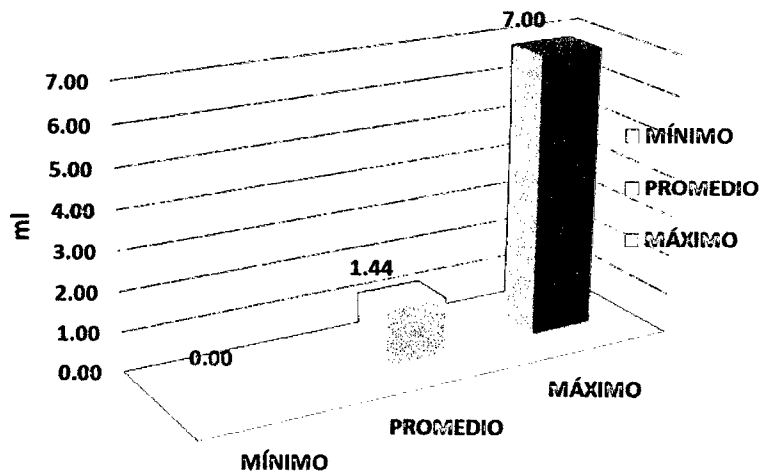


Gráfico N° 6.5. Filancia en semen fresco (cm).

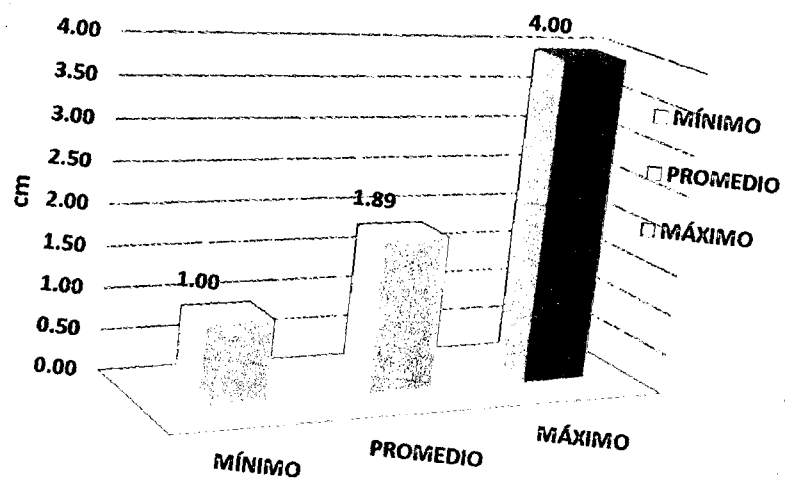


Gráfico N° 6.6. Vitalidad espermática (%).

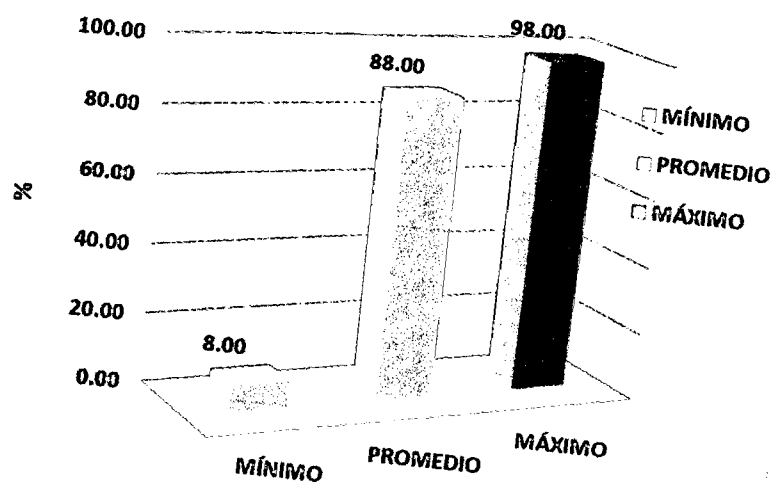


Gráfico N° 6.7. Concentración espermática (millones/ml).

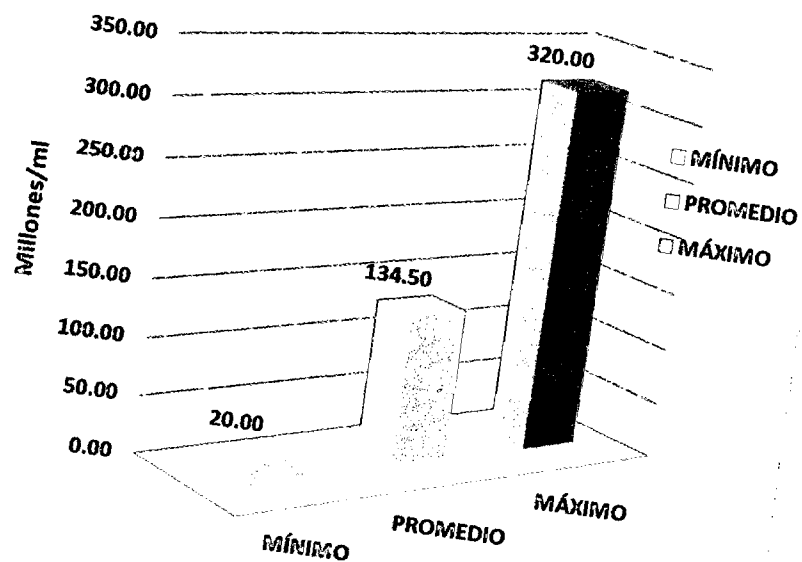


Gráfico N° 6.8. Motilidad espermática en semen fresco (%)

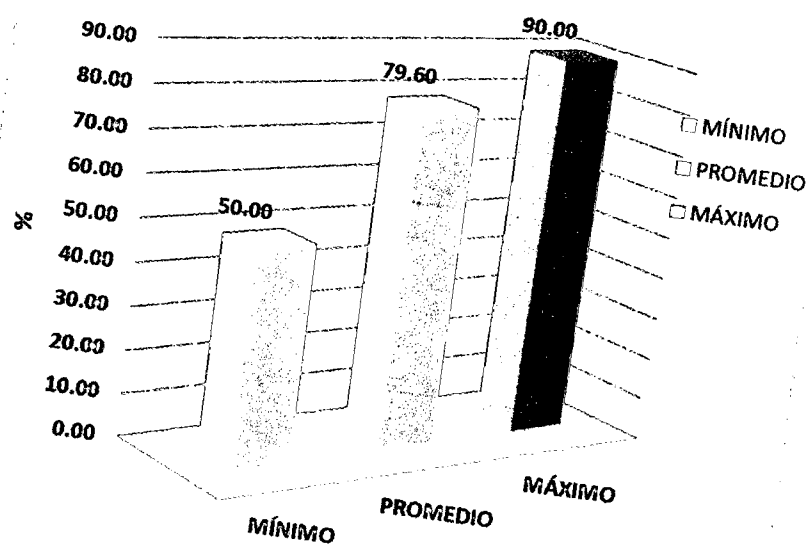


Gráfico N° 6.9. Motilidad espermática en semen disuelto, según tratamientos (%)

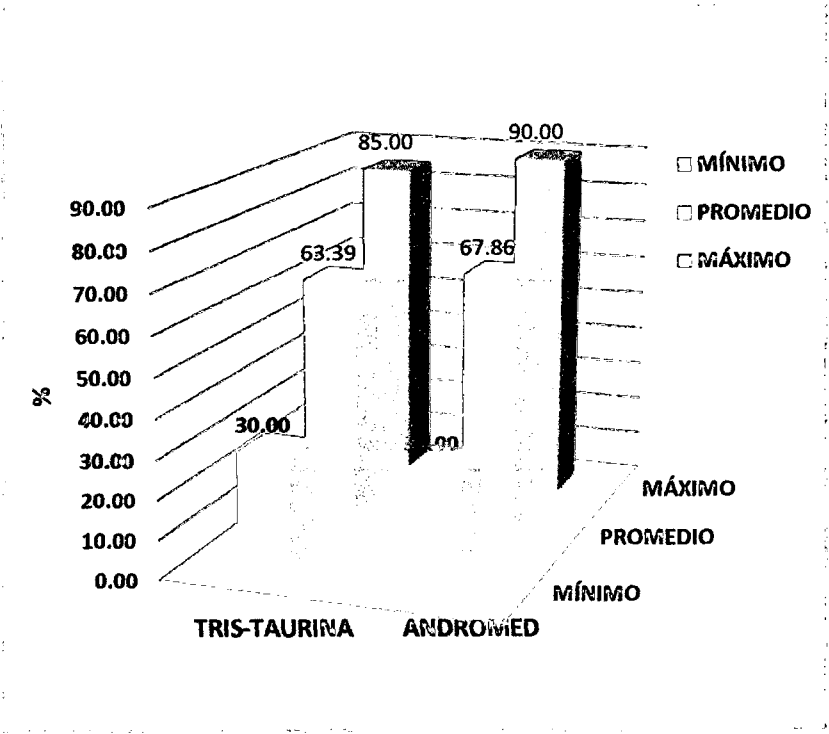


Gráfico N° 6.10. Motilidad espermática en semen equilibrado a 5° C, según tratamientos (%)

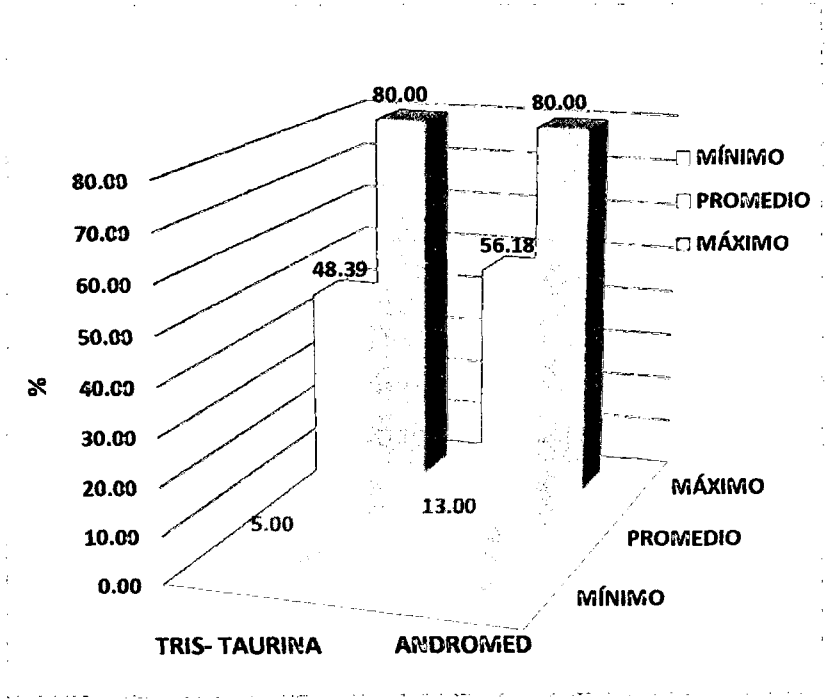


Gráfico N° 6.11. Motilidad espermática en semen descongelado, según tratamientos (%).

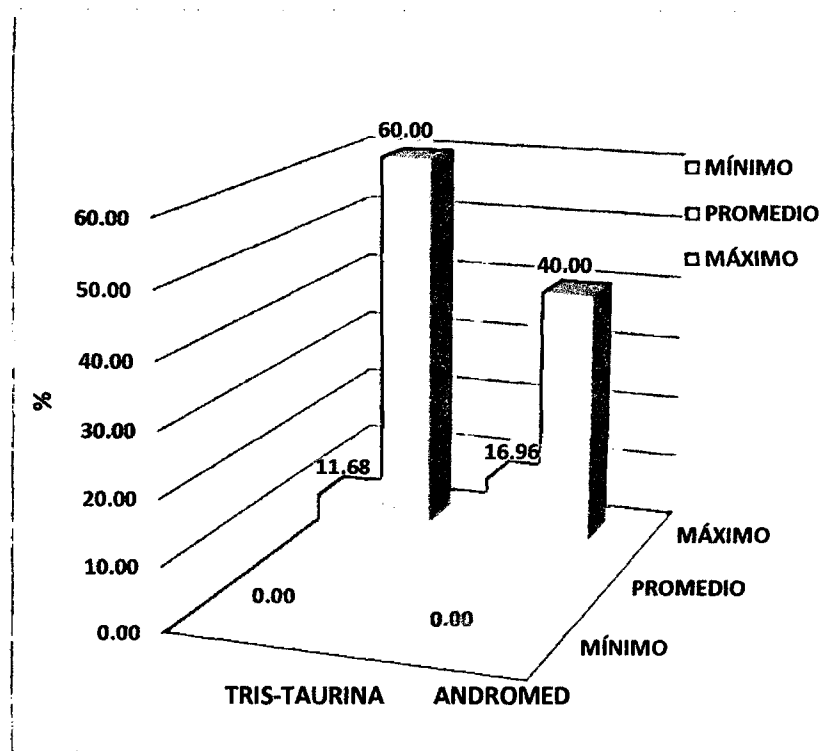
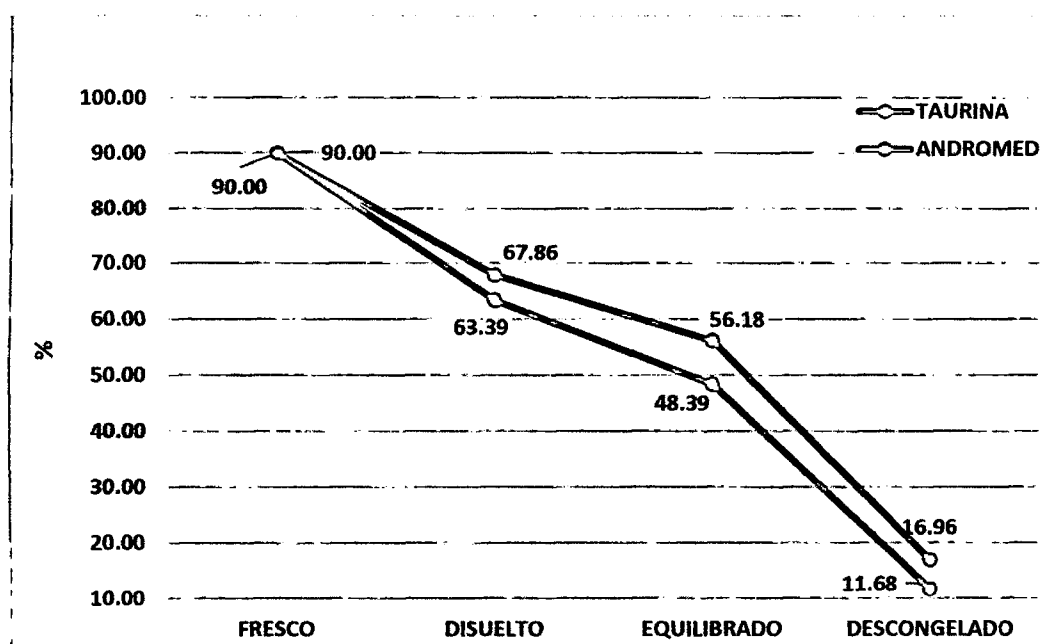


Gráfico N° 6.12. Tendencia de la motilidad espermática según etapas de procesamiento de semen (%).



Cuadro N° 6.4. ANVA para 2 tratamientos en la etapa de semen recién disuelto (37 °C)

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Tratamiento	1	279.02	279.02	1.13	0.29
Error	54	13 374.11	247.67		
Total corregido	55	13 653.13			

Coefficiente de variación. 23.98

Motilidad media. 65.63 %

Cuadro N° 6.5. ANVA en la etapa de semen disuelto a temperatura ambiente (20 °C aproximadamente), para ambos tratamientos.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Tratamiento	1	401.79	401.79	1.58	0.21
Error	54	13 732.14	254.30		
Total corregido	55	14 133.92			

Coefficiente de variación. 25.74

Motilidad media. 61.96 %

Cuadro N° 6.6. ANVA para 2 tratamientos en la etapa de semen disuelto en equilibramiento o refrigerado (5 °C aproximadamente).

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Tratamiento	1	848.64	848.64	2.40	0.13
Error	54	19102.79	353.76		
Total corregido	55	19951.43			

Coeficiente de variación. 35.97

Motilidad media. 52.29 %

Cuadro N° 6.7. ANVA para 2 tratamientos en la etapa de semen descongelado (37 °C aproximadamente).

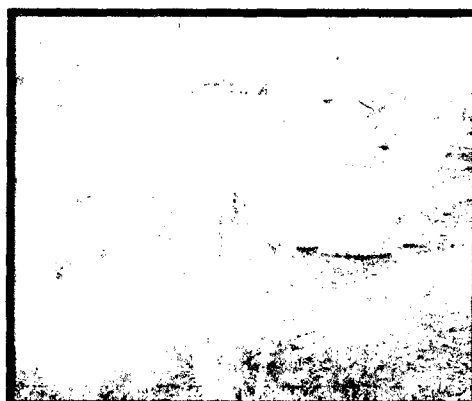
Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
Tratamiento	1	391.14	391.14	2.82	0.10
Error	54	7477.07	138.46		
Total corregido	55	7868.21			

Coeficiente de variación. 82.16

Motilidad media. 14.32 %

ANEXO 03. Panel fotográfico.

Sementales utilizados en el presente trabajo de investigación.



Fotos N° 01 y 02. Machos entrenados para colección con vagina artificial.

Materiales y proceso de colección de semen de alpacas.



**Foto N° 03.
Materiales utilizados
para colección.**



**Foto N° 04.
Colocación de V.A.
en maniquí.**



Foto N° 05.
Macho copulando
en maniquí.



Foto N° 06.
Semen colectado.

Análisis, procesamiento y congelación de semen de alpacas.

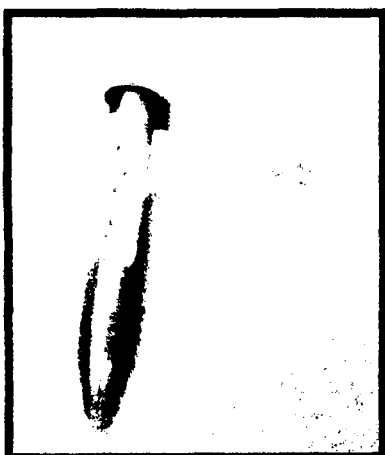


Foto N° 07.
Frotis con tinción
vital.

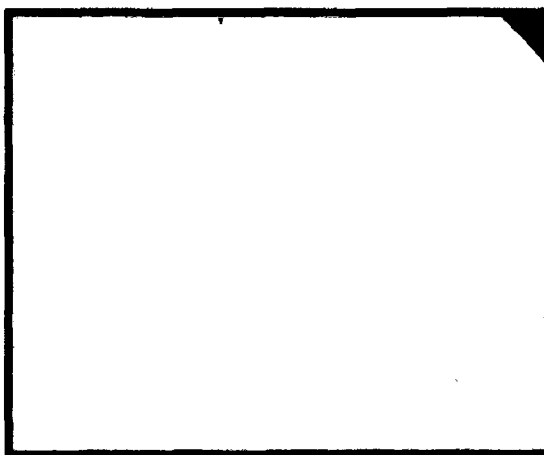
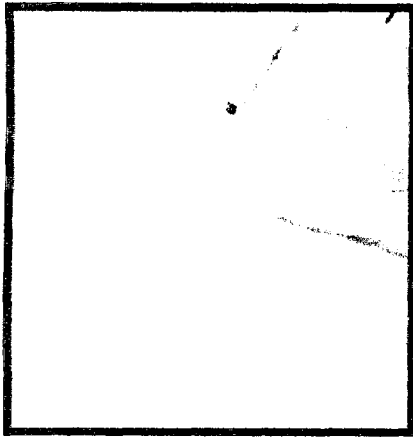
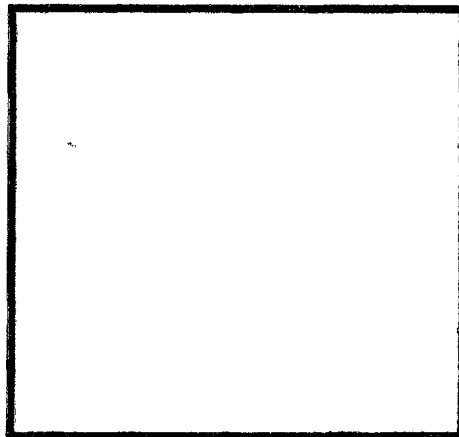


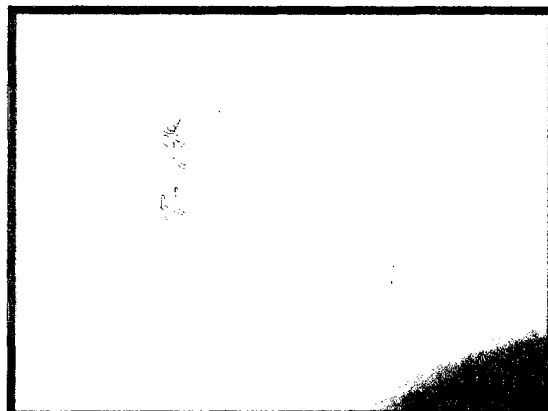
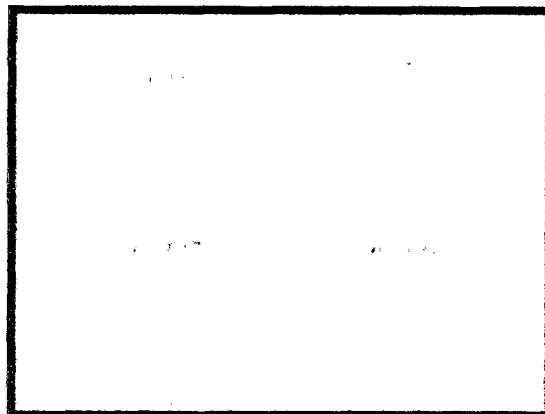
Foto N° 08.
Espermatozoides teñidos
con eosina-nigrosina.



**Foto N° 09.
Preparación de
Cámara**



**Foto N° 10.
Lectura de
concentración.**



Fotos N° 11 y 12. Tubos de microcentrifuga preparados y envasados con semen