

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS ESCUELA**

**PROFESIONAL DE ZOOTECNIA**



**“ESTIMACION DE PARAMETROS DE MOTILIDAD Y DETERMINACION DE SUBPOBLACIONES ESPERMATICAS EN SEMEN DE LLAMA (Lama glama), POR DOS METODOS DE COLECCIÓN”**

Tesis presentada por la Bachiller en Ciencias  
Agrarias:

**RUFINA CCOISO AGUILA**

Para optar el Título Profesional de

**INGENIERO ZOOTECNISTA**

**ASESORES:**

**ING. MSC. HERNAN CARLOS CUCHO DOLMOS**

**ING. Dr. LUCIO ENRIQUE AMPUERO CASQUINO**

**ING. RUTH CCALTA HANCCO**

**KAYRA- CUSCO**

**2019**

## DEDICATORIA

*A Dios por darme la vida y la vida de mis padres, por Guiarme a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en mis momentos de debilidad, por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.*

*A mis queridos **PADRES:***

***PEDRO CRISOLOGO Y FRANCISCA***

*Gracias por la oportunidad de existir, por ser mi fortaleza y los promotores de mis sueños.*

*Con mucho cariño a mis Hermanos por ser parte de vida.*

*A **Roger**, por ser el ejemplo de un hermano mayor, por sus palabras de aliento y por su apoyo incondicional.*

*De manera especial a **Beder** y **Wilmer** por compartir momentos de felicidad y aliento de cada día.*

*A mis queridos Abuelos:*

***YSIDRO Y PLÁCIDA***

*Gracias por vuestro apoyo y por compartir momentos de felicidad.*

*A mis Tíos:*

***Leoncio, Justo, Ramón Maritza,***

***Victoria, Eva, Juana y Rosa.***

*Gracias por vuestras palabras de aliento y apoyo.*

*De manera especial a mi primo hermano **Artemio.***

## **AGRADECIMIENTOS:**

- Expresar mi agradecimiento y reconocimiento a todos y cada uno de los docentes de la Escuela Profesional de Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias; quienes contribuyeron con conocimientos y enseñanzas en mi formación profesional.
- A mis asesores al Mg.Sc. Hernán Cucho Dolmos, Dr. Enrique Ampuero Casquino e Ing. Ruth Ccalta, por brindarme su apoyo, paciencia, sus enseñanzas y orientación desde el proceso de experimentación y final del presente trabajo de investigación.
- A Mg.Sc. Aydee Meza y Al Dr. Wilber García, por su amistad, enseñanzas y apoyo en el proceso experimental del presente trabajo de investigación.
- A Eddy Rojas por los momentos compartidos y apoyo incondicional.
- A todo el personal técnico y administrativo que labora en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) “La Raya” en especial al Sr. Nico y Sr. Jara, quienes me brindaron su comprensión y apoyo.
- A mis compañeros de Tesistas: Edwar, Yanyachi, José, Julián y Olger.
- Gratitud y agradecimiento a mis amigos Suhanis y compañeros de la Universidad del Código 2013- I: Sheyla, Mitzi, Urbano, Mónica, Iván, Mayumi, Ada, Alex, Romario, Yudith, Julius, Melany, Jhon, Oder, Silver y Percy un agradecimiento especial a Sheyla, Mitzi, Urbano, Mónica e Iván por su apoyo total e incondicional durante el proceso experimental del presente trabajo de investigación.
- A mis amigos del colegio: Pamela Sinchi y David Bautista por su amistad y consejos.

## INDICE

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS: .....	iii
INDICE DE FIGURAS .....	xvi
INDICE DE GRAFICOS.....	xvi
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xvi
GLOSARIO.....	xix
RESUMEN.....	xx
INTRODUCCIÓN.....	1
IDENTIFICACION DE PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACION .....	3
Formulación de problema.....	3
Problema general .....	3
Problemas específicos .....	3
CAPITULO I.....	4
1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	4
1.1. Objetivo general .....	4
1.2. Objetivos específicos.....	4
1.3. JUSTIFICACIÓN .....	5
CAPITULO II.....	6
MARCO TEORICO .....	6
2.1. CAMELIDOS SUDAMERICANOS.....	6

2.2. ANATOMIA Y FISILOGIA DE LA LLAMA MACHO .....	6
2.2.1. Pene y prepucio.....	6
2.2.2. Glándulas sexuales accesorias .....	6
2.2.2.1. Próstata .....	6
2.2.2.2. Glándulas bulbo uretrales o de Cowper.....	7
2.2.3. Factores que afectan el eyaculado.....	7
2.2.4. Factores relacionados con la colección y calidad del semen .....	8
2.3. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN EN LLAMAS.....	9
2.3.1. Electroyaculación.....	9
2.3.2. Vagina Artificial.....	10
2.3.3. Degelificación o Licuefacción de Semen de Llama.....	11
2.4. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE LLAMA.....	13
2.4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS. ....	13
2.4.1.1. Volumen .....	13
2.4.1.2. Color.....	14
2.4.1.3. Filancia .....	15
2.4.1.4. PH.....	15
2.4.2.1. Motilidad .....	16
2.4.2.1.1. Uso de dilutores para mejorar las características seminales en llamas....	17
2.4.2.2. Concentración .....	19
2.4.2.3. Vitalidad espermática (porcentaje de espermatozoides vivos y muertos) ...	20
2.4.2.4. Funcionalidad de la Membrana Espermática (HOST). ....	21
2.4.3. PARAMETROS DE MOTILIDAD .....	23

2.4.3.1. Parámetros que evalúan la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides.....	23
2.4.4. Determinación de Sub-poblaciones Esperáticas.....	26
2.4.4.1. Parámetros que se deben tomar en cuenta para la clasificación en sub poblaciones según (Muiño et al., 2006), son: .....	27
CAPÍTULO III.....	30
3. MATERIALES Y METODOS .....	30
3.1. Área geográfica .....	30
3.2. Ubicación.....	30
3.3. Características Medioambientales de la Zona.....	31
3.4. Disponibilidad alimenticia .....	31
3.5. MATERIALES Y EQUIPOS .....	31
3.5.1. Material biológico.....	31
3.5.2. Materiales y equipos para la colección de semen .....	32
B). Materiales para el Método de Electroeyaculación.....	32
A). Equipos para el Método de Electroeyaculación .....	32
C). Reactivos para el Método de Electroeyaculación. ....	32
B). Colección por el Método de Vagina artificial .....	33
3.5.3. Materiales y equipos de laboratorio para análisis de semen .....	33
3.5.4. Reactivos e insumos.....	34
3.5.5. Material Gabinete .....	34
3.5.6. Equipo de laboratorio.....	34
3.5.7. Laboratorio .....	35

3.6. SELECCIÓN DE LOS ANIMALES.....	35
a). Electroeyaculacion .....	35
b). Vagina artificial: .....	36
3.7. DE LA ALIMENTACIÓN: .....	38
a)Método Electroeyaculacion: .....	38
b)Método de Vagina artificial: .....	38
4.8. Preparación de dilutor.....	38
3.8.1. DEGELIFICANTE .....	39
3.8.1.1. Preparación de la papaína:.....	39
3.8.1.2. Uso de la papaína:.....	39
3.9. COLECCIÓN DE SEMEN POR EL MÉTODO DE ELECTROEYACULACION Y VAGINA ARTIFICIAL.....	40
3.9.1. Colección por el Método DE ELECTROEYACULACIÓN.....	40
3.9.1.1. Protocolo de limpieza y estimulación eléctrica (Electroeyaculacion) .....	41
3.9.2. Colección de semen por Vagina Artificial. ....	43
3.10.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS .....	48
3.10.1.1. Volumen seminal .....	48
3.10.1.2. Color Seminal .....	49
3.10.1.3. PH seminal .....	49
3.10.1.4. Filancia seminal.....	49
3.10.2.1. Motilidad .....	50
3.10.2.2. Concentración espermática .....	52
3.10.2.3. Vitalidad espermática .....	52
3.10.2.4.1. Preparación de la solución hipoosmótica .....	54
3.10.2.4.2. Protocolo para la prueba de hipoosmótica .....	54

3.11. ANALISIS ESTADISTICO.....	56
3.11.1. Diseño estadístico.....	56
3.12. Identificación de subpoblaciones:.....	57
CAPITULO IV .....	59
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	59
4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE SEMEN COLECTADAS POR EL METODO DE ELECTROEYACULACION Y VAGINA ARTIFICIAL. ....	59
4.1.1. Características Macroscópicas.....	59
4.1.1.1. Volumen .....	59
4.1.1.2. Color .....	60
4.1.1.3. Filancia .....	60
4.1.1.4. pH .....	61
4.1.2. Evaluación Microscópicas del Semen. ....	62
4.1.2.1. Motilidad .....	62
4.1.2.1.1. Motilidad total .....	62
4.1.2.1.3. Motilidad Progresiva (MP). ....	65
4.1.2.2. Concentración espermática .....	66
4.1.2.3. Vitalidad Espermática.....	67
4.1.2.4. Funcionalidad de la membrana espermática (HOST).....	68
4.1.2.5. Integridad Acrosomal.....	69
4.2. PARÁMETROS DE MOTILIDAD .....	71
4.3. SUBPOBLACIONES ESPERMATICAS EN SEMEN DE LLAMAS. .....	73



4.3.1. Evaluación del análisis de los componentes principales (PCA).....	73
A. Evaluación en semen fresco. ....	73
B. Evaluación en semen degelificado con papaína (20 minutos). .....	73
4.3.2. Identificación de subpoblaciones espermáticas.....	74
B. Identificación de subpoblaciones en semen incubado con papaína (20 minutos).75.	
CAPITULO V .....	78
CONCLUSIONES.....	78
RECOMENDACIONES:.....	79
CAPITULO VI .....	80
Bibliografía.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
ANEXOS.....	89

## INDICE DE CUADROS

<b>Tabla 1.</b> Volumen seminal de llamas, por métodos de colección y autores .....	14
<b>Tabla 3.</b> PH seminal de llamas, por el método de vagina artificial (VA). .....	16
<b>Tabla 4.</b> Motilidad espermática en semen de camélidos clasificadas según el tipo de motilidad en semen fresco.....	17
<b>Tabla 5.</b> Motilidad espermática (%) en semen fresco de llamas colectadas por el método de Vagina Artificial (VA) y electroeyaculación (EE). .....	18
<b>Tabla 6.</b> Motilidad espermática (%) en semen de camélidos diluidos con diferentes con diferentes degelificantes, colectados por diferentes métodos. ....	19
<b>Tabla 7.</b> Concentración espermática, colectadas por el método de Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculación (EE). .....	20
<b>Tabla 8:</b> Porcentaje de Vitalidad espermática del semen de llamas colectadas por el método de Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculación (EE).....	21
<b>Tabla 9:</b> Porcentaje de reacción total al efecto del estrés hipoosmótica de semen de llamas colectadas por el método de Electroeyaculación (EE) y Vagina Artificial (VA). .....	21
<b>Tabla 10:</b> Porcentaje de Integridad de la membrana acrosomal del semen de camélidos colectadas por el método de Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculación (EE). .....	22
<b>Tabla 11:</b> Parámetros de motilidad espermática en semen de llamas colectadas por el método de Electroeyaculación (EE).....	25
<b>Tabla 12:</b> Parámetros de motilidad espermática colectadas por el método de Vagina artificial (VA) y Póst copula (PC) en alpacas. ....	25
<b>Tabla 13:</b> Parámetros de motilidad espermática colectadas por el método de Desviación del conducto deferente en alpacas. ....	26

<b>Tabla 14.</b> Numero de subpoblaciones espermáticas y parámetros de motilidad obtenidos del semen de alpacas colectadas por el método de desviación del conducto deferente.....	28
<b>Tabla 15.</b> Numero de subpoblaciones espermáticas según especies estudiadas. ..	28
<b>Tabla 16.</b> Publicaciones realizadas en subpoblaciones espermáticas en diferentes especies estudiadas en función de la motilidad espermática.....	29
<b>Tabla 17.</b> Estación meteorológica de La Raya.....	30
<b>Tabla 18.</b> Registro de colección de semen en llamas por el método de Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculación (EE).....	36
<b>Cuadro 19.</b> Registro de colección de semen en llamas por Electroeyaculación.....	37
<b>Tabla 20.</b> Insumos para la preparación del dilutor madre base TRIS .....	38
<b>Tabla 21.</b> Volumen seminal de las llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina Artificial.....	59
<b>Tabla 22.</b> Porcentaje de color espermático de llamas colectados por el método Electroeyaculación y Vagina artificial. ....	60
<b>Tabla 23:</b> Filancia del semen de llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina Artificial.....	61
<b>Tabla 24.</b> PH del semen de llamas colectadas por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial .....	61
<b>Cuadro 25.</b> Motilidad total de los espermatozoides de llamas colectadas por Electroeyaculación en fresco y Degelificados con papaína (20min).....	62
<b>Tabla 26.</b> Motilidad total del espermatozoide de las llamas colectadas por Vagina Artificial.....	63
<b>Tabla 27.</b> Motilidad no progresiva de espermatozoides de las llamas colectados por Electroeyaculación. ....	64

<b>Tabla 28.</b> Motilidad no progresiva del espermatozoide de las llamas colectada por Vagina artificial. ....	64
<b>Tabla 29.</b> Motilidad Progresiva del espermatozoide de las llamas colectadas por Electroeyaculacion. ....	65
<b>Tabla 30.</b> Motilidad progresiva del espermatozoide de las llamas colectado por Vagina artificial. ....	66
<b>Tabla 31.</b> Concentración espermática (millones/ml) en fresco de llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial. ....	66
<b>Tabla 32.</b> Vitalidad espermática (%) de llama colectada por el método de Electroeyaculación. ....	67
<b>Tabla 33.</b> Vitalidad espermática (%) de llama colectadas por vagina artificial .....	68
<b>Tabla 34.</b> Funcionalidad de la membrana espermática (HOST) de llama colectadas por Electroeyaculación. ....	68
<b>Tabla 35.</b> Funcionalidad de la membrana plasmática (HOST) de llamas colectadas por Vagina Artificial.....	69
<b>Tabla 36.</b> Integridad Acrosomal de los espermatozoides de llama colectadas por Electroeyaculacion. ....	70
<b>Tabla 37.</b> Integridad Acrosomal de los espermatozoides de llama colectadas por Vagina Artificial.....	70
<b>Tabla 38.</b> Parámetros de motilidad espermática de llama colectadas por Electroeyaculacion en fresco y degelificados con papaína. ....	71
<b>Tabla 39.</b> Parámetros de motilidad espermática de llama colectadas por vagina artificial en semen fresco y degelificados con papaína.....	72
<b>Tabla 40:</b> Análisis y los componentes principales y sus autovalores en semen fresco colectado por Electroeyaculacion y Vagina Artificial. ....	73

<b>Tabla 41:</b> Análisis de los componentes principales y sus autovalores de semen de llamas degelificados con papaína colectadas por Electroeyaculación y Vagina Artificial.....	74
<b>Tabla 42:</b> Valores (Promedio $\pm$ desviación estándar) de los parámetros de motilidad en semen fresco de llamas, de acuerdo con su asignación a sus subpoblaciones, colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial. ....	75
<b>Cuadro 43:</b> Valores (promedio $\pm$ desviación estándar) de los parámetros de motilidad de los espermatozoides de llama degelificados con papaína (20 minutos) de acuerdo con su asignación a sus subpoblaciones colectadas por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial. ....	76

## INDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Foto 1:</b> Centro de investigación de camélidos sudamericanos (CICAS) “La Raya”.	30
<b>Foto 2:</b> Materiales para la colección de semen por Electroeyaculación .....	32
<b>Foto 3:</b> Materiales para la colección de semen por el método de Vagina Artificial.	33
<b>Foto 4:</b> Equipo Integrated Sperm Analysis System (ISAS) CASA; microscopio de contraste de fases UB200i con cámara.....	35
<b>Foto 5.</b> Medida de los testículos <b>Foto 6.</b> Pesado de las llamas.....	37
<b>Foto 7:</b> Anestésicos (Ketamina y Xylacina).....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Foto 8:</b> Insumos para la preparación del dilutor madre en base TRIS.....	39
<b>Foto 9:</b> Papaína e Inhibidor de papaína.....	40
<b>Foto 10:</b> Anestesiado de las llamas con Ketamina y Xylacina .....	41
<b>Foto 11:</b> Limpieza del prepucio con agua biodestilada. ....	42
<b>Foto 12:</b> Limpieza por vía rectal.....	42
<b>Foto 13:</b> Estimulación eléctrica a la llama <b>Foto 14:</b> Colección de semen por EE. ....	43
<b>Foto 15:</b> Acondicionamiento de la Vagina Artificial .....	44
<b>Foto 16:</b> Frazadilla Eléctrica envuelta a la vagina .....	44
<b>Foto 17:</b> Colocado de la Vagina Artificial al Maniquí.....	45
<b>Foto 18:</b> Macho copulando al Maniquí. ....	45
<b>Foto 19:</b> Volumen seminal por Electroeyaculación .....	48
<b>Foto 20:</b> Volumen seminal por Vagina Artificial. ....	48
<b>Foto 21:</b> Color seminal por Vagina artificial .....	49
<b>Foto 22:</b> Color seminal por Electroeyaculación.....	49
<b>Foto 23:</b> Motilidad espermática del semen. ....	50

<b>Foto 24.</b> Análisis de Motilidad espermática.....	50
<b>Foto 25:</b> Parámetros de motilidad con el ISAS CASA .....	51
<b>Foto 26:</b> Concentración espermática del semen de llamas .....	52
<b>Foto 27:</b> Tinción Eosina-Nigrosina. <b>Foto 28:</b> Vitalidad espermática teñidos con..	53
<b>Foto 29:</b> Solucion Hipoosmótica <b>Foto 30:</b> Espermatozoides expuestas a una.....	55
<b>Foto 31:</b> Integridad de la membrana espermática con presencia de capuchón acrosomal(a) y con ausencia de capuchón .....	56

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Aparato reproductor del macho. ....	7
<b>Figura 2:</b> Terminología estándar de algunos parametros de motilidad (VCL, VSL, VAP Y ALH) obtenidos por el sistema CASA. ....	24

## INDICE DE GRAFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Flujograma de la evaluación del semen de llamas por el método de Electroeyaculación. ....	46
<b>Gráfico 2.</b> Flujograma de la evaluación de semen de llama por el método de Vagina Artificial. ....	47

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1: ANVA</b> para la filancia de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación y vagina artificial. ....	89
<b>Anexo 2: ANVA</b> para el PH de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial. ....	89
<b>Anexo 3: ANVA</b> para el volumen de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina Artificial. ....	89
<b>Anexo 4: ANVA</b> para la Concentración de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial. ....	90
<b>Anexo 5: ANVA</b> para la motilidad total de semen colectado por Electroeyaculación .....	90
<b>Anexo 6: ANVA</b> para la motilidad no progresiva de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación .....	91
<b>Anexo 7: ANVA</b> para la motilidad progresiva de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación .....	91
<b>Anexo 8: ANVA</b> para velocidad curvilínea (VCL) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación .....	91
<b>Anexo 9: ANVA</b> para la velocidad rectilínea (VSL) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación .....	92
<b>Anexo 10: ANVA</b> para la velocidad media (VAP) se semen de llamas colectadas por Electroeyaculación. ....	93
<b>Anexo 11: ANVA</b> para el índice de linealidad (LIN) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación. ....	93



<b>Anexo 12: ANVA para el índice de rectitud (STR) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion .....</b>	<b>94</b>
<b>Anexo 13: ANVA para el índice de oscilación (WOB) de semen de llamas colectadas por electroeyaculacion .....</b>	<b>94</b>
<b>Anexo 14: ANVA para la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion.....</b>	<b>95</b>
<b>Anexo 15: ANVA para la frecuencia de batido de la cabeza (BCF) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion.....</b>	<b>95</b>
<b>Anexo 16: ANVA para la vitalidad espermática en semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion .....</b>	<b>95</b>
<b>Anexo 17: ANVA para la funcionalidad de la membrana (HOST) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion.....</b>	<b>96</b>
<b>Anexo 18: ANVA para la reacción acrosomal de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion .....</b>	<b>96</b>
<b>Anexo 19: ANVA para la Motilidad total de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.....</b>	<b>97</b>
<b>Anexo 20: ANVA para la Motilidad no progresiva (MNP) se semen de llamas colectadas por Vagina Artificial .....</b>	<b>97</b>
<b>Anexo 21: ANVA para la Motilidad progresiva (MP) en semen de llamas colectadas por Vagina Artificial .....</b>	<b>98</b>
<b>Anexo 22: ANVA para la velocidad curvilínea (VCL) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.....</b>	<b>98</b>
<b>Anexo 23: ANVA para la velocidad rectilínea (VSL) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.....</b>	<b>98</b>
<b>Anexo 24: ANVA para la velocidad media (VAP) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial .....</b>	<b>99</b>
<b>Anexo 25: ANVA para el índice de linealidad (LIN) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.....</b>	<b>99</b>
<b>Anexo 26: ANVA para el índice de rectitud (STR) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.....</b>	<b>99</b>
<b>Anexo 27: ANVA para el índice de oscilación (WOB) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial. ....</b>	<b>100</b>

<b>Anexo 28: ANVA</b> para la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial. ....	100
<b>Anexo 29: ANVA</b> para la frecuencia de batido (BCF) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.....	100
<b>Anexo 30: ANVA</b> para la Vitalidad espermática de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.....	101
<b>Anexo 31: ANVA</b> para la Funcionalidad de la membrana de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial .....	101
<b>Anexo 32: ANVA</b> para la Reacción acrosomal de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.....	101
<b>Anexo 33:</b> Procedimiento PRINCOMP en semen fresco de llamas colectadas por Electroeyaculacion y Vagina artificial. ....	102
<b>Anexo 34:</b> Procedimiento PRINCOMP en semen de llamas degelificados con papaína ( 20 minutos) colectadas por Electroeyaculacion y Vagina artificial. .	103
<b>Anexo 35:</b> Procedimiento FACTCLUS en semen fresco de llamas colectadas por Electroeyaculacion y Vagina artificial .....	105
<b>Anexo 36:</b> Procedimiento FASTCLUS de semen de llamas degelificados con papaína (20 minutos) colectadas por el método de Electroeyaculacion y Vagina artificial. ....	108

## GLOSARIO

EE	: Electroeyaculación
PC	: Post cópula
VA	: Vagina artificial
ALH	: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
BCF	: Espermatozoide Frecuencia de batida de la cabeza
CASA	: Computer Assisted Sperm Analysis
ISAS	: Sistema integrado de análisis de semen
CV	: Coeficiente de Variabilidad
CICAS	: Centro de investigación en camélidos sudamericanos
HOST	: Hipoosmotic swelling test
mOsm	: Miliosmoles
SAS	: Statistical Analysis system
STR	: Índice de rectitud
VCL	: Velocidad curvilínea
VSL	: Velocidad rectilínea
VAP	: Velocidad media
RA	: Reacción acrosomal
MNP	: Motilidad no progresiva
MP	: Motilidad progresiva
CFDA/PI	: Diacetato de fluoresceína/Yoduro de propidio

## RESUMEN

El presente trabajo “Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de llama (*Lama glama*)”, fue realizado en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos (CICAS) “La Raya”, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, situado en el Distrito de Marangani, Provincia Canchis y departamento de Cusco, fue efectuado entre febrero a Diciembre de 2018, con el objetivo de determinar las características macroscópicas y microscópicas, parámetros de motilidad y número de subpoblaciones espermáticas presentes en el semen fresco e Incubado con papaína ( 20 minutos) de llamas (*lama glama*) colectados por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial.

Se empleó 4 animales, por cada método de colecta: Electroeyaculación (EE) y vagina artificial (VA), con 4 repeticiones en cada uno. Se ha determinado el volumen, color, filancia y PH (macroscópicas), y la motilidad, vitalidad, funcionalidad de la membrana e integridad acrosomal (microscópicas) del semen colectado por Electroeyaculación y Vagina artificial, degelificado con papaína (20 minutos). Las variables microscópicas se analizaron con el Integrated Semen Analysis System - ISAS® y el MotiC Plus. Se empleó la estadística descriptiva para las variables macroscópicas, los parámetros microscópicos se evaluaron en un arreglo factorial en bloques. Se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el semen degelificado con papaína (20 minutos) y fresco, para la motilidad total, motilidad no progresiva, motilidad progresiva, y los parámetros de motilidad; no se encontró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), para la vitalidad, funcionalidad de la membrana e integridad acrosomal. Para identificar las subpoblaciones espermáticas en semen de llama fresco y degelificado con papaína

(20 minutos), Se ha realizado el análisis de componentes principales (PCA), y luego, se ha determinado el número de subpoblaciones espermáticas. Se halló que la velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL) y la velocidad promedio (VAP), explican el 99% de la varianza. Se han identificado 4 subpoblaciones espermáticas en función de los parámetros cinemáticos del semen de llama en fresco y degelificado con papaína.

## INTRODUCCIÓN

Los primeros trabajos de colección de semen en camélidos sudamericanos (CSA) se hicieron con el uso de fundas vaginales (Mogrovejo, 1952), posteriormente se empleó la Electroeyaculación (Fernandez-Baca, 1966) y actualmente se emplea la vagina artificial con un cérvix simulada y dentro de un maniquí en posición copulatoria (Sumar, 1981). La vagina artificial tiene que ser mantenida a la temperatura corporal de la hembra con el apoyo de una frazadilla eléctrica para permitir que el macho no interrumpa la cópula (Bravo *et al.*, 1997). Los espermatozoides de llamas no presentan movilidad progresiva, sólo movilidad oscilatoria por su alta viscosidad que presenta el semen, lo cual estas características seminales dificultan la evaluación y el manejo de estos eyaculados. En estudios anteriores se determinó que la presencia de espermatozoides inmóviles o con poca movilidad sería una condición inherente o propia de estas especies y que, por lo tanto, el porcentaje de movilidad en semen fresco no sería un parámetro indicativo de la calidad del eyaculado. En semen de llama se puede promover la movilidad espermática progresiva y facilitar las evaluaciones microscópicas es mediante la incubación enzimática como: colagenasa, tripsina, extracto de piña, hialuronidasa, fibrinolisisina y papaína, lo cual estas enzimas eliminan la viscosidad del semen, obteniendo una movilidad progresiva y así también nos facilita las evaluaciones del eyaculado.

Los sistemas CASA permiten también el estudio de los parámetros de motilidad nos permite evaluar las velocidades de desplazamiento de los espermatozoides, considerando los siguientes parámetros como: (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCL) y con ello nos permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides, con distintos patrones de movimiento que coexisten en una muestra de semen, los espermatozoides que forman parte de un eyaculado no son uniformes

en cuanto a la motilidad, es decir en el mismo eyaculado un porcentaje de espermatozoides que se mueven de forma muy rápida, rápida y lentos. (Muiño *et al.*, 2006). Y obteniendo resultados aportar datos para futuras investigaciones sobre la evaluación de la fisiología de semen de llamas y la degelificación en papaína.

## **IDENTIFICACION DE PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACION**

### **4.3. Formulación de problema**

Los camélidos sudamericanos son especies en la cual la colección de semen es muy complicada y también debido a las características especiales del semen lo cual dificulta en su análisis microscópico, por tal razón es fundamental realizar más investigaciones en estas especies como la llama, ya que no hay información suficiente y no se tienen reportes sobre los parámetros de motilidad y subpoblaciones espermáticas en semen de llamas (*Lama glama*).

### **4.4. Problema general**

- ¿Cuáles serán los parámetros de motilidad y subpoblaciones espermáticas en semen de llama obtenido mediante los métodos de colección de semen por electro eyaculación y vagina artificial?

### **4.5. Problemas específicos**

- ¿Cuáles serán las características macroscópicas y microscópicas del semen de llama obtenido mediante los métodos de colección de semen por electro eyaculación y vagina artificial?
- ¿Cuáles serán los parámetros de motilidad (VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, ALH,  $\zeta$ BCF) de los espermatozoides de llamas colectado por Electroeyaculacion y Vagina artificial?
- ¿Cuáles serán las subpoblaciones espermáticas de semen de llama colectadas por Electroeyaculacion y Vagina artificial?



## CAPITULO I

### 1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 1.1. Objetivo general

- Determinar los parámetros de motilidad y subpoblaciones espermáticas en semen de llama (*Lama glama*) obtenido por Electroeyacuacion y Vagina artificial.

#### 1.2. Objetivos específicos

- Determinar las características macroscópicas y microscópicas del semen de llamas colectado por Electro eyacuación y Vagina artificial en fresco e incubado por 20 minutos en papaína.
- Determinar los parámetros de motilidad (VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, ALH, BCF) de los espermatozoides de llamas colectado por Electroeyacuacion y Vagina artificial en fresco e incubado 20 minutos en papaína.
- Determinar las subpoblaciones espermáticas de semen de llama colectado por Electroeyacuacion y Vagina artificial en fresco e incubado por 20 minutos en papaína.

### 1.3. JUSTIFICACIÓN

La Región del Cusco, es la segunda productora de llamas a nivel nacional con alrededor de 122.000 ejemplares (Cenagro, 2012) en 9900 unidades familiares, la mayor parte en las denominadas provincias altas del Cusco (Canas, Canchis y Espinar). La crianza de llamas no cuenta con el apoyo de ninguna entidad pública de la región, ni tampoco es estudiada por ello que no existe mucha información específicamente de los machos, como: metodologías de colecta, evaluación de las características macroscópicas y microscópicas, parámetros de motilidad, y subpoblaciones espermáticas en semen fresco y utilizando enzimas degelificantes de semen para reducir la viscosidad seminal, los estudios basados en subpoblaciones espermáticas podrían ser importantes para lograr una mejor definición de la calidad seminal en llamas, determinar los rangos para considerar un espermatozoide lento o rápido, y consecuentemente realizar más investigaciones en temas relacionados, ya que a nivel nacional se tiene escasos estudios sobre esta especie y no se tiene reportes sobre los parámetros de motilidad y subpoblaciones espermáticas en semen de llama (*Lama glama*);

Por lo tanto, es necesario estandarizar las características seminales de la llama, utilizando equipos y sistemas computarizados modernos de análisis espermático como el ISAS (Integrated Sperm Analysis System). Por esta razón que con el presente trabajo “Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de llama (*Lama glama*)”, aporta datos para futuras investigaciones.

## **CAPITULO II**

### **MARCO TEORICO**

#### **2.1. CAMELIDOS SUDAMERICANOS**

El Perú es el principal productor de camélidos sudamericanos del mundo, con una población total de aproximadamente 5,3029 unidades, entre alpacas y llamas. La mayor parte de ellos se encuentran en los departamentos del sur peruano: Puno, Cusco, Arequipa, Ayacucho y Huancavelica; y en ellos constituye la especie ganadera más importante desde el punto de vista económico en las zonas alto andinas, e involucran a una población de 2 millones de habitantes que representa aproximadamente el 11% de la población nacional, y a unos 100 000 productores, Ministerio de Agricultura y Riego - Dirección General de Evaluación y Seguimiento de Políticas (SIEA, 2014).

#### **2.2. ANATOMIA Y FISILOGIA DE LA LLAMA MACHO**

##### **2.2.1. PENE Y PREPUCIO**

El pene es del tipo fibroelástico, llegando a medir en las llamas 40 cm – 45 cm, describe como en el toro una “S” peniana con la primera y segunda inflexión localizadas por delante de los testículos, el diámetro es relativamente delgado y no se expande apreciablemente durante la erección (Sumar, 1983).

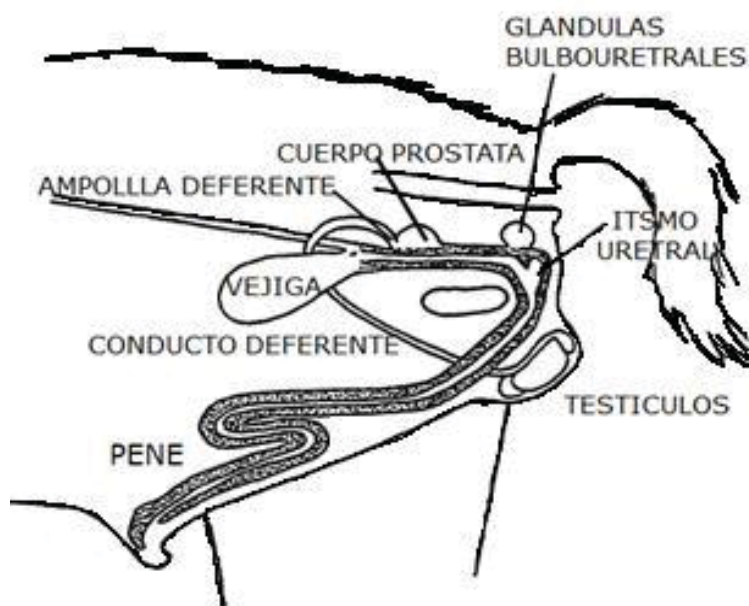
##### **2.2.2. GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS**

###### **2.2.2.1. Próstata**

Tiene la forma de “H” y está ubicado dorsal y lateralmente sobre el cuello de la vejiga a  $10 \pm 2$  cm medida desde el ano. Está formada por el cuello prostático que comprenden dos lóbulos unidos y situados en el primer segmento de la uretra, la glándula tiene un diámetro transversal aproximadamente de 4 cm y un 1 cm de grosor (Osorio y San Martín).

### 2.2.2.2. Glándulas bulbo uretrales o de Cowper

Estos son de forma ovoide, pequeños, a unos 7.5 cm de la próstata, cubiertas por una capsula muscular; se ubican lateralmente a la uretra en salida pélvica y tienen cada uno un diámetro aproximado de 1 cm. La llama y alpaca, así como los camélidos silvestres carecen de glándulas vesiculares o también llamadas vesículas seminales (Osorio y San Martín; 1966).



**Figura 1.** Aparato reproductor del macho.  
Fuente: (Turin, 2009)

### 2.2.3. Factores que afectan el eyaculado

El proceso de la reproducción es un sistema fisiológico importante para el desarrollo de las especies y está ligado al estrés ambiental y por manejo. El primero incluye a la temperatura del ambiente (frío y/o calor), al viento y a la humedad. El estrés por manejo incluye a los procedimientos de manejo mismo, al flujo de animales, ruido, trauma físico, transporte, aislamiento de los animales, etc. La combinación de ambos tipos de estrés compromete al bienestar animal y su desempeño (Córdova, 2008).

Considerando que los espermatozoides son sensibles al shock térmico, la luz brillante, detergentes, agua, sangre, metales, y temperaturas mayores a 40°C, todo el equipo usado para su examen debe estar libres de contaminantes y ser mantenido alrededor de 37°C (Melling y Alder, 2000).

#### **2.2.4. FACTORES RELACIONADOS CON LA COLECCIÓN Y CALIDAD DEL SEMEN**

- **Frecuencia de colección:** En época reproductiva podría ser una causa de baja fertilidad por agotamiento de las reservas espermáticas en los machos. (Bravo *et al.*, 1997)
- **Duración de la copula:** No produce cambios considerables de volumen del eyaculado, pero si en la concentración y el porcentaje de espermatozoides (Bravo *et al.*,2002).
- **Época:** Así como la alimentación son importantes en la producción espermática concentración y porcentaje de anormalidades, sobre todo de la cola, teniéndose buenas características seminales durante el verano y la anormalidades se incrementa durante el invierno (Giuliano *et al.*,2006).
- **Edad:** la edad tiene un efecto muy sutil en la producción espermática, ya que las características mejoran ligeramente de acuerdo aumenta la edad, pero dicha diferencia no es significativa (Quispe,1987).
- **Luz:** las intensidades lumínicas encontradas normalmente en el laboratorio pueden deprimir la tasa metabólica, la motilidad y fertilidad de los espermatozoides. los efectos adversos solo se notan si el semen está en contacto con oxígeno (Bearden y Fuquay, 1980).

- **Presión osmótica:** La membrana de los espermatozoides es semipermeable, por lo cual las soluciones hipo e hipertónicas alteran la transferencia de agua a través de la membrana, lesionando la integridad de la célula, es muy importante utilizar solo soluciones isotónicas ya que los espermatozoides permanecen móviles por más tiempo (Bearden y Fuquay 1982).
- **Temperatura:** cuando la temperatura se eleva a más de 50°C los espermatozoides sufren una pérdida irreversible de su motilidad. Si se mantiene a la temperatura corporal, solo vivirían por unas pocas horas, debido al agotamiento de los substratos de energéticos, a una caída del pH. (Bravo, 2002).

## **2.3. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN EN LLAMAS**

### **2.3.1. ELECTROYACULACIÓN.**

(Giuliano *et al.*,2008) implica tranquilizar al animal por vía intravenosa con una mezcla de xylacina, en dosis de 0,2 mg/kg y de ketamina, 1,5 mg/kg. La colección se realiza con el animal acostado; la sonda del electro eyaculador consta de tres electrodos, la cual es introducida sobre la próstata, cuya profundidad es evaluada por medio de un transductor ecográfico.

La estimulación ocurre mediante impulsos eléctricos de 0.2 V inducidos a intervalos de 1 segundo durante 3 segundos; el voltaje se va incrementando progresivamente de 2 a 10 V en 6 a 12 minutos. Este método permitió recolectar semen en el 100% de oportunidades de las 110 tentativas de colección y sin presencia de orina. En esta colección se evita la formación de espuma, como ocurre con la vagina artificial, (Giuliano *et al.*, 2008).

(Valle, 2013) Reporta el uso del Electroeyacuación para la colección de semen en Llamas utilizando de voltaje de 12 Voltios, y presentaba dos llaves que permitía la graduación del voltaje y su intensidad desde 2 Voltios subiendo gradualmente cada 0,2 Voltios hasta llegar a 10 Voltios, se obtuvieron muestras de semen con la ventaja de realizar la colección sin la necesidad de tener hembras en celo, acortar el tiempo de colección y realizarla a lo largo de todo el año.

(Jhonson, 1989) Obtuvo semen de llamas anestesiadas ó sedadas, obtuvo pequeñas cantidades (0.1 a 0.5 ml) con alta concentración, pero no todos los intentos fueron exitosos.

Realizó un estudio comparativo de colección de semen mediante las técnicas de electro eyacuación y vagina artificial, se utilizó un electro eyaculador Plectron, obteniéndose buenos resultados con 60 cargas eléctricas del voltaje y su intensidad desde 2 Voltios subiendo gradualmente cada 0,2 Voltios hasta llegar a 10 Voltios y 100µA (micro amperios. El diámetro del transductor rectal fue de 2,0 cm de ancho. 2 segundos de duración, 14 voltios, 4 amperios, 25 ciclos/seg. y 2 seg. de descanso entre cada pulsación, el semen obtenido por este método tuvo diferentes características a las muestras obtenidas mediante vagina artificial; Valle, (2013).

### **2.3.2. VAGINA ARTIFICIAL.**

Sumar y Leyva, (1981), construyeron un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de cópula; la vagina artificial fue una modificación de la vagina artificial usada para vacunos y ovinos, la cual consistía en un tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 cm. de largo con una funda interna de látex, un cono de látex al que envolvía un alambre en espiral simulando la cérvix de la alpaca y al final un frasco de colección de semen de ovino o un tubo de centrifuga, el agua a 45° se coloca por una

válvula-espita; los machos aceptaron el maniquí después de un corto entrenamiento; la copula se interrumpía cada 10 minutos aproximadamente para renovar el agua caliente, el semen colectado varió, dependiendo del macho, el color del eyaculado, independientemente del volumen, fue de un blanco lechoso a blanco claro, este semen no muestra motilidad masal por lo espeso de su consistencia.

(Dávalos *et al.*, 1999) Menciona que el método por vagina artificial evita la contaminación del esperma con la orina y permite evaluar la libido del macho; las propiedades del semen dependen de la utilización de una hembra o del maniquí.

El uso de la vagina artificial (VA), modificado es mediante el empleo de un tubo especial adaptado con bandas de látex y llenadas con agua caliente que ejercerá cierta presión sobre el pene del camélido, para mantener la temperatura constante, la vagina artificial es enteramente cubierta con una frazadilla eléctrica, controlándose la temperatura ideal que permita simular la cópula con la hembra. Siendo esta técnica también empleada por diversos autores, (Valle, 2013, Alarcón *et al.*, 2012).

### **2.3.3. DEGELIFICACIÓN O LICUEFACCIÓN DE SEMEN DE LLAMA**

La alta viscosidad es común en el semen de los camélidos. Esto representa un desafío más para realizar estudios como la evaluación de las características microscópicas y desarrollar la inseminación artificial. Muchas investigaciones citan la viscosidad natural del semen de los camélidos como el principal obstáculo que impide el desarrollo de la conservación y la inseminación artificial (Morton *et al.*, 2008).

Los investigadores han intentado reducir o eliminar esta viscosidad por medios mecánicos o enzimáticos (Bravo *et al.*, 1999; Giuliano *et al.*, 2010) sin embargo, no han podido determinar la causa subyacente de La viscosidad. En consecuencia, se



ha utilizado un enfoque aleatorio mediante el cual se han probado una serie de proteasas y enzimas. Se ha logrado cierto éxito con la colagenasa en la que se eliminó la viscosidad y se mantuvo la función del esperma en llamas (Giuliano *et al.*, 2010) y alpacas (Bravo *et al.*, 1999). Sin embargo, otros investigadores han documentado un efecto perjudicial de la colagenasa en alpacas (Morton *et al.* 2008) y no se ha evaluado la capacidad de crio conservar los espermatozoides tratados con colagenasa.

Para que la industria consiga la aplicación práctica de la crioconservación de espermatozoides y un sistema viable de inseminación artificial en llamas, es necesario determinar la causa y la fuente del plasma seminal viscoso e investigar métodos para eliminar esta viscosidad sin perjudicar el esperma.(Kershaw-Young *et al.*, 2012), realizando un estudio en camélidos donde identificó muchas proteínas, una de ellas la mucina 5B fue identificada como una gran proteína formadora de gel y la fuente de esta proteína como la glándula bulbouretral, y la revisión de la literatura sugieren fuertemente que la proteína Mucina 5B es la causa de la viscosidad en el plasma seminal de camélidos.

Si bien no hay enzimas disponibles comercialmente que degraden específicamente la Mucina 5B, se identificaron algunas proteasas genéricas adecuadas. De estos, se encontró que la papaína era la más adecuada en base a una revisión de la literatura disponible. La papaína es una serina proteasa que reduce la viscosidad del plasma seminal en las alpacas (Morton *et al.* 2008), aunque a una concentración alta (> 0.5 mg / ml) y cuando los espermatozoides se exponen a la papaína durante períodos prolongados, la papaína es perjudicial para la función del esperma. En particular la integridad del acrosoma.

También se investigó el uso del inhibidor de papaína (E-64) para detener la digestión de proteínas plasmáticas seminales con papaína. Se determinó que 0,1 mg / ml de papaína durante 20 minutos a 37 ° C seguido de incubación con 10 µM de E-64 a 37 ° C durante 5 minutos reducida la viscosidad del plasma seminal sin afectar la motilidad del esperma, la viabilidad, la integridad del acrosoma y la integridad del ADN. (Kershaw-Young *et al.*, 2012).

## **2.4. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE LLAMA.**

### **2.4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.**

Dentro de las características macroscópicas del semen de camélidos sudamericanos, se consideran: volumen, color, filancia y pH. Estas características del eyaculado dependerán del tipo de colección y de la manipulación, así como de las características fisiológicas de cada animal.

#### **2.4.1.1. Volumen**

El volumen de semen en llamas es muy variable, esta variabilidad está influida directamente por el método de colección (Vagina artificial, Electroeyaculación, Desviación del conducto deferente y otros).

**Tabla 1. Volumen seminal de llamas, por métodos de colección y autores**

<b>Autor</b>	<b>Método</b>	<b>Volumen(ml)Prom ± D. E</b>
Laruta <i>et al.</i> , (2015)	E. E	1.67 ±0.29
Valle., (2013)	E. E	0.25
Rodríguez., (2013)	E. E	1.6±0.6
Carretero <i>et al.</i> , (2012)	E. E	2.8 ± 1.69
Casaretto <i>et al.</i> , (2011)	E. E	3.19 ± 1.8
Carretero <i>et al.</i> , (2009)	E. E	3.6 ± 1.3
Giuliano <i>et al.</i> , (2008)	E. E	2.78 ± 1.2
	V.A	2.45 ± 1.62
Godoy., (2014)	V.A	5.48±0.5
Valle., (2013)	V.A	1.56
Aller <i>et al.</i> , (2003)	V.A	2.2 ± 1.3
Von Baer y Hellemann, (1998)	V.A	3.5 ± 1.7
Lichtenwalner <i>et al.</i> , (1996)	V.A	3.0 ± 1.9

Fuentes: Indicadas

#### **2.4.1.2. Color**

(Rodríguez, 2013), Menciona que la evaluación del color por el método electro eyaculación en llamas, por observación directa, en el tubo colector Falcón, para tal considero tres tonalidades: blanco lechoso en 73.4%, blanco cremoso en 13.3% y blanco cristalino 13.3 %.

(Valle., 2013) Reporta que el color evaluado por el método de vagina artificial y Electroeyaculación en llamas por observación directa es de blanco lechoso en ambos métodos.

(Alarcón *et al.*, 2012), Reporta que el color evaluado por el método de vagina artificial en alpacas por observación directa varia de blanco lechoso en un 60%, blanco cristalino en 40%.

(Quispe, 2018), Reporta que el color evaluado por el método de vagina artificial en alpacas por observación directa varia de blanco lechoso en 33.6%, blanco cristalino de 75.6% y blanco claro de 16.6%.

### **2.4.1.3. Filancia**

La filancia se define como la capacidad de formación de hilo y es, por lo tanto, una característica reológica diferente a la viscosidad. La formación de hilo no refleja la viscosidad del semen, sino que se está evaluando la filancia del mismo reportado por (Giuliano *et al.*,2012).

(Casaretto *et al.*,2011) evaluó de 45 eyaculados de llama, mediante un viscosímetro de cono plato, determinamos que no había relación entre la formación de hilo y las viscosidades medidas ya que muchas muestras presentaron valores altos de viscosidad aparente y estructural y no formaron hilo

(Ccalta, 2017), Reporta que la filancia en alpacas colectadas por el método de post copula es de  $23.8 \pm 0.70$ mm.

### **2.4.1.4. PH**

Un pH aproximado de 7 (de 6,9 a 7,5 para las diferentes especies) cae en límites de actividad optima de la mayoría de las enzimas del espermatozoide. Por lo tanto, si se mantiene un pH neutro (7,0) se espera una tasa metabólica elevada. Si el pH del semen se desvía hacia la alcalinidad o hacia la acidez, se reducirá el índice metabólico (Sumar,1991).

La investigación en esta área establece la importancia de diluir el semen en un medio amortiguado que resista los cambios de pH, de manera que se pueda mantener la vida máxima fértil del espermatozoide. (Bearden y Fuquay, 1980).

**Tabla 2.** PH seminal de llamas, por el método de vagina artificial (VA).

<b>Autor</b>	<b>Método</b>	<b>Media <math>\pm</math> D. S</b>
Godoy, 2014	Vagina artificial	7.97 $\pm$ 0.3
Valle., 2013	Vagina artificial	7.41
Giuliano <i>et al.</i> , 2012	Vagina artificial	6.4 $\pm$ 8
Aller <i>et al.</i> , 2003	Vagina artificial	7.4 $\pm$ 0.38
Valle., 2013	Electroeyaculacion	7.08

Fuentes: Indicadas.

## **2.4.2. Características microscópicas**

### **2.4.2.1. Motilidad**

De acuerdo a (Gonzalez, 2000) La motilidad es una característica de la célula espermática y se trata de uno de los parámetros más importantes en las concentraciones seminales, debido a que es imprescindible para que se produzca la fecundación. Pero ojo, no es sinónimo de fertilidad.

La motilidad total en camélidos no está presente como en el caso de los carneros, en camélidos es mejor referirse como motilidad individual y oscilatoria, con movimiento lento que en parte es debido a la viscosidad del semen (Bravo *et al.*, 1997).

El porcentaje de motilidad es muy importante pues en la mayoría de casos es inferior al 60%; la mayoría de los espermatozoides de un eyaculado no diluido realizan movimientos oscilatorios sobre sí mismos y solamente entre el 5 y 10% muestran movimiento progresivo (Bravo *et al.*, 1997; (Ordoñez *et al.*, 2013).

Recientemente hemos iniciado los estudios sobre los parámetros de velocidad de los espermatozoides de alpacas y llamas, como velocidad curvilínea, velocidad rectilínea, velocidad media, índice de oscilación, amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza, entre otros, los cuales pueden ser determinados empleando el ISAS®. (Ordoñez., *et al* 2012).

**Tabla 3.** Motilidad espermática en semen de camélidos clasificadas según el tipo de motilidad en semen fresco.

<b>Autor</b>	<b>Método</b>	<b>Especie</b>	<b>MNP (%) ± D. E</b>	<b>MP (%) ± D. E</b>
Rodríguez., (2013)	EE	Llamas	12.7 ±2.2	1.2±2.2
Valle, (2013)	EE	Llamas	54.66%	
Giuliano <i>et al.</i> , (2010)	EE	Llamas	4.4±10.43	-
Huanca, (2015)	EE	Alpacas	13.25±9.91	1.43±1.30
(Valle, (2013)	VA	Llamas	53.25%	
Garcés, (2017)	VA	Alpacas		4,63±0,05
Huanca, (2015)	PC	Alpacas	10.86±6.27	1.58±1.00
Huanca, (2015)	DCD	Alpacas	14.07±10.31	-
Meza, (2014)	DCD	Alpacas	29.85±14.95	

Fuentes: indicadas.

#### **2.4.2.1.1. Uso de dilutores para mejorar las características seminales en llamas.**

Se han utilizado diferentes enzimas para mejorar las características reológicas del plasma seminal con resultados variados incubaron eyaculados de alpaca en soluciones acuosas de tripsina y colagenasa, pero, aunque observaron una disminución de la viscosidad también observaron una disminución del porcentaje de movilidad espermática (Bravo *et al.*, 1999).

En otra experiencia, (Bravo *et al.*, 2000) observaron que las enzimas tripsina, colagenasa, hialuronidasa y fibrinolisisina son efectivas para disminuir la viscosidad del semen de alpaca y llama, pero no consiguieron que los espermatozoides adquiriesen movilidad progresiva.

Para la pre-dilución se utilizó la formulación de extracto de piña más un dilutor específico), para romper la viscosidad del semen de llamas por el método de hembra-maniquí. En una relación de 1:0.75 (1 ml de semen más 750 µL de extracto de piña) todo a 38°C para luego realizar la evaluación de las características microscópicas del semen desarrollada por (Delgado y Quispe, 2015).

Cada eyaculado se dividió en cuatro alícuotas. Las alícuotas se diluyeron 4: 1 y 8: 1 en una solución de colagenasa 1mg / ml en medio H-TALP-BSA (tratamientos 1 y 3) y 4: 1 y 8: 1 en medio H-TALP-BSA (sin colagenasa) (tratamientos 2 y 4). Los tratamientos 1 y 2 se incubaron a 37 ° C durante 4 minutos y los tratamientos 3 y 4 se incubaron a 37 ° C durante 8 minutos, Posteriormente se evaluaron las características microscópicas según Giuliano *et al.*, (2010) evaluado en llamas por el método de Electroeyacuación.

Para disolver la viscosidad del semen de llama se utilizó extracto de jugo de piña en una relación de 1:0.5 (semen: extracto de jugo de piña), antes de evaluar las características microscópicas del semen de llama, según (Laruta *et al.*, 2015).

**Tabla 4.** Motilidad espermática (%) en semen fresco de llamas colectadas por el método de Vagina Artificial (VA) y electroeyacuación (EE).

<b>Autor</b>	<b>Método</b>	<b>Motilidad espermática (%) ± D. E</b>
Carretero <i>et al.</i> , (2012)	E. E	28.2 ± 19.3
Casaretto <i>et al.</i> , (2011)	E. E	38.53 ± 28.5
Carretero <i>et al.</i> , (2009)	E. E	35.0 ± 17.6
Giuliano <i>et al.</i> , (2008)	E. E	58.68± 15.03
	V.A	60.13±12.6
Godoy., 2014	V.A	11±1.8
Aller <i>et al.</i> , (2003)	V.A	68,5±12,3
Von Baer <i>et al.</i> , (1998)	V.A	25.5
Lichtenwalner <i>et al.</i> , (1996)	V.A	23.7 ± 20.0

Fuentes: Indicadas

**Tabla 5.** Motilidad espermática (%) en semen de camélidos diluidos con diferentes con diferentes degelificantes, colectados por diferentes métodos.

<b>Autor</b>	<b>Método</b>	<b>Especie</b>	<b>Diluyente</b>	<b>Motilidad espermática (%) ± D. E</b>
Laruta <i>et al.</i> , (2015)	E. E	Llamas	Extracto de piña	22.8±5.6
Carretero <i>et al.</i> , (2014)	E. E	Llamas	Colagenasa	22.7±10.5
Giuliano <i>et al.</i> , (2010)	E.E	Llamas	H-TALP-BSA con Colagenasa	45.4±20.81
Delgado y Quispe (2015)	V.A	Llamas	Extracto de piña	64±10
Quispe, (2018)	PC	Alpacas	TALP+papaína	33.47±20.34

Fuentes: Indicadas

#### **2.4.2.2. Concentración**

La determinación del número de espermatozoides en un eyaculado, dado que es una característica muy variable; para así determinar a cuantas hembras se puede inseminar con un número óptimo de células espermáticas. La concentración espermática depende de la secreción de la testosterona por los testículos pudiendo variar en diferentes muestras de semen, si varía la contribución de las diversas glándulas accesorias (Fernández-Baca, y Novoa, 1968).

(Santos, 1980), Menciona que es importante la determinación del número de espermatozoides, dado que es una característica muy variable la cantidad de espermatozoides para determinar específicamente a cuantas hembras se puede inseminar con un número óptimo de células espermáticas.

(Valle, 2013), Por el método de Electro eyaculación se obtuvieron el promedio 294166 de concentración espermatozoides/ml y por el método de vagina Artificial una de concentración 252250 espermatozoides/ml.



**Tabla 6.** Concentración espermática, colectadas por el método de Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculación (EE).

<b>Autor</b>	<b>Método</b>	<b>concentración espermática (106/ml) ± D. E</b>
Laruta <i>et al.</i> , (2015)	E. E	39.14 ±11.22
Rodríguez., (2013)	E. E	84.39±71.93
Carretero, <i>et al.</i> , (2012)	E. E	77.0 ± 83.6
Casaretto, <i>et al.</i> , (2011)	E. E	78.43 ± 101.48
Giuliano <i>et al.</i> , (2008)	E. E	20.96±25.31
	V.A	82.24 ± 61.28
Godoy., (2014)	V.A	33.3±9.3
Aller <i>et al.</i> , (2003)	V.A	75.2 ± 20.4
Von Baer, <i>et al.</i> , (1998)	V.A	85.0 ± 89.0

Fuentes: Indicadas

#### **2.4.2.3. Vitalidad espermática (porcentaje de espermatozoides vivos y muertos)**

De acuerdo a (Hanses, 1999) el valor de la determinación de espermatozoides vivos es comparable a la de la motilidad, en relación a la probable fertilidad del semen, a mayor cantidad de espermatozoides vivos mayor será la cantidad de espermatozoides vivos y mayor la calidad del semen.

Las tinciones permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos. El examen de 100 células por frotis es suficiente para su determinación; estos frotis se observan a 40x, (Falcón, 1972).

En la colección de esperma por vagina artificial, indica que el porcentaje de espermatozoides muertos no debe ser mayor a 12%. Y el porcentaje aceptable de espermatozoides vivos puede fluctuar de 88% a 96%, esto dependiendo de todos los factores que influyen sobre la supervivencia de los espermatozoides, Estudios realizados por (Torres , 1989).

**Tabla 7:** Porcentaje de Vitalidad espermática del semen de llamas colectadas por el método de Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculación (EE).

Autor	Método	Fresco	Fresco diluido	Método Tinción
Laruta <i>et al.</i> , (2016)	EE	86.67± 5,77		Eosina-Nigrosina
Giuliano <i>et al.</i> , (2010)	EE	60.22± 12.57		CFDA/PI
Giuliano <i>et al.</i> , (2010)	EE	-	57.13±13.51	CFDA/PI
		-	63.41±14.64	
Delgado y Quispe, (2015)	VA	71.4± 9		Eosina-Nigrosina
Godoy, (2014)	VA	49.55±2.8		Eosina-Nigrosina
Aller <i>et al.</i> , (2003)	VA	68.5±12.3		Eosina-Nigrosina

Fuentes: Indicadas

#### 2.4.2.4. Funcionalidad de la Membrana Espermática (HOST).

Se consideraron espermatozoides con membrana funcional (HOS+) los que reaccionaron al estrés hipoosmótico mediante la hinchazón de la parte distal de la cola espermática, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados (HOS-) (Banda *et al.*, 2010). Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides con membrana funcional (HOS+) (Banda *et al.*, 2010).

**Tabla 8:** Porcentaje de reacción total al efecto del estrés hipoosmótica de semen de llamas colectadas por el método de Electroeyaculación (EE) y Vagina Artificial (VA).

Autor	Método	solución hipoosmotico	Semen	Semen
			Fresco	Diluido
Rodríguez, (2013)	Electroeyaculación	50 mOsm	38.2±1.93	
Giuliano <i>et al.</i> , (2010)	Electroeyaculación	50 mOsm	42.35±15.03	38.17±16.04
				50.51±14.73
Giuliano <i>et al.</i> , (2008)	Electroeyaculación	50 mOsm	29.46±15.34	
	Vagina Artificial		35.58±13,93	
(Giuliano <i>et al.</i> ,2003)	Vagina Artificial	50 mOsm	39±19	

Fuentes: Indicadas

#### 2.4.2.5. Integridad acrosomal

La evaluación de la integridad acrosomal ha sido estudiada en distintas especies domésticas, incluidos los Camélidos Sudamericanos (CSA), por su importancia en la fecundación (Ugarelli *et al.*,2015) La RA (reacción acrosomal) es un proceso exocitótico que consiste en la función del acrosoma con la membrana plasmática, resultando en la exposición y liberación del contenido acrosomal al medio extracelular (Ramalho-Santos *et al.*, 2002) permitiendo que se realice la fecundación del ovocito. La liberación del contenido acrosomal se lleva a cabo cuando el espermatozoide entra en contacto con mecanismos de señalización que se encuentran en la zona pelúcida (Harrison , 1998)y esta mediado por la progesterona (Patrat *et al.*; 2000), además de estar regulado por el incremento intracelular de calcio. En la llama se ha utilizado la tinción con Coomassie Blue para evaluar la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal (Giuliano *et al.*,2012).

**Tabla 9:** Porcentaje de Integridad de la membrana acrosomal del semen de camélidos colectadas por el método de Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculación (EE).

<b>Autor</b>	<b>Método</b>	<b>Especie</b>	<b>Integr. (%) ± D. S</b>	<b>Tinción</b>
Fumuso <i>et al.</i> , (2014)	EE	Llamas	81.51± 10.95	Coomasie blue
Carretero <i>et al.</i> , (2014)	EE	Llamas	48.3± 10.2	-
Carretero <i>et al.</i> , (2015)	EE	Llamas	64.44±13.6	FITC-PNA
Quispe, (2018)	VA	Alpacas	76.46± 16.23	Coomasie blue

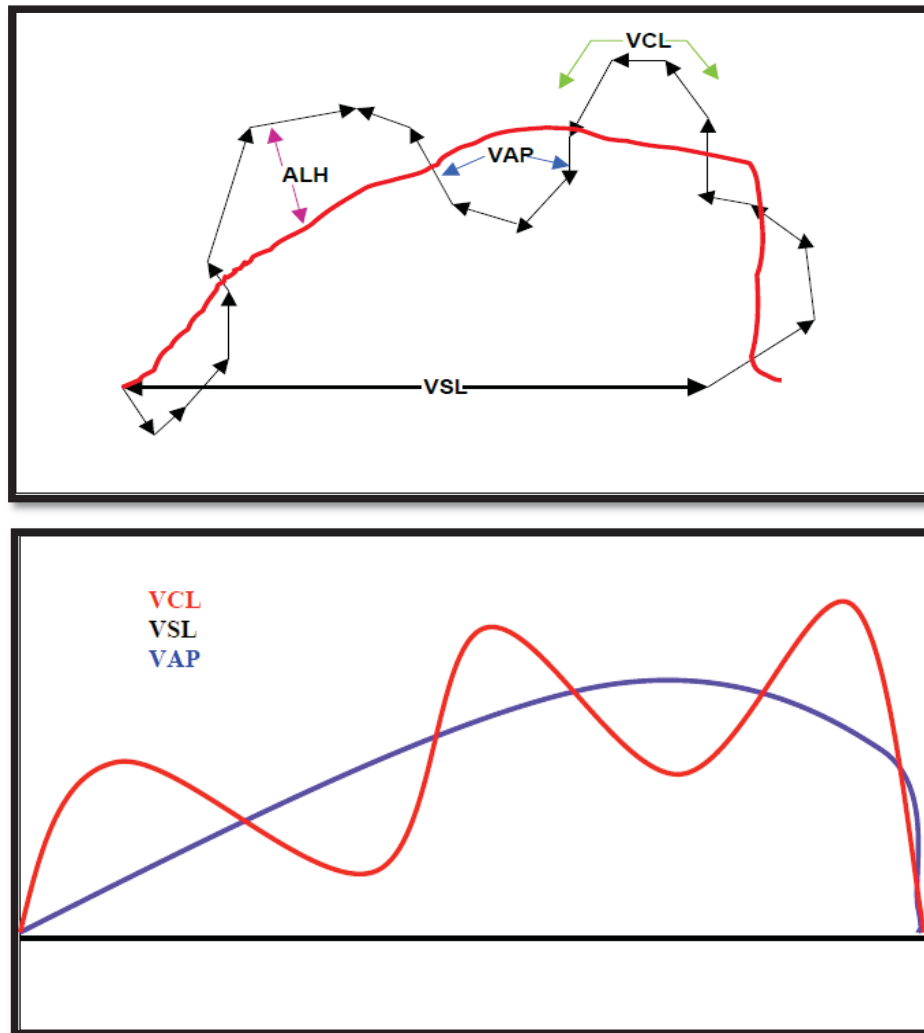
Fuentes: Indicadas

### 2.4.3. PARAMETROS DE MOTILIDAD

#### 2.4.3.1. Parámetros que evalúan la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides.

- **Velocidad curvilínea (VCL):** Velocidad promedio de desplazamiento de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria real. Se mide en  $\mu\text{m}/\text{seg}$ .
- **Velocidad rectilínea (VSL):** Velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de una línea recta, desde la primera hasta la última posición. Se mide en  $\mu\text{m}/\text{seg}$ .
- **Velocidad promedio de desplazamiento (VAP):** Velocidad promedio de la cabeza del espermatozoide a lo largo de su trayectoria promedio. Se mide en  $\mu\text{m}/\text{seg}$ .
- **Porcentaje de linealidad (LIN):** Relación entre VSL y VCL. Se mide en porcentaje (%).
- **Índice de rectitud (STR):** Relación entre VSL y VAP. Se mide en porcentaje (%).
- Así mismo, se puede evaluar la trayectoria que realiza la cabeza del espermatozoide, a través de parámetros tales como:
- **Índice de oscilación (WOB):** Relación entre VAP y VCL. Se mide en porcentaje (%).
- **Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH):** Valor promedio lado a lado de la cabeza en cada ciclo de batido. Se mide en  $\mu\text{m}$ .
- **Frecuencia de batido (BCL):** frecuencia con la cual la verdadera trayectoria del espermatozoide cruza la trayectoria promedio. Se mide en Hz.

- **Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALHMed):** desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, de un lado a otro de la trayectoria media o lineal. Se mide en  $\mu\text{m}^2$ .
- **Amplitud máxima del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALHMax):** máximo desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.



**Fuente:** Quintero, 2003.

**Figura 2:** Terminología estándar de algunos parámetros de motilidad (VCL, VSL, VAP Y ALH) obtenidos por el sistema CASA.

En estudios realizados en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos CICAS-La Raya perteneciente a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Escuela profesional de zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), utilizando el ISAS CASA para evaluar la motilidad y características generales de las velocidades de los espermatozoides de alpacas y llamas por diferentes métodos, los resultados se muestran en los siguientes cuadros.

**Tabla 10:** Parámetros de motilidad espermática en semen de llamas colectadas por el método de Electroeyaculación (EE).

VARIABLE	N	Prom	± D. E	C.V (%)	Min	Max
VCL (um/s)	15	36.9	8.8	24	24.1	52.8
VSL (um/s)	15	8	2.3	29.4	5.6	13.9
VAP (mm/s)	15	18.5	3.3	17.7	13.2	24.2
LIN (%)	15	22.2	5.5	24.9	13.3	30.4
STR (%)	15	43	8.2	19.2	31.9	58.8
WOB (%)	15	51.6	9.7	18.8	36.1	75.7
ALH (mm)	15	1	0.8	74.8	0	2.7
BCF (Hz)	15	1.8	1.8	101	0	6.7

Fuente: Rodríguez, 2013.

**Tabla 11:** Parámetros de motilidad espermática colectadas por el método de Vagina artificial (VA) y Póst copula (PC) en alpacas.

Variables	N	Vagina artificial			Post cópula		
		Media	± D. S	C.V (%)	Media	± D. S	C.V (%)
VCL (µm/s)	12	36,09 a	5,53	15,32	34,62 a	8,14	23,53
VSL (µm/s)	12	10,03 a	2,55	25,42	9,56 a	1,55	16,19
VAP (µm/s)	12	16,50 a	5,84	35,39	18,8 a	3,81	20,26
LIN (%)	12	27,88 b	5,81	20,83	28,18 a	3,30	11,72
STR (%)	12	49,73 b	17,67	35,53	51,50 a	4,59	8,91
WOB (%)	12	46,18 b	15,19	32,89	54,76 a	5,23	9,55
ALH (µm)	12	1,65 a	0,38	23,33	1,57 a	0,48	30,47
BCF (Hz)	12	3,33 a	1,96	58,98	1,36 b	0,49	35,99

Quispe, (2018)

**Tabla 12:** Parámetros de motilidad espermática colectadas por el método de Desviación del conducto deferente en alpacas.

Variables	DCD	
	Media	± D. S
VCL (µm/s)	57.9297	7.9795
VSL (µm/s)	14.3382	2.271
VAP (µm/s)	28.7794	4.2475
LIN (%)	24.7694	2.1826
STR (%)	49.872	2.8192
WOB (%)	49.2112	1.5196
ALH (µm)	2.2667	0.3445
BCF (Hz)	3.1932	0.8155

Meza, (2014).

#### 2.4.4. DETERMINACIÓN DE SUB-POBLACIONES ESPERMÁTICAS.

El CASA permite identificar la existencia de subpoblaciones de espermatozoides con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen (Davis y Siemers, 1995; Holt, 1996; Abaigar *et al.*, 1999). En los últimos años se ha demostrado la existencia de subpoblaciones espermáticas con distintos patrones de movimiento en los eyaculados de todas las especies estudiadas hasta la fecha. Además, se ha observado que espermatozoides pertenecientes a distintas subpoblaciones responden de forma diferente ante procesos como la crio preservación o la exposición al efecto de agentes capacitantes (Holt, 1996; Abaigar, *et al.*, 1999).

Los espermatozoides que forman parte de un eyaculado no son uniformes en cuanto a sus características de motilidad, es decir, en el mismo eyaculado existe un porcentaje de espermatozoides que se mueven de forma rápida y progresiva, otro porcentaje de espermatozoides que se mueven más lentamente, y por último, aparece un número de espermatozoides sin apenas movimiento. Por lo tanto, si no

consideramos la existencia de estas subpoblaciones en un eyaculado, tal y como se hacía hasta hace pocos años, y partimos de la base de que el eyaculado es una población homogénea, se estará perdiendo información relevante. Probablemente, la capacidad fecundante de un eyaculado o de una dosis de semen descongelado resida únicamente en la subpoblación que contiene a los espermatozoides más competentes.

Si esta subpoblación representa un porcentaje muy pequeño, sus características se verán enmascaradas por el resto de la población. Esto explicaría, al menos en parte, que no se haya observado correlación significativa entre parámetros cinéticos medios (por ejemplo, VCL, VSL, LIN o ALH) y la fertilidad in vivo de una dosis seminal (Holt y Van Look, 2004).

Una de las ventajas que tiene el sistema CASA es la clasificación de las células espermáticas presentes en un eyaculado, en subpoblaciones espermáticas, clasificadas de acuerdo a la velocidad. Así, (Muiño *et al.*, 2006) sugieren los siguientes parámetros para la clasificación.

**2.4.4.1. Parámetros que se deben tomar en cuenta para la clasificación en sub poblaciones según (Muiño *et al.*, 2006), son:**

- Velocidad curvilínea (VCL).
- Velocidad rectilínea (VSL).
- Velocidad promedio de desplazamiento (VAP).
- Porcentaje de linealidad (LIN).
- Índice de rectitud (STR).
- Índice de oscilación (WOB).
- Amplitud del desplazamiento lateral de cabeza (ALH).
- Frecuencia de batido (BCF).



**Tabla 13.** Numero de subpoblaciones espermáticas y parámetros de motilidad obtenidos del semen de alpacas colectadas por el método de desviación del conducto deferente.

Parámetros de Motilidad	Subpoblaciones de espermatozoides		
	1	2	3
N°de espermas	126011	69704	18491
Porcentaje (%)	58.8270	32.5406	8.6323
VCL	40.1939 ± 13.4909	81.8459 ± 13.9238	129.2270 ± 19.8503
VSL	10.7389 ± 6.3976	19.5994 ± 10.2267	33.1270 ± 17.1380
VAP	20.8181 ± 7.3850	40.2291 ± 9.7269	66.3539 ± 19.9010
ALH	3.2480 ± 1.4084	3.2498 ± 1.4051	3.2208 ± 1.3902
BCF	4.7257 ± 2.6146	4.7213 ± 2.6160	4.7456 ± 2.6397

Fuente: Meza (2014).

**Tabla 14.** Numero de subpoblaciones espermáticas según especies estudiadas.

Especie	Condición del Semen	Subpoblaciones espermáticas				Autor/año
		1	2	3	4	
<b>Mono titi</b>	Congelado	50	30	20		Holt, (1996)
<b>Cerdo</b>	24h/diluido/24°C	73.4	19.3	7.3		Abaigar et al., (1999)
	Diluido /refrigerado	48.4	32.5	19.1		Thurston et al., 2001.
	Diluido/ refrigerado	45.9	30.7	16.4	7.0	Rivera et al., 2002.
		37	33.6	19.4	10	
<b>Gacela</b>	Congelado	47.4	36.1	10	6.5	Abaigar et al., 1999.
<b>Gacela</b>	Fresco diluido	55	26.7	10.3	8	Abaigar et al., 2001.
<b>Perro</b>	Fresco	34.4	24.7	21.5	19.4	Quintero Moreno et al., 2003.

Fuentes: Indicadas.

En estudios realizados en semen de diferentes especies se encontraron subpoblaciones espermáticas las mismas que varían según la condición del semen (fresco, diluido, congelado, refrigerado) como se puede ver en el siguiente cuadro.

**Tabla 15.** Publicaciones realizadas en subpoblaciones espermáticas en diferentes especies estudiadas en función de la motilidad espermática.

<b>Especie</b>	<b>N° de subpoblaciones</b>	<b>Autor</b>
Caninos	4	Dorado et al., (2010)
Caprinos	4	
Toros Holstein	4	Muiño et al., (2007)
Caninos	4	Iguer-ouada y Verstegen, (2001)
Equinos	4	Quintero, (2003)
Porcinos	3	
Conejos	4	
Burros catalanes	4	Miro et al., 2004
Carneros	5	Bravo et al., 2011
Mono titi	3	Abaigar et al., 1999
Humano	5	Davis et al., 1995

Fuente: Quintero, (2003).

## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Área geográfica

El trabajo de investigación se desarrolló en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos CICAS “La Raya”, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, situado en el distrito de Marangani, provincia de Canchis y Departamento de Cusco.

#### 3.2. Ubicación

- Latitud Sur. 14° 00' - 15° 45'
- Longitud Oeste. 69° 00' - 75° 00'
- Altitud. 4 200 m.s.n.m.

**Tabla 16.** Estación meteorológica de La Raya.

• Promedio de precipitación pluvial	• 519 mm.
• Temperatura promedio Anual.	• 6 °C - 15.5 °C

Fuente: Estación Meteorológica de La Raya.



**Foto 1:** Centro de investigación de camélidos sudamericanos (CICAS) “La Raya”.

### **3.3. Características Medioambientales de la Zona.**

Está ubicado dentro de la región Puna según la clasificación de Pulgar, (1938) de 4 000 a 4 800 m.s.n.m, está conformado por mesetas andinas en cuya amplitud se localizan numerosos lagos y lagunas. Tiene un relieve escarpado y plano u ondulado.

Según Brack *et al.*, (1980) está ubicado dentro de la ecorregión Puna. La pradera está constituida principalmente por asociaciones de gramíneas, con especies dominantes como: *Festucas*, *stipas* y *calamagrostis*, existen también bofedales donde la vegetación dominante son las *distichias*, *plantagos*, *juncus* y *scirpus* (Machaca *et al.*,2012).

La investigación se desarrolló durante los meses de febrero a junio de 2018, en la ecorregión puna se observa precipitaciones (época de lluvias) de octubre a marzo con temperaturas que fluctúan entre 3 a 17 °C; y en los meses de abril a septiembre identificados dentro de la época de secas en la región andina, caracterizada por la escasez de alimento y temperaturas que van de -8 a 23 °C.

### **3.4. Disponibilidad alimenticia**

En La Raya existen 8 comunidades vegetales predominantes, que están constituidas por especies de *Stipas*, *Festucas*, *Muhlebergias*, *Calamagrostis*, *Distichias*, También existen bofedales donde la vegetación dominante son las *distichias*, *plantagos*, *juncus* y *scirpus*.

### **3.5. MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **3.5.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

Del rebaño se utilizaron 8 llamas machos adultas, seleccionados de 15 animales machos reproductivamente aptos y con buena condición corporal, los animales han sido sometidos a las mismas condiciones de manejo y alimentación,

previamente se realizó el examen clínico de los genitales externos: testículo, pene y prepucio por medios propedéuticos.

### 3.5.2. MATERIALES Y EQUIPOS PARA LA COLECCIÓN DE SEMEN

#### A). Equipos para el Método de Electroeyaculación.

- Balanza mecánica tipo reloj de 100 kg de capacidad
- Electroeyaculador (Minitube manual y automático de /20V)

#### B). Reactivos para el Método de Electroeyaculación.

- Xylasina y Ketamina
- Vitaminas

#### C). Materiales para el Método de Electroeyaculación.

- Tubos falcón de 50 ml
- Jeringas de 15 ml
- Colchón de Esponja
- Lapiceros
- Sogas
- Papel Toalla
- Agua bidestilada



**Foto 2:** Materiales para la colección de semen por Electroeyaculación

## B). Colección por el Método de Vagina artificial

- Maniquí
- Vagina artificial
- Fundas
- Hervidora
- Termómetro
- Frazadilla eléctrica
- Jeringas de 20 ml
- Tubos falcón de 15 ml.



Foto 3: Materiales para la colección de semen por el método de Vagina Artificial.

### 3.5.3. MATERIALES Y EQUIPOS DE LABORATORIO PARA ANÁLISIS DE SEMEN

- Porta objetos y cubreobjetos para evaluación de la motilidad
- Micro pipeta de 0.5 – 10  $\mu$ l y de 10 – 100  $\mu$ l.
- Tips de 0.5 – 10  $\mu$ l y de 10 – 100  $\mu$ l.
- Tubos heppendor
- Baño María
- Baño seco
- Balanza analítica de precisión
- Aceite de inmersión
- Etanol de 70° y de 100°
- Agua bidestilada (ABD)
- Platina caliente
- Refrigeradora
- Cronometro digital tipo reloj
- Algodón

- Guantes quirúrgicos, barbijos y gorras
- Marcador indeleble
- Gradillas

#### **3.5.4. REACTIVOS E INSUMOS**

- Degelificante (papaína)
- Inhibidor de papaína
- Base tris
- Eosina nigrosina para vitalidad
- Comasie blue
- Solución hipoosmótica: citrato de sodio y fructuosa (HOST test)

#### **3.5.5. MATERIAL GABINETE**

- Registros de colección
- Calculadora
- Cámara fotográfica
- Computadora

#### **3.5.6. EQUIPO DE LABORATORIO**

- Microscopio de contraste de fases UB200i con cámara, platina caliente y fluorescencia.
- Computadora con software ISAS
- Motic Plus.



**Foto 4:** Equipo Integrated Sperm Analysis System (ISAS) CASA; microscopio de contraste de fases UB200i con cámara.

### **3.5.7. LABORATORIO**

Las características microscópicas del semen de llama (motilidad, subpoblaciones, concentración, vitalidad), se evaluaron en el “Laboratorio de Biotecnología Reproductiva”, de la Escuela Profesional de Zootecnia del CICAS “La Raya”.

### **3.6. SELECCIÓN DE LOS ANIMALES**

**a). Electroeyacuación:** Este método fue realizado en el mes de febrero a abril de 2018, se seleccionó 4 machos de 3 a 5 años de edad aproximadamente. La frecuencia de colección fue una vez por semana.

La Electroeyacuación consiste en extraer semen a los animales sin previo acostumbramiento. Esto es de suma importancia para la evaluación de reproductores. Está basada en la aplicación rítmica de un estímulo eléctrico por vía transrectal estimulando el sistema nervioso autónomo y somático, que conduce a la obtención de secreciones de las glándulas accesorias y finalmente a la eyacuación.



**b). Vagina artificial:** Para este método se seleccionó de los machos (reproductores) del Centro Experimental “CICAS LA RAYA”, todos fueron adiestrados y acostumbrados a la vagina artificial, y de acuerdo a su capacidad de servicio y su vigor sexual, fueron seleccionados aquellos que mostraron mayor interés por cubrir al maniquí. Posterior a la etapa de adiestramiento se seleccionaron cuatro machos de la raza Q’ara y Ch’aku de 3 y 5 años de edad, con 105 a 130 kg de peso vivo. Los animales seleccionados se alojaron a campo abierto, expuestos al fotoperiodo natural, y la alimentación fue *ad libitum* con pasto natural. La frecuencia de colección fue una vez por semana.

Se realizó el examen clínico de los órganos genitales externos (testículos, pene y prepucio) por medio de exámenes de inspección y palpación, dando especial atención al tamaño y forma de los testículos y epidídimos, palpados a través del escroto, estos se mostraron firmes y elásticos, no se observaron lesiones, deformidades ni adherencia pene-prepucial y también se realizó el respectivo peso de cada llama y La frecuencia de colección fue una vez por semana.

**Tabla 17.** Registro de colección de semen en llamas por el método de Vagina Artificial (VA) y Electroeyaculación (EE).

Animales					Tamaño testicular			
					Izquierdo		Derecho	
Metod	Codigo	Raza	Peso	Edad	Largo	Ancho	Largo	Ancho
EE	4	Ch'aku	132.2	5	4.8	3.5	4.1	3.6
EE	5	Ch'aku	120.6	3	4.4	3.1	4.9	2.3
EE	7	Ch'aku	105.5	5	2.9	5.4	2.8	5.5
EE	8	Q'ara	120.0	6	4.7	3.9	3.9	4.8
V.A	1	Ch'aku	106.5	5	4.0	3.5	5.6	4.7
V.A	3	Q'ara	118.0	3	4.3	3.7	4.6	3.2
V.A	4	Ch'aku	132.2	3	4.8	3.5	4.1	3.6
V.A	6	Ch'aku	115.8	5	4.38	3.3	4.8	3.7

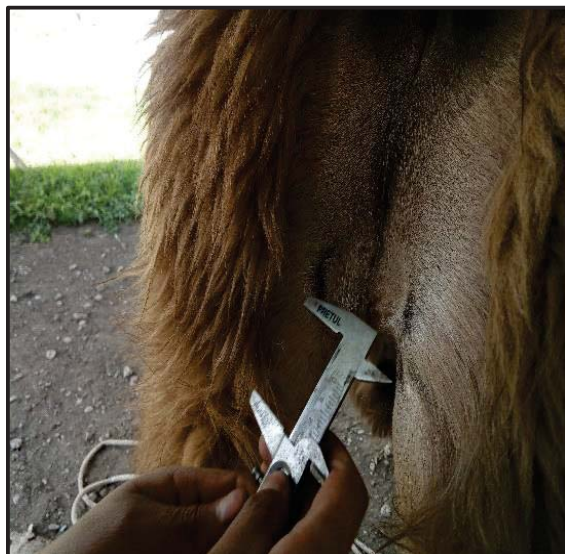


Foto 5. Medida de los testículos

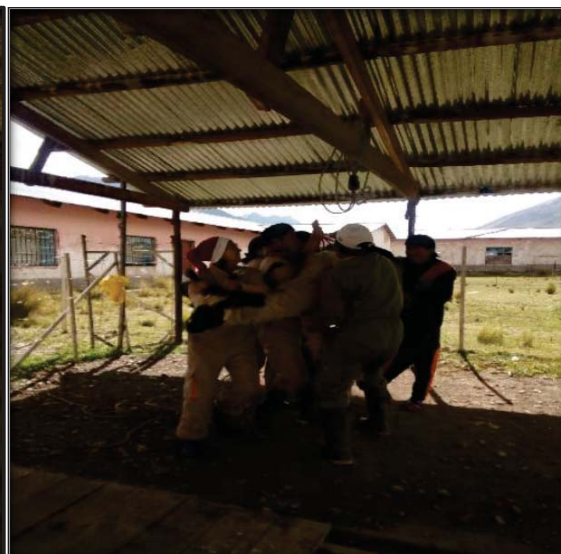


Foto 6. Pesado de las llamas.

Cuadro 18. Registro de colección de semen en llamas por Electroeyacuación.

Animales		Dosis de la anestesia			Respuesta a la estimulación		Duración de la estimulación
Metodo	Cod.	Ketamina(mg)	Xylasina(mg)	Erección	Eyaculación	(min)	
EE	4	3.7	1.98	15 volt.	19 volt.	14	
EE	5	3.37	1.8	18 volt.	20 volt.	17	
EE	7	3.5	1.9	16 volt.	20 volt.	18	
EE	8	3.5	2	13 volt.	18 volt.	15	

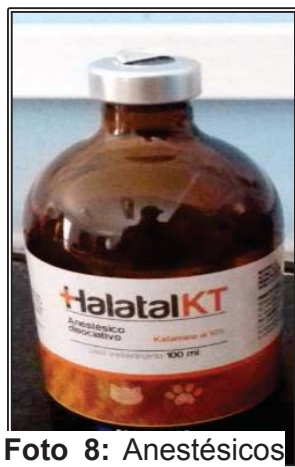


Foto 8: Anestésicos Ketamina



Foto7:Anestésico Xylacina.

### 3.7. DE LA ALIMENTACIÓN:

a) **Método Electroeyacuación:** Los animales durante el experimento estaban con pasto natural, y agua a disponer de ellos en cualquier momento y para realizar el trabajo respectivo fue trasladado cada mañana cerca al laboratorio para facilitar el trabajo.

b) **Método de Vagina artificial:** Durante el experimento su alimentación fue de pasto natural y agua *ad-libitum*.

### 4.8. Preparación de dilutor

Se utilizó un dilutor a base de TRIS para la colección de semen por método de Vagina artificial y Electroeyacuación; preparada de la siguiente manera:

**Tabla 19.** Insumos para la preparación del dilutor madre base TRIS

<b>Composición</b>	<b>Cantidad</b>
Base TRIS (C H NO)	0,3028g
Ácido Cítrico (CHO)	0,17g
Fructuosa (CHO)	0,125g
Agua Bidestilada	10ml

Para tener un adecuado medio para los espermatozoides el dilutor madre se ajustó a una osmolaridad adecuada ya que el dilutor les brinda a los espermatozoides sustancias nutritivas, que neutralicen a los cambios de pH producido por el metabolismo de los azúcares (efecto tampón), Es por eso que se tomó una cantidad de 0.3 ml del dilutor madre se colocó en un tubo de eppendorf para evaluar la osmolaridad en el osmómetro, que en el presente trabajo se ajustó a 300 mOsm/Kg.



**Foto 9:** Insumos para la preparación del dilutor madre en base TRIS

### **3.8.1. DEGELIFICANTE**

Para disolver la viscosidad del semen de llama se utilizó la papaína en una relación de 1:1 (semen: papaína), antes de evaluar las características microscópicas del semen de llama, se utilizó para el método de Electroeyaculación y Vagina artificial.

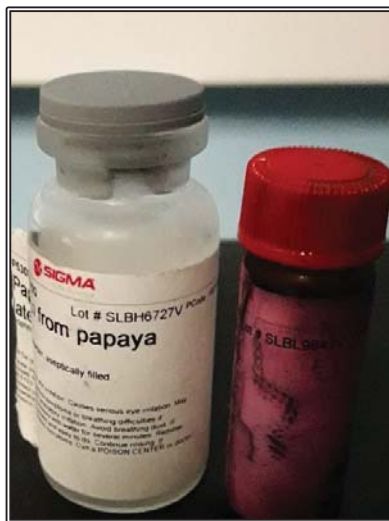
#### **3.8.1.1. PREPARACIÓN DE LA PAPAÍNA:**

- Se preparó en matraz esterilizado 250 ml de Base Tris.
- Luego agregar 25 mg de papaína.
- Se homogenizó las sustancias con ligeros movimientos. concluida la homogenización para su mejor uso, se guardó en un tubo falcón de 50 ml.

#### **4.5.1. 3.8.1.2. USO DE LA PAPAÍNA:**

- Inmediatamente después de la colecta se realizó los exámenes correspondientes en semen Fresco.

- Luego se agregó la papaína a la muestra en relación de (1:1), (papaína: muestra espermática), luego se procede al incubado durante 20 minutos a 37°C.
- Concluido el incubado se agrega el inhibidor de papaína 1µl por 1 ml de muestra, incubar durante 5 minutos.
- Luego se evaluó las características microscópicas (motilidad, vitalidad, integridad acrosoma y Host).



**Foto 10:** Papaína e Inhibidor de papaína

### **3.9. COLECCIÓN DE SEMEN POR EL MÉTODO DE ELECTROEYACULACIÓN Y VAGINA ARTIFICIAL.**

#### **3.9.1. COLECCIÓN POR EL MÉTODO DE ELECTROEYACULACIÓN**

El anestesiado de las llamas se realizó según el protocolo de (Director *et al.*, 2004), con algunas modificaciones, específicamente en las dosis de ketamina y xylacina, se suministró dosis de 1.92 mg de xylacina y 3.50 mg de ketamina por Kg de peso vivo por cada llama, esta modificación se realizó debido a que los animales, mostraron resistencia cuando se anestesiaba con el protocolo de (Director *et al.*, 2004)

(xylacina 0.2 mg/kg de P.V y ketamina 1.5 mg/kg de P.V); es así que se suministró hasta 3.7 ml de ketamina y 1.98 ml de xylacina por animal, se esperó un tiempo aproximadamente de 30 a 60 segundos para que el animal quede inmovilizado.



**Foto 11:** Anestesiado de las llamas con Ketamina y Xylacina

#### **3.9.1.1. Protocolo de limpieza y estimulación eléctrica (Electroeyaculación)**

a. Antes de realizar la colección de semen por electro eyaculación se estimuló al animal a orinar y luego se prosiguió con la limpieza de la zona pene prepucio con 10 ml de solución fisiológica a 37°C, y luego se hizo el respectivo secado, este trabajo previo se realizó para evitar que el semen colectado sea contaminado con la orina y suciedad ubicado a nivel del prepucio.



**Foto 12:** Limpieza del prepucio con agua bidestilada.

- b.** Posteriormente se realizó la limpieza por vía rectal con papel toalla, seguidamente se lubricó el transductor de Electroeyaculación con Gel para facilitar la entrada y así ubicar la próstata del Macho.



**Foto 13:** Limpieza por vía rectal.

- c.** Después de este proceso profiláctico se empezó con la relajación de la S peniana y el posterior desenvaine y sujeción del pene. Es necesario tener sujetado el pene de la llama antes de empezar la estimulación eléctrica. La estimulación eléctrica fue realizada siguiendo el protocolo de (Director *et al.*, 2004), con algunas

modificaciones; con el Electroeyaculador Minitube, para lo cual se introdujo el transductor, previa lubricación hasta la altura de la próstata y seguidamente se empezó la estimulación eléctrica, el incremento de voltaje fue cada 2 voltios, de 2 V hasta 20 V, durando cada estímulo 3 segundos y repitiéndose cada estímulo tres veces con el mismo voltaje, con intervalos de 1 segundo de descanso. El tiempo que duro todo el proceso de colección fue de 15 a 20 minutos. Se observó la erección del pene a 15 Voltios y la eyaculación a 18- 20 voltios, el cual fue diferente para cada llama. Se desechó semen contaminado con orina, el cual fue poco observado en este estudio, espermatozoides.



**Foto 14:** Estimulación eléctrica a la llama



**Foto 15:** Colección de semen por EE.

### **3.9.2. COLECCIÓN DE SEMEN POR VAGINA ARTIFICIAL.**

La colección del semen de las llamas se realizó en el corral de colección ubicado en las cercanías del laboratorio de “Biotecnologías reproductivas”, utilizando para ello, el maniquí. Las llamas fueron trasladadas desde su corral al área de colección de semen, se les limpió con cuidado el prepucio y se permitió que efectúen montas al maniquí, con las características similares a una llama hembra en posición



de cópula con una frecuencia de colecta de 1 vez por semana, para que el macho presente mayor libido, se consiguió plasma seminal de llama hembra y Gel para lubricar el maniquí.

La colección de semen se hizo de manera similar a lo reportado por (Bravo *et al.*, 1997) siguiendo el siguiente procedimiento:

**a)** Para este método de colección, se hizo el acondicionamiento de la vagina artificial para camélidos, con fundas de jebe que contenía agua caliente 38 a 40 °C.



**Foto 16:** Acondicionamiento de la Vagina Artificial

**b).** La vagina artificial acondicionada, se envolvió con una frazadilla eléctrica para mantener la temperatura constante y no interrumpir la cópula.



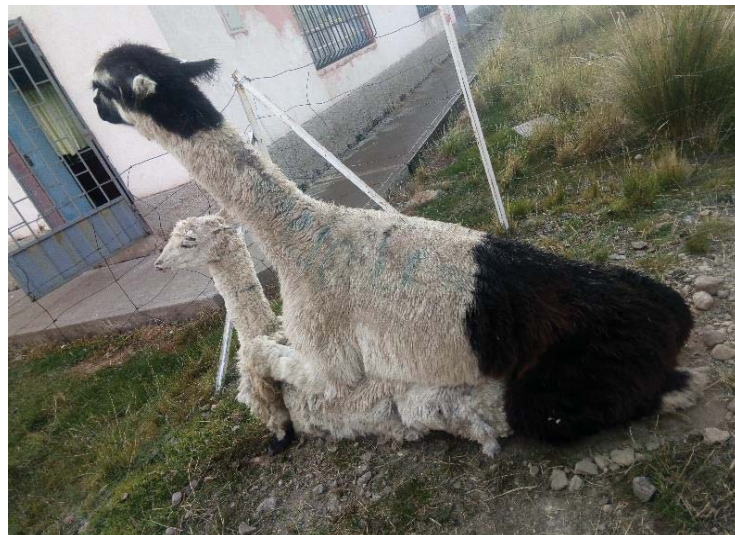
**Foto 17:** Frazadilla Eléctrica envuelta a la vagina

b) Luego se procedió a colocar la vagina artificial al maniquí, tomando las precauciones, como es la temperatura de la vagina artificial, comodidad del macho durante la cópula.



**Foto 18:** Colocado de la Vagina Artificial al Maniquí.

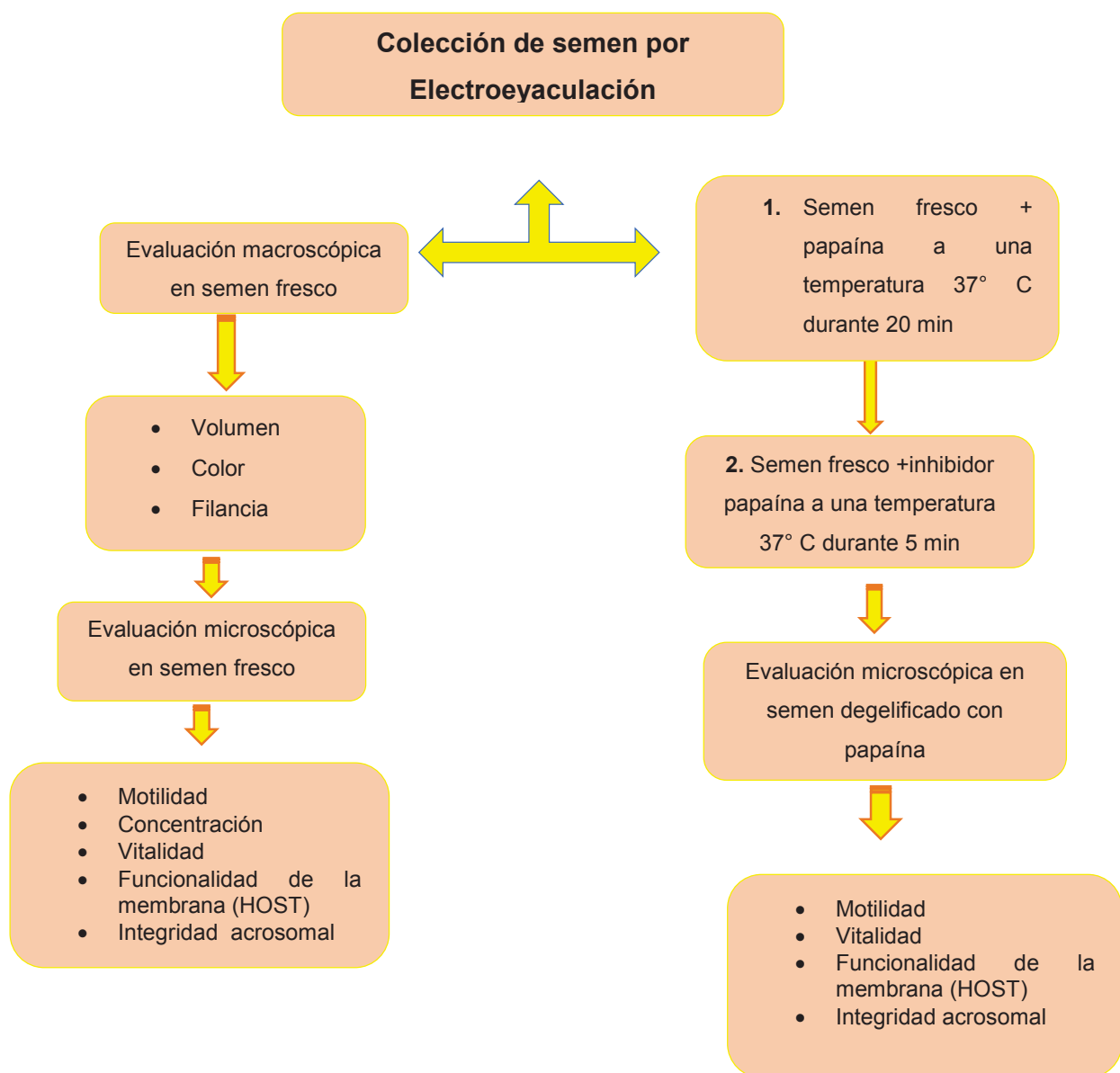
c) Luego se condujo el macho al corral, donde se encuentra el maniquí, se deberá apoyar al macho en la posición correcta durante la cópula que duro aproximadamente 25-35 minutos.



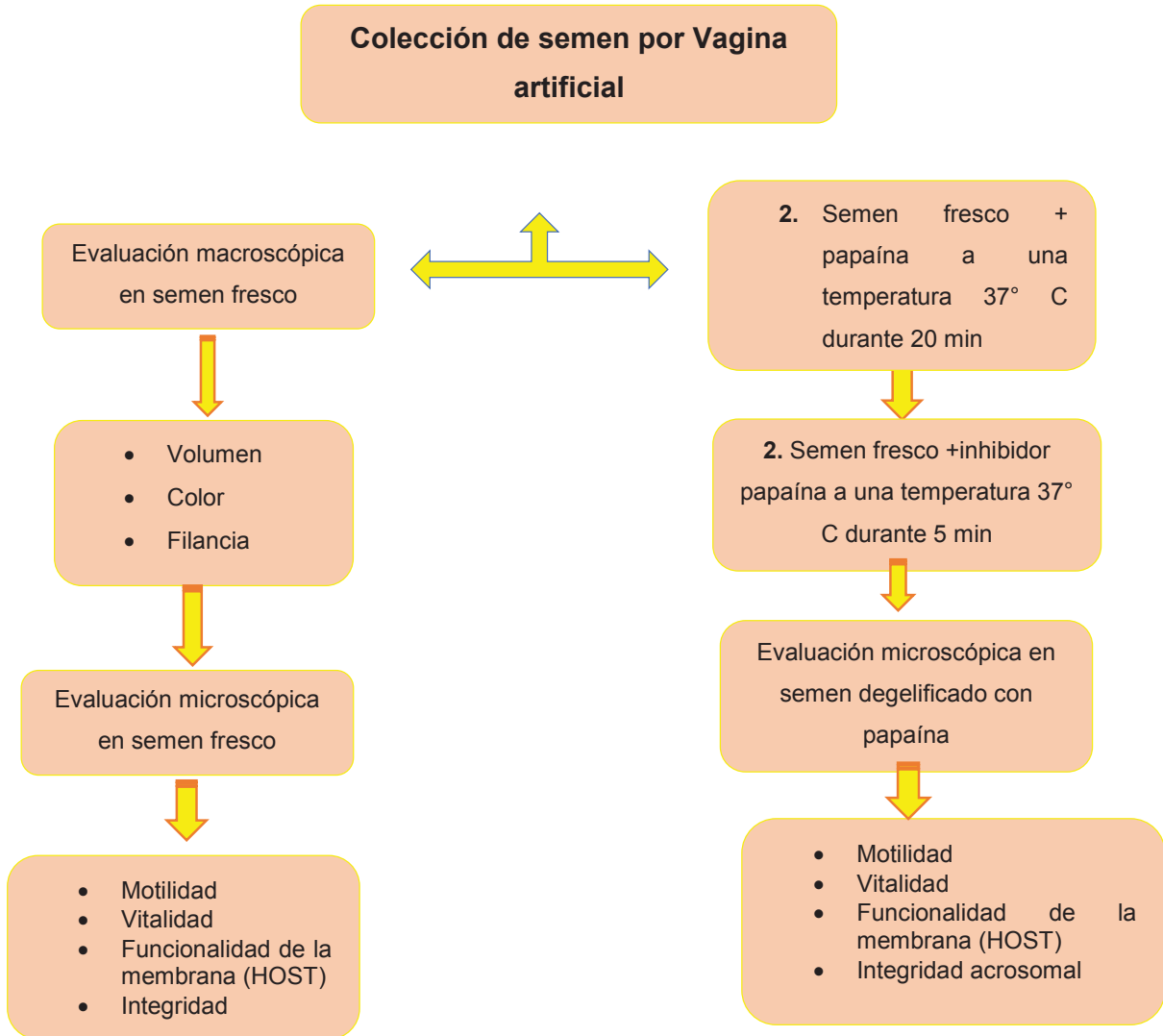
**Foto 19:** Macho copulando al Maniquí.

d) Luego de transcurrir el tiempo de la cópula, se retiró al macho, para recoger la muestra, observando que no haya restos de orina que alteraría la motilidad, posteriormente realizar la evaluación correspondiente de la muestra espermática colectada.

**Gráfico 1.** Flujograma de la evaluación del semen de llamas por el método de Electroeyaculación.



**Gráfico 2.** Flujoograma de la evaluación de semen de llama por el método de Vagina Artificial.



### 3.10. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE SEMEN DE LLAMA

#### 3.10.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

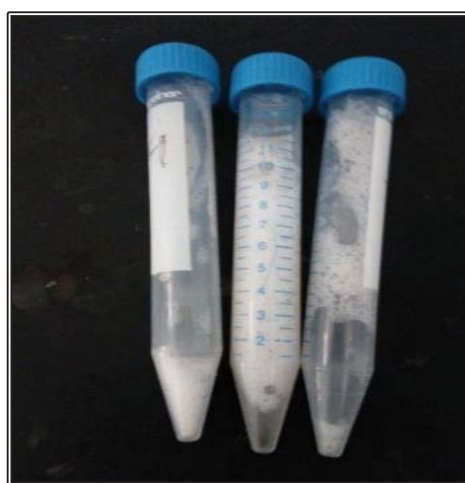
Inmediatamente después de la colección del semen de las llamas, por el método de Electroeyacuación y Vagina artificial, se prosiguió con la evaluación del volumen, color seminal, filancia y pH, es decir las características macroscópicas del semen. Las características macroscópicas del semen colectado se realizaron a través del examen visual.

##### 3.10.1.1. Volumen seminal

El volumen seminal por el método de Electroeyacuación se realizó en tubos Falcón estériles y graduados en mililitros (ml), para facilitar la lectura del volumen del semen colectado, en el cual se dio la lectura a través del examen visual en los tubos graduados Falcón de 50 ml a temperatura corporal. La colección de semen de las llamas por el método de Vagina artificial se realizó en tubos falcón de 15 ml estériles y el volumen Seminal se evaluó a través del examen visual.



**Foto 20:** Evaluación seminal por Electroeyacuación



**Foto 21:** Evaluación seminal por Vagina Artificial.

### 3.10.1.2. Color Seminal

El color seminal por el método de Electroeyaculación y por vagina artificial se determinó paralelamente al volumen a través de la observación directa, para lo cual los tubos Falcón son transparentes.



**Foto 23:** Color seminal por Electroeyaculación.



**Foto 22:** Color seminal por Vagina artificial

### 3.10.1.3. PH seminal

La determinación del pH se realizó utilizando bandas para medir el Ph. con una escala de 1 – 12.

### 3.10.1.4. Filancia seminal

La filancia seminal por el método de Electroeyaculación y vagina artificial de las llamas se realizó como: la medición del hilo formado al pipetear la muestra de semen.

### 3.10.2. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DEL SEMEN

#### 3.10.2.1. Motilidad

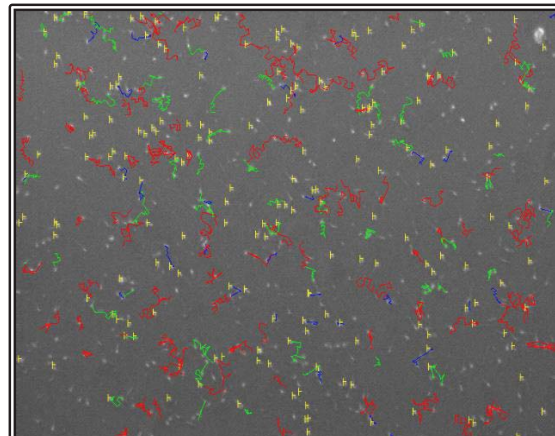
Para determinar la motilidad del semen se procedió a colocar una pequeña fracción de semen obtenido del (5  $\mu$ l) sobre una lámina portaobjetos, previamente calentado a 37°C, cubriendo con el cubre objetos a la misma temperatura, luego se observó en un enfoque de 10X en el Equipo ISAS, que está equipada con una platina térmica.

Se ha trabajado con el módulo de motilidad del sistema ISAS, con una configuración de 25 fotos por segundo, el sistema ha clasificado a los espermatozoides en 3 grupos:

- **Estáticos:** Aquellos espermatozoides que carecen de movimiento, el sistema la marca de color amarillo.
- **Móviles progresivos:** Los espermatozoides que muestran movimiento de traslación, el sistema la muestra de color rojo y verde.
- **Móviles no progresivos:** Los espermatozoides que no muestran movimiento lineal, pero en el mismo lugar o de oscilación de la cabeza, son identificados con un color Azul.



**Foto 25.** Análisis de Motilidad espermática



**Foto 24:** Motilidad espermática del semen.

### 3.10.2.1.1. Parámetros de Motilidad:

Para ver los parámetros de motilidad se utilizó los datos de motilidad. Los parámetros cinéticos medios, obtenidos para el total de los espermatozoides de cada muestra de semen, fueron los siguientes:

#### a) Parámetros de velocidad:

- Velocidad curvilínea (VCL,  $\mu\text{m/s}$ )
- Velocidad rectilínea (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ).
- velocidad media (VAP,  $\mu\text{m/s}$ )
- Índice de linealidad (LIN, %)
- Índice de rectitud (STR, %)
- Índice de oscilación (WOB, %)

#### b) Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:

- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH,  $\mu\text{m}$ )
- Frecuencia de batido (BCF, Hz).

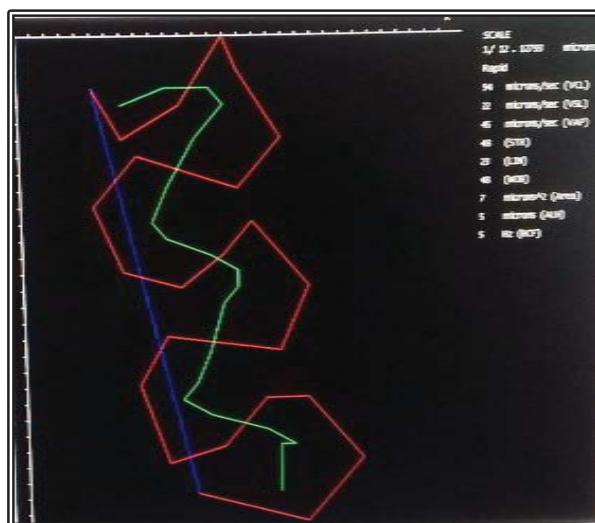


Foto 26: Parámetros de motilidad con el ISAS CASA



### 3.10.2.2. Concentración espermática

Es importante la determinación precisa del número de espermatozoides, dado que es una característica muy variable relacionado al animal.

La concentración espermática fue obtenida usando el módulo de motilidad del Integrated Semen Analysis System (ISAS), para lo cual se procedió a homogenizar la muestra de semen fresco, depositar una pequeña cantidad de muestra (0.5  $\mu$ l) en un porta objetos, cubrir con un cubre-objeto; luego, usando la lente de 40X, se capturo el número necesario de imágenes para el conteo de células espermáticas, contar el número de espermatozoides por campo y guardar las imágenes.



**Foto 27:** Concentración espermática del semen de llamas

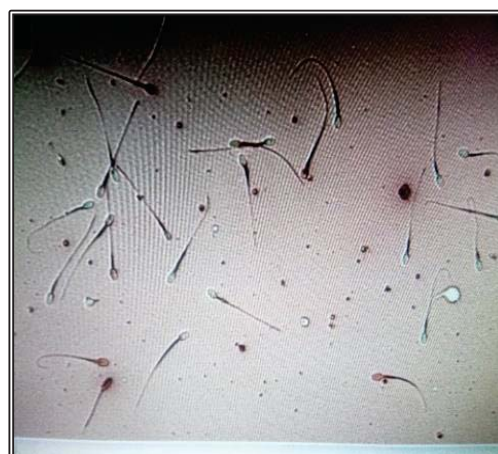
### 3.10.2.3. Vitalidad espermática

El análisis de vitalidad espermática se realizó inmediatamente después de la colección de semen en el Integrated Semen Analysis System (ISAS) en el módulo de vitalidad, Para la evaluación de la vitalidad espermática se utilizó Eosina y Nigrosina que contiene una solución roja y una solución negra.

Se colocó sobre una platina precalentada a 37° los portaobjetos previamente rotulados para evitar la confusión en el momento de la evaluación. Luego con una

micro pipeta graduada se depositó 5µl de la solución espermática de los diferentes tratamientos sobre el portaobjeto que le corresponde, para luego agregar 5µl de eosina, se homogenizo los componentes con movimientos en círculos, posteriormente se depositó sobre la solución homogenizada una gota de 5µl de nigrosina, por último, se homogeniza todos los componentes y se cubre con un cubreobjetos.

Una vez seco el frotis se procedió a observar en el microscopio de contraste con un lente de 40x realizando la captura manualmente de pequeñas poblaciones de células espermáticas, posteriormente se realiza el conteo de 100 células como mínimo por tratamiento, finalmente se clasifico como: espermatozoides teñidos de color verde (vivos) y espermatozoides teñidos de color rojo (muertos). Los valores hallados se promediaron y se expresó en valores porcentuales.



**Foto 28:** Tinción Eosina-Nigrosina. **Foto 29:** Vitalidad espermática teñidos con Rojos muertos(a) y teñidos con verde vivos(b).

#### 3.10.2.4. Funcionalidad de la membrana espermática

La evaluación de la funcionalidad de la membrana del espermatozoide de la llama se realizó en el Motic plus 40X para lo cual se preparó la solución hiposmótica ajustado a una concentración de 50 mosm/kg y también se preparó la solución hiposmótica formulada, y ambas fueron guardadas en un baño maría a 37°C.

#### **3.10.2.4.1. Preparación de la solución hipoosmótica**

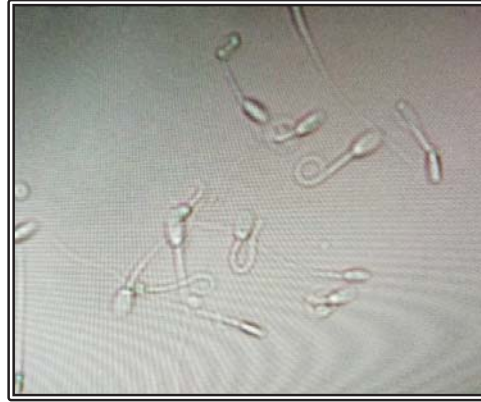
- a. En una balanza analítica se pesó:
  - 0.0245 miligramos de citrato de sodio por mililitro de solución.
  - 0.045 miligramos de fructuosa por mililitro de solución.
- b. Luego se procedió a pesar de 0,0245 de citrato de sodio y 0,045 de fructuosa de solución hipoosmótica la cual está ajustado en 50 mosm/Kg con estos resultados calculados se preparó 10 ml de solución hipoosmótica.
- c. En un tubo falcón de 15 ml se tomó 10 ml de agua bidestilada, posteriormente se agregó citrato de sodio y fructuosa.
- d. Para la solución hipoosmótica más formaldehido se colocó 1ml de solución hipoosmótica preparada más 3µl de formaldehido en tubo vial.

#### **3.10.2.4.2. Protocolo para la prueba de hipoosmótica**

- Primero se rotula cada tubo de eppendorf con el código de cada animal.
- En cada tubo de eppendorf se colocó 100 µl de solución hipoosmótica y esta es calentada en baño maría a 37°C.
- Posteriormente se agregó 25 µl de muestra de semen y se incubó por 5 minutos en baño maría a 37°C.
- Cuando concluye el tiempo de incubación se pone 31µl de solución formulada para detener la reacción al estrés hipoosmótica.
- Finalmente se procedió al conteo de 100 células espermáticas en Motic plus a un aumento de 40 X en donde se evaluó a los espermatozoides con reacción a nivel de la cola.



**Foto 30:** Solución Hipoosmótica y formaldehído



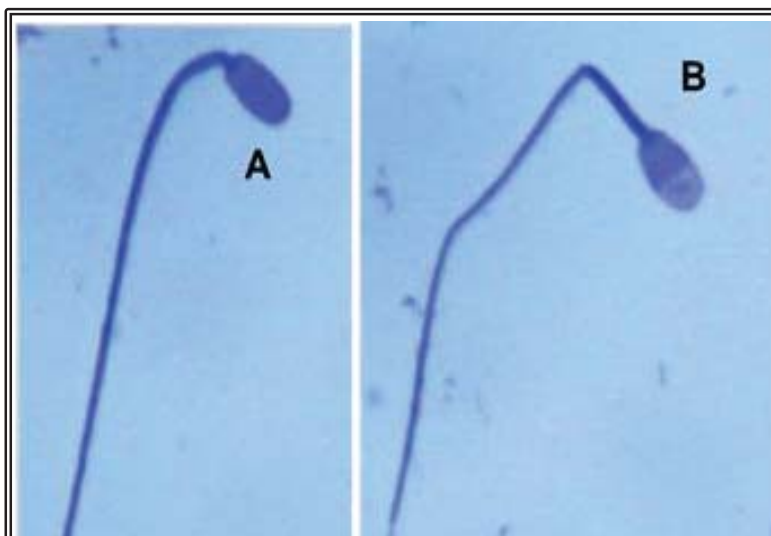
**Foto 31:** Espermatozoides expuestas a una reacción al estrés hipoosmótica

### 3.10.2.5. Integridad Acrosomal en el espermatozoide.

Para la integridad acrosomal se utilizó la tinción de Comasie blue, se utilizó los siguientes colorantes y reactivos según protocolo de Fumuso *et al.*, (2014).

- 25 ml de metanol
- 5 ml ácido acético
- 20 ml de agua destilada.
- 0.11g Coomasie Blue G 250

Se realizaron frotis los cuales se secaron al aire. Seguidamente se fijaron en para formaldehído al 4% durante 15 minutos, se lavaron con PBS y se colorearon con tinción de Coomassie Blue (0,22%) durante 5 minutos. Posteriormente se lavó con agua destilada y una vez secos, se contaron 100 espermatozoides. Los espermatozoides se clasificaron en dos categorías: El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto y con acrosoma dañado.



**Foto 32:** Integridad de la membrana espermática con presencia de capuchón acrosomal(a) y con ausencia de capuchón

### 3.11. ANALISIS ESTADISTICO

#### 3.11.1. DISEÑO ESTADISTICO

Se realizó la estadística descriptiva de las variables macroscópicas (volumen, pH, color y filancia).

Para los siguientes parámetros de motilidad (VCL, VSL, VAP, LIN STR, ALH y BCF), concentración, vitalidad, integridad acrosomal y funcionalidad de la membrana espermática se aplicó estadística descriptiva con el procedimiento UNIVARIATE del SAS v 9.4, donde se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variabilidad. Realizando el test de Shapiro-Wilk presentaron con normalidad por lo cual se utilizó un análisis de varianza (ANVA) con un diseño de Bloques Completamente al Azar (BCA), la comparación de medias se realizó con la prueba de Duncan.

se realizó empleando un arreglo factorial, cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + I\lambda m_j + e_{ijk}$$

**Dónde:**

- $Y_{ijk} =$  Variable respuesta
- $\mu =$  Media
- $C_i =$  Efecto de las colectas de semen
- $Llam_j =$  Efecto de las llamas
- $e_{ijk} =$  Error experimental.

La motilidad general (móviles progresivos y móviles no progresivos) se evaluó en un arreglo factorial en bloques al azar, con el siguiente modelo aditivo lineal:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + M_j + Llam_k + (CxM)_{ij} + e_{ijkl}$$

**Dónde:**

- $Y_{ijkl} =$  Variable respuesta
- $\mu =$  Media
- $C_i =$  Efecto de la colecta de semen
- $M_j =$  Efecto de la motilidad
- $Llam_k =$  Efecto de la Llama
- $(CxM)_{ij} =$  Efecto de la interacción de la colecta y motilidad
- $e_{ijkl} =$  Error experimental

**3.12. Identificación de subpoblaciones:**

Se utilizó 8 llamas macho de la raza ch'aku y k'ara de los cuales 4 se utilizó para el método de vagina artificial y 4 para el método de Electroeyaculación. Se realizó 4 colectas por cada método para determinar la presencia de subpoblaciones espermáticas en muestras seminales y el porcentaje de espermatozoides en cada

subpoblación. Se procedió a realizar un estudio detallado de algunos parámetros, que se obtuvieron mediante el sistema CASA.

Los parámetros de motilidad utilizados para la identificación de subpoblaciones espermáticas son las siguientes: VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH y BCF.

### **3.12.1. Para determinar el número de subpoblaciones**

#### **3.12.1. Determinación de variables.**

El procedimiento PRINCOMP fue primero aplicado para examinar PCA (análisis de principales componentes) de los datos de motilidad. El propósito de PCA es para derivar un pequeño número de combinaciones lineales de un set de variables que retienen mucha información en las variables originales tan posibles. Para determinar el número de componentes principales para ser usado en el subsiguiente paso de análisis, el criterio de seleccionar con un autovalor (La discordia extractada para ese componente principal particular) más alto que uno (el criterio del Káiser) fue seguido.

#### **3.12.2. Determinación de subpoblaciones**

Se utilizó un análisis no jerárquico de grupos usando el procedimiento FASTCLUS y los componentes principales seleccionados como las variables fueron entonces aplicadas. Este procedimiento funciona en análisis en racimo disjunto con base a las distancias euclidianas (la que quiere decir modelo) computadas de uno o más variables cuantitativas (los parámetros de motilidad de esperma) que le permite el estudio de conjuntos de datos grandes de las observaciones. Las características de motilidad de esperma fueron divididas en grupos algo semejante que cada observación pertenece para lo único e incomparable el grupo. Los espermatozoides que estaban muy cerca el uno para el otro fue asignados al mismo grupo, mientras los espermatozoides que difirió en las características fueron incluidos en grupos diferentes.

## CAPITULO IV

### 4.1. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE SEMEN COLECTADAS POR EL METODO DE ELECTROEYACULACION Y VAGINA ARTIFICIAL.

##### 4.1.1.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.

###### 4.1.1.1.1. Volumen

El promedio volumen de llamas colectadas por el método de Electro eyacuación y Vagina artificial se muestra en el siguiente cuadro, se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre métodos de colecta.

**Tabla 20.** Volumen seminal de las llamas colectadas por Electroeyacuación y Vagina Artificial

Método	N	Media(ml)	± D.S(ml)	C.V (%)	Max(ml)	Min(ml)
Electroeyacuacion	16	3.63 b	1.64	45.18	7	1
Vagina Artificial	16	7.99 a	1.95	24.45	12	5

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La media del volumen seminal de llamas colectados por el método de Electroeyacuacion es superior a lo reportado por Laruta *et al.*, (2015) de 1.67%, Valle, (2013) de 0.25%, Rodríguez, (2013) de 1.6% y Carretero *et al.*, (2012) de 2.8%, todos estos estudios se realizaron en llamas colectadas por el método de Electroeyacuacion. Las diferencias estarían sometidos al efecto animal, condiciones medio ambientales y la frecuencia de colecta.

La media del volumen seminal de llamas colectadas por el método de vagina artificial es superior al reportado por Godoy, (2014) de 5.48%, Valle (2013) de 1.56% y Aller



*et al.*, (2003) de 2.2%, las diferencias numéricas se debería al efecto animal, condiciones medio ambientales y frecuencia de colectas.

#### 4.1.1.2. Color

El color fue evaluado de acuerdo al criterio del observante, determinando los colores descritos en porcentajes.

**Tabla 21.** Porcentaje de color espermático de llamas colectados por el método Electroeyaculación y Vagina artificial.

Método de colecta	Color	%	Total
EE	Blanco cristalino	80	100
	Blanco lechoso	20	
VA	Blanco lechoso	90	100
	Blanco claro	10	

Referente a los resultados en el método de Electroeyaculación se tuvo el color predominante fue blanco cristalino, diferente a lo reportado por Rodríguez, (2013), las diferencias se deberían probablemente al criterio de evaluación de cada Autor.

Los resultados de color de semen predominante colectado por método de vagina artificial es blanco lechoso, similar a lo descrito por Valle, (2013) en llamas y diferente a lo descrito por Quispe, (2018) en alpacas, las diferencias se deberían al método de evaluación ya que es una medida subjetiva y la especie.

#### 4.1.1.3. Filancia

El promedio de la filancia de llamas colectadas por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial se muestra en el cuadro 20, donde se observa que no hay diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre métodos de colecta.

**Tabla 22:** Filancia del semen de llamas colectadas por Electroeyacuación y Vagina Artificial.

Método colecta	N	Media (cm)	± D.S (cm)	C.V (%)	Max (cm)	Min (cm)
Electroeyacuacion	16	3.63 a	0.93	25.58	5	2
Vagina artificial	16	3.88 a	1.31	33.81	6	2

Letras iguales muestran diferencias no significativas ( $p>0.05$ ).

No se tiene ningún reporte en llamas, pero si en alpacas mostrando resultados superiores al reporte por Ccalta, (2017) de 2.38 cm, aplicando el método de colección post cópula. La diferencia se debe probablemente a la especie y método de colecta.

#### 4.1.1.4. pH

El promedio PH de llamas colectadas por el método de Electroeyacuación y Vagina artificial se muestra en el siguiente cuadro, no se hallaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre métodos de colecta.

**Tabla 23.** PH del semen de llamas colectadas por el método de Electroeyacuación y Vagina artificial

Método	N	Media	± D. S	C.V (%)	Max	Min
Electroeyacuacion	16	7.25 a	0.48	6.66	8	6.50
Vagina artificial	16	7.22 a	0.52	7.14	8	6.50

Letras iguales muestran diferencias no significativas ( $p>0.05$ ).

La media del PH de semen de llamas colectadas por el método de electroeyacuacion es superior al reporte por Valle, (2013), la diferencia seria al instrumento de medida utilizado.

La media del PH de semen de llamas colectadas por el método de vagina artificial son similares a los reportes por Godoy, (2014) de  $7.97\pm 0.3$ , Valle, (2013) de 7.41 y Giuliano *et al.*, (2012) de  $6.4\pm 8$  por el método de colección de semen por vagina

artificial en llamas, la diferencia numérica se debe al instrumento de medida puesto que los autores no indican el procedimiento ni el instrumento utilizado.

#### 4.1.2. EVALUACIÓN MICROSCÓPICAS DEL SEMEN.

##### 4.1.2.1. Motilidad

##### 4.1.2.1.1. Motilidad total

Se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (cuadro 24).

**Tabla 24.** Motilidad total de los espermatozoides de llamas colectadas por Electroeyacuación en fresco y Degelificados con papaína (20min).

Estado	N	Media (%)	± D.S(%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	44.68 b	18.93	42.36	82.30	13.30
Degelificado	16	63.36 a	15.53	24.52	92.90	29.80

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La media de la motilidad total de semen fresco en llamas colectadas por Electroeyacuación son superiores a los reportes de Carretero *et al.*, (2012) de  $28.2 \pm 19.3$  %, Casaretto *et al.*, (2011) de  $38.53 \pm 28.5$  % y Carretero *et al.*, (2009) de  $35.0 \pm 17.6$  %, todos en Argentina a nivel del mar. Todos estos estudios se realizaron en semen de llamas colectadas por Electroeyacuación, en general todos los estudios reportan bajos porcentajes de motilidad espermática, que se debe al carácter filante y viscoso del semen el cual dificulta la cinética espermática, las diferencias estarían dadas a los animales utilizados, medio ambiente, y método de evaluación.

La media de la motilidad total de semen degelificado con papaína en llamas colectadas por Electroeyacuación es superior a los reportes por Laruta *et al.*, (2015) de  $22.8 \pm 5.6$ % en semen diluido con extracto de piña, Carretero *et al.*, (2014) de  $22.7 \pm 10.5$ %, diluido con colagenasa, Giuliano *et al.*, (2010) de  $45.4 \pm 20.81$  diluido con

H-TALP-BSA con colagenasa. Las diferencias se deberían a los degelificantes usados y el método de evaluación.

Se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (cuadro 25).

**Tabla 25.** Motilidad total del espermatozoide de las llamas colectadas por Vagina Artificial.

Estado	N	Media (%)	± D.S(%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	41.58 b	18.4	44.25	83.90	16
Degelificado	16	51.88 a	14.65	28.24	78.60	29.6

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

La media de la motilidad total de semen fresco en llamas colectadas por vagina artificial es superior al reportado por Godoy, (2014) de  $11 \pm 1,8\%$ , Von Baer y Helleman (1998) de  $25.5 \pm 18.7\%$  e inferiores a lo reportado por Aller *et al.*, (2003) de  $68.5 \pm 15.03$  los siguientes estudios se realizaron por el método de vagina artificial en llamas. Las diferencias se deberían a los animales utilizados, medio ambiente, y método de evaluación.

La media de la motilidad total de semen degelificado con papaína en llamas colectadas por vagina artificial es inferior al reportado por Delgado y Quispe, (2015) de  $64 \pm 10\%$ , en llamas colectados por Vagina artificial, las diferencias se deberían a los degelificantes usados y método de evaluación.

#### 4.1.2.1.2. Motilidad no progresiva (MNP)

Se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (Cuadro 26).

**Tabla 26.** Motilidad no progresiva de espermatozoides de las llamas colectados por Electroeyaculación.

Estado	N	Media (%)	± D.S(%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	43.15 b	18.31	42.45	79.10	12.90
Degelificado	16	58.95 a	13.56	23	74.70	29.30

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La media de la motilidad no progresiva en semen fresco de llamas es superior a los reportados por Rodríguez, (2013) de  $12.7 \pm 2.0\%$ , Giuliano *et al.*, (2010) de  $4.4 \pm 10.43\%$  e inferiores al reportado por Valle, (2013) de  $54.66\%$  todos estudios realizados en llamas por el método de Electroeyaculación, las diferencias podrían deber al método de evaluación, Frecuencia de colecta y las condiciones medio ambientales.

La media de la motilidad no progresiva de semen en llamas degelificados con papaína colectadas por Electroeyaculación son superiores al reportado por Giuliano *et al.*, (2010) de  $10.32 \pm 18.78\%$  en semen diluido con H-TALP-BSA y  $45.4 \pm 20.8\%$  en semen diluido en una solución de  $0.1\%$  de colagenasa en H-TALP-BSA, ambos estudios en llamas por el método de Electroeyaculación, las diferencias numéricas se deberían a degelificante utilizado.

Se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (cuadro 27).

**Tabla 27.** Motilidad no progresiva del espermatozoide de las llamas colectada por Vagina artificial.

Estado	N	Media (%)	± D.S(%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	39.90 b	17.61	44.15	80.30	15.30
Papaína	16	48.63 a	13.50	27.76	71.10	28.30

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

La media de la motilidad no progresiva de semen fresco colectadas por el método de Vagina artificial es superior al reportado por Valle, (2013) de  $53.25\%$  en

llamas por Vagina artificial. Las diferencias de deberían a las condiciones Medio ambientales, método de evaluación y la época de la colecta

#### 4.1.2.1.3. Motilidad Progresiva (MP).

Se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (cuadro 28).

**Tabla 28.** Motilidad Progresiva del espermatozoide de las llamas colectadas por Electroeyaculación.

Estado	N	Media (%)	± D.S(%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	1.53 b	0.83	54.26	3.20	0.40
Degelificado	16	4.41 a	5.18	117.45	18.20	0.40

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

La media de la motilidad progresiva de semen fresco en llamas colectadas por Electroeyaculación es similar al reportado por Rodríguez, (2013) de  $1.2 \pm 2.0\%$  en llamas y Huanca, (2015) de  $1.43 \pm 1.30\%$  en alpacas por el método de Electroeyaculacion y utilizaron el sistema de análisis computarizado ISAS.

La media de la motilidad progresiva de semen degelificado con papaína de llamas colectadas por electroeyaculacion es superior al reportado por Fumuso *et al.*, (2015) de  $3.84 \pm 5.49\%$  estos estudios se realizaron en semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion utilizando la diluyente colagenasa al 0,1% en medio HEPES-TALP (HT) durante 4 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , las diferencias se deberían a degelificante usado y el método de evaluación.

Se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (cuadro 29).

**Tabla 29.** Motilidad progresiva del espermatozoide de las llamas colectado por Vagina artificial.

Estado	N	Media (%)	± D.S(%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	1.67 b	1.02	61.06	3.80	0.20
Degelificado	16	3.25 a	1.54	47.33	7.40	1.20

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La media de la motilidad progresiva de semen fresco de llamas colectadas por Vagina artificial es inferior al reportado por Garcés, (2017) de  $4,63 \pm 0,05$  % en alpacas por el método de vagina artificial y superiores por Huanca, (2015) de  $1.58 \pm 1.00$ % en alpacas por el método de post copula en alpacas. Las diferencias se deberían a la especie y el método de colecta.

#### 4.1.2.2. Concentración espermática

El promedio de la filancia de llamas colectadas por el método de Electro eyaculación y Vagina artificial se muestra en el cuadro (30), se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre métodos de colecta.

**Tabla 30.** Concentración espermática (millones/ml) en fresco de llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial.

Método	N	Media millones/ml)	± D.S (%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Electroeyaculación	16	101.71 b	39.52	38.86	186.50	49.51
Vagina artificial	16	146.20 a	64.83	44.35	262.50	48.87

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La media de la concentración espermática por el método de Electroeyaculacion es superior al reporte por Laruta *et al.*, (2015) de  $39.14 \pm 11.22 \times 10^6$ /ml, Rodríguez., (2013) de  $84.39 \pm 71.93 \times 10^6$ /ml y Carretero, *et al.*, (2012) de  $77.0 \pm 83.6$ , Todos estos estudios fueron realizados en llamas por el método por Electroeyaculacion las diferencias serian el método de evaluación, medio ambiente y la frecuencia de colección.

La media de la concentración espermática en semen de llamas colectadas por vagina artificial es superior al reportado por Godoy, (2014) de  $33.3 \times 10^6 \pm 9.3 \times 10^6/\text{ml}$ , Giuliano *et al.*, (2008) de  $82.24 \pm 61.28 \times 10^6/\text{ml}$  y Aller *et al.*, (2003) de  $75.2 \pm 20.4 \times 10^6/\text{ml}$ , ambos trabajos se realizaron en llamas utilizando el método de colección por vagina artificial, las diferencias numéricas se deberían al método de evaluación, medio ambiente y el factor animal.

#### 4.1.2.3. Vitalidad Espermática.

No se ha encontrado diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (cuadro 31).

**Tabla 31.** Vitalidad espermática (%) de llama colectada por el método de Electroeyaculación.

Etapa	N	Media (%)	D.S %)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	64.56 a	13.54	20.97	81.00	33.00
Papaína	16	61.32 a	12.85	20.96	75.8	33.2

Letras iguales muestran diferencias no significativas ( $p > 0.05$ )

Los valores obtenidos de semen fresco por el método Electroeyaculación son inferiores al reportado por Laruta *et al.*, (2016) de  $86.67 \pm 5.77\%$  y Giuliano *et al.*, (2010) de  $60.22 \pm 12.58\%$  en llamas. Las diferencias estarían dadas por el tipo de la tinción que usaron los autores para evaluar la vitalidad espermática, ya que hay una amplia gama de tonalidades que adoptan las células vivas o muertas que se observa en los frotices e inclusive estas varían con la calibración del microscopio, método de evaluación subjetiva.

Los valores obtenidos de semen degelificados con papaína por el método EE son superiores al reportado por Giuliano *et al.*, (2010) de  $57.13 \pm 13.51\%$  en semen diluido con H-TALP-BSA y  $63.41 \pm 14.64\%$  en semen diluido en una solución de 0.1% de colagenasa en H-TALP-BSA ambos estudios evaluados en llamas por el método de



Electroeyaculación. Las diferencias estarían dadas al método de evaluación y factor animal.

se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen fresco sobre el semen incubado 20 minutos con papaína (cuadro 32).

**Tabla 32.** Vitalidad espermática (%) de llama colectadas por vagina artificial

Etapa	N	Media (%)	± D.S (%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	70.23 a	13.57	19.33	92.40	49.00
Papaína	16	64.38 b	10.70	16.62	91.20	47.30

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los valores obtenidos de semen en fresco por el método de Vagina artificial, son superiores a los reportados por Godoy, (2014) de  $49.55 \pm 2.8\%$ , Aller *et al.*, (2003) de  $68.5 \pm 12.3\%$  en llamas y Alarcón *et al.*, (2012) de  $70.8 \pm 12.7\%$ , Quispe, (2018) de  $60.78 \pm 11.19\%$  en alpacas colectadas por el método de vagina artificial. Las diferencias estarían dadas a la especie y el tipo de tinción.

#### 4.1.2.4. Funcionalidad de la membrana espermática (HOST)

se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen fresco sobre el semen incubado 20 minutos con papaína (cuadro 33).

**Tabla 33.** Funcionalidad de la membrana espermática (HOST) de llama colectadas por Electroeyaculación.

Etapa	N	Media (%)	± D.S (%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	57.33 a	8.91	15.55	71.3	45.30
Papaína	16	53.10 b	8.14	15.32	68.30	38.90

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los valores obtenidos de semen fresco por el método de Electroeyaculación son superiores al reporte por Rodríguez, (2013) de  $38.2 \pm 1.93\%$ , Giuliano *et al.*, (2010) de

42.35±15.03%, Giuliano *et al.*,(2008), de 35.58.46±13.93%, Carretero *et al.*, (2014) de 30.4±12.8, todo estos estudios se evaluaron en llamas por el método de Electroeyaculación, las diferencias estarían dadas al método de evaluación y al factor animal.

En cuanto al semen degelificado con papaína es mayor al reportado por Giuliano *et al.*, (2010) de 38.27±16.04% en semen diluido con H-TALP-BSA y 50.51±14.73% diluido en una solución de 0.1%de colagenasa en H-TALP-BSA ambos estudios evaluados en llamas por el método de Electroeyaculación. Las diferencias numéricas se deberían al degelificante usado y el método de evaluación.

se ha encontrado diferencias significativas ( $p<0.05$ ) del semen fresco sobre el semen incubado 20 minutos con papaína (cuadro 34).

**Tabla 34.** Funcionalidad de la membrana plasmática (HOST) de llamas colectadas por Vagina Artificial.

<b>Etapa</b>	<b>N</b>	<b>Promedio (%)</b>	<b>± D.S (%)</b>	<b>C.V (%)</b>	<b>Max (%)</b>	<b>Min (%)</b>
Fresco	16	54.30 a	9.29	71.60	42.40	17.10
Papaína	16	48.10 b	10.0	20.90	73.20	35.40

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p<0.05$ )

Los valores obtenidos de semen en fresco por el método de Vagina artificial, son superiores al reportado por Giuliano *et al.*, (2008) de 29.46 ±15.34%, (Giuliano *et al.*,2003) de 35.58±13,93 en llamas estos estudios se realizaron en un medio hipoosmótico de 50 mOsm con soluciones de citrato de sodio-fructuosa, las diferencias estarían dadas al método de evaluación, condiciones medio ambientales y al factor animal.

#### **4.1.2.5. Integridad Acrosomal**

No se ha encontrado diferencias significativas ( $p>0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (cuadro 35).

**Tabla 35.** Integridad Acrosomal de los espermatozoides de llama colectadas por Electroeyaculación.

Etapa	N	Promedio (%)	± D.S (%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	59.33 a	7.16	12.06	72.30	49.00
Papaína	16	59.18 a	6.90	11.67	71.60	48.00

Letras iguales muestran diferencias no significativas ( $p>0.05$ ).

Los valores obtenidos de semen en fresco por el método de electroeyaculación son inferiores al reportado por Fumuso *et al.*, (2014) de  $81.52\pm 10.95\%$  y Carretero *et al.*, (2014) de  $48,8\pm 10,8\%$  en llamas, las diferencias estarían dada al método de evaluación y al factor animal.

Los valores obtenidos de semen degelificado con papaína por el método de Electroeyaculación, son superiores al reportado por carretero *et al.*, (2015) de  $55.4\pm 13.1\%$ , (2015) de  $64.6\pm 13.6$  utilizando como degelificante la colagenasa al 0,1% en medio HEPES-TALP (HT) en llamas las diferencias se deberían al tipo de degelificante y las tinciones usadas.

No se ha encontrado diferencias significativas ( $p>0.05$ ) del semen fresco sobre el semen incubado 20 minutos con papaína (cuadro 36).

**Tabla 36.** Integridad Acrosomal de los espermatozoides de llama colectadas por Vagina Artificial

Etapa	N	Media (%)	± D.S (%)	C.V (%)	Max (%)	Min (%)
Fresco	16	67.35 a	11.00	16.34	87.90	45.80
Papaína	16	66.50 a	8.53	12.83	79.90	49.80

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

Los valores obtenidos de semen fresco son inferiores al reportado por Quispe, (2018) de  $76.43\pm 16.23\%$  método de colección vagina artificial en alpacas y Ccalta, (2018) de  $68.15\pm 4.81\%$  por el método de Póst cópula y

76.92±2.41%, por el método de Desviación del conducto deferente. Las diferencias estarían dadas a la especie y el método de colecta.

#### 4.2. PARÁMETROS DE MOTILIDAD

Se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (cuadro 37).

**Tabla 37.** Parámetros de motilidad espermática de llama colectadas por Electroeyaculación en fresco y degelificados con papaína.

VARIABLE	N°	Fresco	Papaína
		Media ± D. S	Media ± D. S
VCL (µm/s)	16	60.82 ± 11.47 b	80.18 ± 20.79 a
VSL (µm/s)	16	13.1 ± 2.12 b	18.9 ± 5.72 a
VAP (µm/s)	16	28.75 ± 3.88 b	36 ± 8.03 a
LIN (%)	16	22.12 ± 4.75 b	23.97 ± 5.08 a
STR (%)	16	45.63 ± 4.57 b	52.24 ± 7.72 a
WOB (%)	16	48.01 ± 5.78 b	45.79 ± 6.09 a
ALH (µm)	16	3.18 ± 0.71 b	3.31 ± 1.13 a
BCF (Hz)	16	3.68 ± 1.2 b	5.61 ± 1.83 a

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los resultados obtenidos en el presente estudio en semen fresco son superiores al reportado por Rodríguez, (2013) en llamas por el método de Electroeyaculación, reporto valores promedio de VCL de  $36.9 \pm 8.8$  µm/s; VSL de  $8.0 \pm 2.3$  µm/s; VAP de  $18.5 \pm 3.3$  µm/s; LIN de  $22.2 \pm 5.5$  %; STR de  $43.0 \pm 8.2$  %; WOB de  $51.6 \pm 9.7$  %; ALH de  $1.0 \pm 0.8$  µm; BCF de  $1.8 \pm 1.8$  Hz, las diferencias estarían dadas a la época de colecta y los animales usados, ya que el estudio se realizó en el mismo centro experimental, utilizando el sistema ISAS-CASA.

Los resultados obtenidos en el presente estudio en semen degelificado con papaina (20 minutos) son superiores al reportado por Cucho *et al.*, (2018) VCL de

52.32± 9.05 µm/s; VSL de 12.16 ± 2.83 µm/s; VAP de 26.02 ± 4.21 µm/s; LIN de 23.37 ± 4.00 %; STR de 46.49 ± 5.39 %; WOB de 50.11 ± 5.53 %; ALH de 1.67 ± 0.94 µm; BCF de 3.66 ± 2.69 Hz en llamas por el método de Electroeyaculación en semen incubado con papaína (20 minutos). Las diferencias estarían dadas por el tiempo de incubación.

Se ha encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) del semen incubado 20 minutos con papaína sobre el semen fresco (cuadro 38).

**Tabla 38.** Parámetros de motilidad espermática de llama colectadas por vagina artificial en semen fresco y degelificados con papaína.

VARIABLE	N°	FRESCO Media± D. S	PAPAINA Media± D.s
VCL (µm/s)	16	56.06±13.87 b	66.93±13.06 a
VSL (µm/s)	16	14.07±2.77 b	19.44±4.49 a
VAP (µm/s)	16	28.57±5.87 b	34.96±8.07 a
LIN (%)	16	25.52±2.69 b	28.95±2.94 a
STR (%)	16	49.0±3.00 b	56 ±3.40 a
WOB (%)	16	51.6±3.81 b	51.95±4.42 a
ALH (µm)	16	3.22±0.41 b	3.466±0.56 a

Letras diferentes muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Los valores obtenidos en semen degelificados con papaína por el método de Vagina artificial son mayores al reportado por Quispe, (2018) de VCL de 34.62±8.14 µm/s; VSL de 9.56±1.55µm/s; VAP de 18.8±3.81 µm/s; LIN de 28.18±3.30 %; STR de 51.50±4.59%; WOB de 54.76±5.233 %; ALH de 1.57± 0.48 µm; BCF de 1.36±0.49Hz) evaluado por el método de post copula en alpacas y degelificado con papaína en TALP por 20 minutos. Las diferencias se deberían al degelificante usado, por el método de colecta y la especie

## 4.26. SUBPOBLACIONES ESPERMATICAS EN SEMEN DE LLAMAS.

### 4.26.1. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS DE LOS COMPONENTES PRINCIPALES (PCA).

#### A. Evaluación en semen fresco.

Para seleccionar a los componentes principales en semen fresco colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial, se ha utilizado la información de 30890 espermatozoides, y se ha seguido el criterio de elegir aquellos con un autovalor (varianza extraída de los componentes principales) mayor a 0,9, estos se muestran en el siguiente cuadro.

**Tabla 39:** Análisis y los componentes principales y sus autovalores en semen fresco colectado por Electroeyaculación y Vagina Artificial.

N°	Variable	Autovalor	%	Acumulada
1	VCL	3.04	38.05	50.73
2	VSL	1.63	20.33	77.85
3	VAP	0.91	11.39	93.03
4	STR	0.32	3.98	98.34
5	ALH	0.05	0.64	99.19
6	BCF	0.05	0.61	1.00

Los resultados obtenidos por análisis de los principales componentes (PCA) con 5 variables en semen fresco por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial con 99% son similares al reportado por Meza, (2014) de 98% evaluadas en alpacas en semen fresco colectadas por el método de Desviación del conducto deferente.

#### B. Evaluación en semen degelificado con papaína (20 minutos).

Para seleccionar a los componentes principales en semen degelificado con papaína (20 minutos), colectadas por Electroeyaculación y Vagina, se ha utilizado la información de 33104 espermatozoides, y se ha seguido el criterio de elegir aquellos

con un autovalor (varianza extraída de los componentes principales) mayor a 0,9, estos se muestran en los siguientes cuadros.

**Tabla 40:** Análisis de los componentes principales y sus autovalores de semen de llamas degelificados con papaína colectadas por Electroeyaculacion y Vagina Artificial.

N°	Variable	Autovalor	%	Acumulada
1	VCL	1.77	22.14	54.21
2	VSL	1.48	18.52	78.91
3	VAP	0.86	10.80	93.31
4	STR	0.33	4.07	98.73
5	ALH	0.04	0.53	99.45
6	BCF	0.03	0.41	1.00

Los resultados obtenidos por análisis de los principales componentes (PCA) con 5 variables en semen degelificado con papaína por el método de Electroeyaculacion y Vagina artificial con 99% son superiores al reportado por Ampuero *et al.*, (2018) de 88% con 3 variables, evaluadas en llamas en semen degelificado con papaína colectadas por el método de Electroeyaculacion. Las diferencias estarían dadas por el tiempo de incubación con la papaína.

#### 4.26.1. IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS.

Tras el análisis de grupos y variables realizado sobre 30890 espermatozoides en semen fresco y 33103 en semen degelificados con papaína se identificaron 4 subpoblaciones espermáticas con distintos tipos de movimiento.

##### A. Identificación de subpoblaciones en semen fresco.

La VCL, VSL, VAP ALH y BCF, explican el 99% de la varianza de los componentes principales, por ende, son los que se consideraron para el cálculo de SPE. Se ha identificado la existencia de 4 subpoblaciones espermáticas en semen de llama fresco,

colectadas por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial, que se muestran en el siguiente cuadro.

**Tabla 41:** Valores (Promedio  $\pm$  desviación estándar) de los parámetros de motilidad en semen fresco de llamas, de acuerdo con su asignación a sus subpoblaciones, colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial.

Variable	SPE1	SPE2	SPE3	SPE4
N	4175	919	14914	10884
%	13.51%	2.97%	48.28%	35.23%
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	104.77 $\pm$ 13.47	152.80 $\pm$ 22.48	36.66 $\pm$ 10.76	68.27 $\pm$ 10.49
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	20.94 $\pm$ 12.82	31.95 $\pm$ 19.05	10.51 $\pm$ 6.04	15.20 $\pm$ 9.51
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	47.14 $\pm$ 12.08	65.70 $\pm$ 18.30	19.85 $\pm$ 6.43	33.25 $\pm$ 9.05
ALH ( $\mu\text{m}$ )	5.38 $\pm$ 0.95	7.20 $\pm$ 1.28	2.26 $\pm$ 0.59	3.73 $\pm$ 0.72
BCF (Hz)	4.89 $\pm$ 2.43	4.92 $\pm$ 2.60	3.48 $\pm$ 2.12	4.67 $\pm$ 2.28

No existen reportes acerca de este tema en semen fresco de llamas, pero si realizaron estudios en alpacas colectados por Desviación del conducto deferente utilizando semen fresco Meza, (2014) halló 3 SPE, este sería el trabajo más próximo al realizado y otros como: Quintero Moreno *et al.*, (2003). En perro, equino, porcino y conejo, reportando 4, 4, 3 y 4 subpoblaciones respectivamente; Abaigar *et al.*, (2001). En gacela reportando 4 subpoblaciones; Miro *et al.*, (2004). en burros reporta 4 subpoblaciones. Mientras que en semen congelado holt, (1996). En mono titi reporta 3 subpoblaciones y Abaigar *et al.*, (1999). Reporta 3 subpoblaciones; y en semen refrigerado Thurston *et al.*, (2001) y Rivera *et al.*, (2000), En cerdos reportan 3 y 4 subpoblaciones.

**SPE1**, incluye a los espermatozoides con valores intermedios de VCL, VSL y VAP, bajos en ALH y BCF, trayectorias más lineales que los de la SPE4, esta población incluye al 13.51% de los espermatozoides móviles, esta SPE es calificada como rápidos.



**SPE2**, constituida por los espermatozoides con valores más altos de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF, con trayectorias mayores que los de SPE1, esta población agrupa al 2.97% de espermatozoides motiles, que poseen trayectorias circulares, esta SPE es calificada como muy rápidos.

**SPE3**, muestra espermatozoides con valores bajos de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF, ésta incluye al 48.28% de los espermatozoides móviles. esta SPE es calificada como lentos.

**SPE4**, presenta los valores de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF con trayectorias similares a SPE3, agrupa al 35.23% de espermatozoides móviles. esta SPE es calificada como intermedios.

**B. Identificación de subpoblaciones en semen incubado con papaína (20 minutos).**

La VCL, VSL, VAP ALH y BCF, explican el 99% de la varianza de los componentes principales, por ende, son los que se consideraron para el cálculo de SPE. Se ha identificado la existencia de 4 subpoblaciones espermáticas en semen de llama degelificados con papaína (20 minutos), colectadas por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial, que se muestran en el siguiente cuadro.

**Tabla 42:** Valores (promedio ±desviación estándar) de los parámetros de motilidad de los espermatozoides de llama degelificados con papaína (20 minutos) de acuerdo con su asignación a sus subpoblaciones colectadas por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial.

<b>Variable</b>	<b>SPE1</b>	<b>SPE2</b>	<b>SPE3</b>	<b>SPE4</b>
N	12346	2507	10575	6499
%	37.29%	7.57%	31.94%	19.63%
VCL (µm/s)	38.24± 11.46	150.85±18.53	71.52±10.85	107.41±12.46
VSL (µm/s)	10.87±5.84	35.51±16.42	19.62±9.70	26.58±12.52
VAP (µm/s)	20.11±6.54	63.03±15.03	37.05±9.11	50.94±11.34
ALH (µm)	2.21±0.63	6.99±1.10	3.64±0.74	5.22±0.91
BCF (Hz)	4.34±2.46	6.01±2.62	5.72±2.67	5.85±2.49

**SPE1**, incluye a los espermatozoides con valores bajos de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF, esta población incluye al 37.29% de los espermatozoides móviles, esta SPE es calificada como lentos.

**SPE2**, constituida por los espermatozoides con valores más altos de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF, con trayectorias mayores que los de SPE1, esta población agrupa al 7.57% de espermatozoides motiles, que poseen trayectorias circulares, esta SPE es calificada como muy rápidos.

**SPE3**, muestra espermatozoides de VCL, VSL, VAP, ALH y BCF con valores más altos que SPE1, esta incluye al 31.94% de los espermatozoides móviles, esta SPE es calificada como intermedios.

**SPE4**, presenta valores intermedios de VCL, VSL, VAP y similares a SPE3 en ALH y BCF, agrupa al 19.63% de espermatozoides móviles, esta SPE es calificada como rápidos.

Los resultados obtenidos en semen degelificados con papaína (20 minutos) colectadas por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial en llamas son similares al reportado por Ampuero *et al.*, (2018), halló 4 SPE en llamas colectados por Electroeyaculación e incubados (60 minutos). Algunas diferencias numéricas estarían dadas por el tiempo de incubación con la papaína.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

En sustento a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se concluye lo siguiente:

1. Se halló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para el volumen, concentración siendo el método de colección por vagina artificial mayor al método por Electroeyaculación. Se halló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para la motilidad total, motilidad progresiva, motilidad no progresiva, parámetros de motilidad, funcionalidad de la membrana plasmática en semen incubado con papaína a 20 minutos sobre el semen fresco por el método de vagina artificial y Electroeyaculación, en vitalidad solo se halló diferencias por el método de vagina artificial entre tratamientos. No se halló diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para el pH y filancia entre métodos de colecta y para la integridad acrosomal entre tratamientos.
2. Se halló diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en los parámetros de motilidad siendo mejor en semen incubado con papaína (20 minutos) sobre el semen fresco por el método de vagina artificial y Electroeyaculación.
3. Se identificó las SPE en semen fresco y degelificado con papaína (20 minutos) de llama, hallándose que el VCL, VSL, VAP, ALH Y BCF explican el 99% de varianza de los componentes principales, e identificándose 4 SPE en función a los parámetros de motilidad de los espermatozoides de llama en fresco y degelificados.

**RECOMENDACIONES:**

1. Se recomienda usar como degelificante la papaína para mejorar los parámetros de motilidad.
2. Se recomienda el uso de método de vagina artificial ya que se obtuvo mejores resultados en las características microscópicas.
3. Se recomienda realizar trabajos complementarios a este estudio, donde se determine todas las características microscópicas en el semen fresco y crio preservado de llamas.
4. Se recomienda utilizar el semen colectado por el método de Electroeyaculación y Vagina artificial para trabajos de fecundación in vitro.

## CAPITULO VI

- Alarcón , V., García, W., & Walter, B. (2012). Inseminacion articial de alpacas con semen colectado por aspiracion vagina y vagina artificial. *Rev Inv Vet Perú* 2012; 23(1): 58-64.
- Abaigar, T., Cano, M., Pickard, R., & Holt W., V. (2001). Use of computer-assisted sperm motility assessment and multivariate pattern analysis to characterize ejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhor*): effects of bodyweight, electroejaculate quality in Mohor gazelles (*Gazella dama mhor*). *Reproduction.*, 122,265-273.
- Abaigar, T., Holt, W., Harrison, R., & Del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulation in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhor*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. . *Biol. Reprod.* , 60,32–41.
- Aller , J., Rebuffi , G., Cancino, A., & Alberio, R. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama ( lama glama ). *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - EEA Balcarce. C.C. 276 (7620B. Argentina.*
- Ampuero, L. E., Ccalta, R., Ordoñez, C. D., Ccalta, A. L., Ccoiso, R., & Cucho, H. C. (2018). IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS EN EYACULADOS DE LLAMA (*Lama glama*) INCUBADOS 60 MINUTOS EN PAPAÍNA.
- Baer, L., & Helleman, C. (1998). Variables seminales en llama (*Lama glama*). *Archivos de medicina veterinaria.*
- Banda R., J., Evangelista V. , S., Ruiz G. , L., Sandoval M., R., Rodriguez Ll., C., Valdivia C., M., & Santiani A., 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*, 145-143.

- Bearden , & Fuquay. (1980 .). *Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa*. México.: 2da ed, Ed. El Manual Moderno.
- Bearden J., H., & Fuquay J., W. (1982). *Reproducción Animal aplicada*,. México: R1ra ed, Ed. El Manual Moderno.
- Brack , A., & Mendiola, C. (1980). *Ecología del Perú*.
- Bravo , w. (2002). The reproductive process of South American camelids. *Printed by Seagull Printing, Salt Lake City. USA. Sci. , 62: 173-193.*
- Bravo p., w., Callo, M., & Garnica, J. (2000). The effect of enzymes on semen viscosity en Llamas and Alpacas. *Small Ruminant Research 38: 91-95. Small Ruminant Research 38:; 91-95.*
- Bravo P., W., Moscoso, R., Alarcón, V., & Ordóñez. , C. (2002). Ejaculatory process in update on llama. *Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice WB Saunders*, pp:100-132.
- Bravo P., w., Pacheco, C., Quispe, C., Vilcapaza, L., & Ordoñez, C. (1999). Degelification of alpaca sêmen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Archives of Andrology 43:; 239-246.*
- Bravo, J., Montanero, J., Calero, R., & Roy T., J. (2011). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Ile de France rams. *Animal Reproduction Science.*, 129: 22-29.
- Bravo, P., Flores, D., & Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Biol. Reprod.*, 47: 619 – 626.
- Carretero , M., Giuliano , S., Gambarotta, M., Neild, D., Arraztoa, C., & Lombardo, D. (2012). Evaluation of DNA fragmentation in llama (*Lama glama*) sperm using the sperm chromatin dispersion test. *Anim. Reprod. Sci.*, 131 (1-2): 63-71.
- Carretero M. , I., Neild D., M., Ferrante , A., Caldevilla, M., Arrastoa C., C., Fumuso F., G., & Giuliano S., M. (2014). Effect of cryoprotectant and equilibration temperature on cryopreservation of *Lama glama* spermatozoa. *First International Journal Andrology*.

- Carretero M., I., Fumuso F., G., Neild D., M., Giuliano S., M., Cetica , P., & Miragaya M., H. (2015). Evaluation of the acrosomal status in Lama glama sperm incubated with acrosome reaction inducers. *Animal Reproduction Science*.
- Carretero, M., Giuliano, S., Casaretto , C., Gambarotta, M., & Neild., D. (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *Invet 11(1): 55-63*.
- Casaretto, C., Martínez Sarrasague, M., Giuliano, S., Rubin de Celis, E., Gambarotta, M., Carretero , I., & Miragaya, M. (2011). Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *SPERMOVA (2011) 1(1): 64-65*.
- Casaretto, C., Lombardo, D., Giuliano, s., Gambarotta, M., Carretero , M., & Miragaya, M. (2011). Morphometric Analysis of Llama(lama glama) sperm head. *Cátedra de Teriogenealogia, Facultad de ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires*.
- Ccalta Hanco, R. (2017). *Tesis en Efecto de la adición del colesterol en la criopreservación de semen de alpaca (vicugna pacos)*. Facultad de Ciencias Agrarias -Cusco.
- Cenagro. (2012). IV Censo Nacional Agropecuario.
- Córdova, A. (2008). Bienestar y Reproducción Animal. *Revista electrónica de Veterinaria. Volumen IX, N° 12. ISSN: 1695- 7504*.
- Cucho, H., Ccalta , R., Meza, A., Mamani, R., Ccalta, A., Cabeza, U., & Ampuero, E. (2018). EFECTO DE DOS TIEMPOS DE INCUBACIÓN EN PAPAÍNA EN LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LLAMA (Lama glama).
- Dávalos, R., Olazabal, J., & Echevarría, L. (1999). Avances en la evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Resúmenes II Congreso Mundial sobre Camélidos*, pg.74.
- Davis R. , O., & Siemers, J. (1995). Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion . *Reprod. Fertil Dev.*7, 857-869.
- Delgado, P., & Quispe, Y. (2015). Efecto de Tres Niveles de Glicerol y Tiempos de Equilibramiento Sobre la

ViabilidaddeEspermatozoidesdeLlama(Lamaglama)Post-Descongelado. KYj) BbjYgh]]9'hcUbX]b) -+,06 Oc' ,2 Gy .5 //0//3.

- Director, A., Giuliano, S., & Miragaya, M. (2004). Evaluation of llama (Lama glama) semen obtained by electroejaculation or using an artificial vagina.
- Dorado, J., Molina, I., & Muñoz, A. (2010). . Identification of spermsubpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology*. 74: 795-804. *Theriogenology*. , 74: 795-804.
- Falcón, A. (1972). “*Estudio preliminar sobre las características del semen del macho cabrío*” Falcón, A. 1972. “*Estudio preliminar sobre las características del semen del macho cabrío*”. Lima-Peru: Falcón, A. 1972. “Estudio preliminar sobre las características del semen del macho cabrío” Tesis Ing. Zoot. Universidad Nacional Agraria La Molina-Lima. pp:45-50.
- Fernandez Baca, S., & Novoa, C. (1968). Primer ensayo de inseminacion artificial de alpcas (lama pacos) con semen de vicuña (Vicugna Vicugna). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria,Universidad Nacional Mayor de San Marco,Lima 22:19-35*.
- Fernandez-Baca. (1966). Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev. facultad de Medicina Veterinaria.*, 18-20.
- Fumuso F., G., Carrtero M., I., Neid , D., Gonzales , L., Miragaya, M., & Giuliano, S. (2014). Utilización del Sistema Integrado de Análisis de Semen (ISAS)® para evaluar movilidad en espermatozoides de llama. *Cátedra de Teriogenología, 2Cátedra de Física Biológica, 3Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. 4CONICET, Argentina.* .
- Garces Cabrera, J. E. (2017). “*Evaluación de las características macroscópicas y microscópicas de semen fresco de alpacas en la estación experimental ña moyocancha con la aplicación de oligoelementos*”. Escuela Politecnica de Chimborazo,Riobamba-Ecuador: ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.



- Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M., & Miragaya, M. (2010). Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science*.
- Giuliano S. , M., Ferrari M., R., Sprito S., E., Campi S., H., Director , A., & FERNÁNDEZ, H. (s.f.). Avances en la implementacion del test Hipoosmotico(HOST test) en espermatozoides de llama(lama glama). *Fac.Cs.Vet.UBA,Buenos Aires*.
- Giuliano S., M., Bisiau , C., & Carretero M., I. (2012). Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet* 2012; 14(1): 279.
- Giuliano S., M., Chaves M., G., Trasorras V., L., Gambarotta, M., Neild, D., Director, A., . . . Miragaya M., H. (2012). Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Animal Reproduction Science*., pag.7.
- Giuliano S., M., Spirito S., E., Miragaya M., H., Capdevielle E., F., Aquero, A., Boquet , M., & Ferrari, M. ( 2006.). Electroejaculation and seminal parameters in vicuna (*Vicugna vicugna*). . *Theriogenology* ;pp:67:83.
- Giuliano, S., Directora, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., & Miragay, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science*, 359–369.
- Godoy Maldonado, D. I. (2014). *Caracterizacion Fisico-Quimica y parametros de calidad seminal de semen de llama colectada mediante vagina artificial*. Tesis en la Universida Austral de Chile Facultad de Ciencias Veterinarias Instituto de Ciencia Animal.
- Gonzalez, R. (2000). *Contratación semina*. Edit. Redondo BBAA-Argentina;pp:56-60.
- Hanses , D. (1999). Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). . *Journal of Reproduction and Fertility*. pp:222-236.
- Harrison , R. (1998). Sperm evaluation. *what should be testing In: 6<sup>th</sup> MAFF International Workshop on Genetic Resources. Tsukuba, Japan*.
- Holt W., V. (1996. ). Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. *Reprod. Reprod. Dom. Anim. Reprod. Dom. Anim.*, *Reprod. Dom. Anim.*

- Holt W., V., Van , L., & K. J., W. (2004). Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological. *Foundations for laboratory test. of semen quality Reproduction.*, 127,527-535.
- Huanca Marca, N. F. (2015). *“índice de fragmentacion de adn espermatico en semen de alpacas (vicugna pacos) utilizando el integrated semen analysis system - isas*. Thesis en en centro experimental Cicas la "RAYA" de Facultad de Ciencias Agrarias-Cusco.
- Iguer-ouada, M., & Verstegen, J. (2001). Evaluation of the “Hamilton Thorne computer-based automated system” for dog semen analysis. *Theriogenology.*, 57: 149-179.
- Jhonson L., R. (1989.). Llama reproduction, en: Llama medicine. *The veterinary clinics of north America. Food animal practice 5 (1) 159-182.*
- Kershaw-Young C. , M., & Maxwell W. , M. (October 2012.). Advancing artificial insemination in camelids, particularly the alpacas. . *RIRDC Publication No. 12/016.*
- Laruta Limachi, F., Loza-Murguía, M. G., & Delgado Callisaya , P. Á. (2016). Evaluación de características microscópicas de semen de llama (Lama glama). *Selva Andina animal science*, 8-21.
- Lichtenwalner, A., Woods, G., & Weber, J. (1996). Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in Llamas. *Revista de Elsevier.*
- Machaca, A., Ordoñez, C., Ampuero, E., Antezana, W., & Cucho, H. (2012). Propuesta de implementación y funcionamiento del Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos. *“CICAS - La Raya” FAZ – UNSAAC. Cusco.*
- Melling, M., & Alder, M. (2000). Práctica ovina y caprina. Buenos Aires. *ISBN:950-555-230-0.*
- Meza Chatata, A. (2014). *“Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de alpaca (Lama pacos)*. Tesis en centro experimental CICAS la raya de la Facultad de Ciencias Agrarias-Cusco.
- Miró, J., Lobo, V., & Quintero-Moreno, A. (2004). Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. . *Theriogenology. 72: 1706-1716.*

- Mogrovejo. (1952). *Estudios del semen de la alpaca*. Fac. Med. Vet. U.N.M.S. Marcos, Lima, Perú.
- Morton K., M., Vaughan J. , L., & Maxwell W., M. (2008). The continued development of artificial insemination technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation. 205p.
- Muiño, R., Tamargo, C., Hidalgo, O., & Peña, A. (2006). Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. . *Anim. Reprod.Sci., in press doi:10.1016/j.anireprosci.2007.10.007*.
- Ordóñez , C., Ampuero , E., Cucho , H., & Franco, E. (2012). Avances en la determinación de la velocidad del espermatozoide de alpaca en semen diluido usando el Integrated Sperm Anaysis System (ISAS®). *Spermova 1: 63 – 64*.
- Ordoñez, C., Cucho, H., Ampuero, E., Antezana, W., & Cayo, S. (2013). Inseminacio artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculacion. *Spermova*, 65-66.
- Osorio E., M., & San Martín., M. (1966). Aspecto histológico de epidímo, conducto deferente y glandulas sexuales del aparato reproductor de camelidos. *Arch.Inst.Biol Andina 1*, 128-141.
- Osorio E., M., & San Martín, M. (s.f.). Aspecto histológico de epidímo, conducto deferente y glandulas sexuales del aparato reproductor de camelidos. *Arch.Inst.Biol Andina 1*, 128-141.
- Pulgar, V. (1938). *Las Ocho Regiones Naturales del Perú*.
- Quinteros Moreno, A. (2003). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, conejo y cerdo. *Tesis doctoral Universidad Autónoma de Barcelona Fac. de Veterinaria. España*.
- Quispe Cahuana, W. Y. (2018). *Comparación del efecto de dos curvas de congelacion en semen de alpaca. (vicugna pacos) colectada por vagina artificial y post cópula*. Tesis en la Facultad de ciencias Agrarias-cusco.
- Quispe, F. (1987). *Evaluación de Las Características Físicas del semen de la Alpaca (Lama pacos) Durante la Época de Empadre*. UNA, PUNO.

- Quispe, G. (1987). *Inseminacion artificial en alpacas (Lama pacos) con semen diluido a diferentes concentraciones*. Cusco-Perú.: I Zootec Thesis, Facultad de agronomia y zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Ramalho-Santos , J., Schatten , G., & Moreno , R. (2002). Control of membrane fursion during spermiogenesis and the acrosome reaction. . *Biol Reprod* 67(4): 1043-51.
- Rivera del Alamo, Palomino , M., & Quintero-Moreno . (2002). sperm subpopulation in boar semen and their relationship with photoperiod. . *17 th Congress of the inteernational pig Veterinary Society. June 2-5 Ames. Iowa: Vol 2. , Paper 669-494.*
- Rodriguez Capcha, M. (2013). *Indice de fragmentacion de ADN espermatico en semen de llamas(lama glama) utilizando el integrated sperm analysis system(ISAS)*. Tesis en Centro experimental Cicas la "RAYA" Facultad de Ciencias Agrarais,Cusco.
- Santiani , A., Huanca , W., Sapana , R., Huanca , T., Sepúlveda, N., & Sánchez, R. (2005). 94. Effects on the quality of frozenthawed alpaca (Lama pacos) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl* 7: 303-309.
- SIEA. (2014). *Ministerio de Agricultura y Riego - Dirección General de Evaluación y Seguimiento de Políticas – SIEA.*
- Souza W. , L., & Morais, A. (2009). Dimetilformamida adicionada no sêmen de caprinos sobre a longevidade e funcionalidade da membrana espermática após criopreservação. *Revista Semiárido De Visu*, 11-20.
- Sumar. (1981). Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (Lama pacos). *Resumen IV Conv. Int. Sobre Camélidos Sudamericanos*, Punta Arenas.3.
- Sumar, J. (1983). Pubertad en llamas machos . *XI Congreso Panamericano Ciencias veterinarias*, p. 62-70.
- Sumar, J. (s.f.). Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. . *En: FAO, Oficina de la FAO para América Latina y el Caribe.*
- Thurston L., M., Watson , P., & Mileham , A. (2001). Morphologically distiner sperm subpopulation defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate

- with variation in boar semen quality following cryopreservation. . *J. Androl*, 22 (3): 82-39.
- Torres , H. (1989). South American Camelids. An action plan for their conservation. *IUCN/SSC South American Camelids Specialist Group. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), Gland. Suiza.*, 48p.
- Turin, C. (2009). Reproducción de Camélidos. *Facultad de Zootecnia-UNALM*, P.109-125.
- Ugarelli , A., Evangelista , S., Choez, K., Pacheco , J., & Santiani, A. (2015). Evaluación de diferentes concentraciones de FITC-PSA y FITC-PNA para la valoración de la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca. . *Spermova 5: 87-92*.
- Valle Zapata, E. M. (2013). "*Evaluacion de dos tecnicas de coleccion de semen en llamas (lama glama)*" en la estacion experimental de choquenaira. Tesis en La Paz, Bolivia.
- Von Baer, L., & Hellemann, C. (1998). Variables seminales en llama (Lama glama. *Arch. med. vet. vol.30 n.2 Valdivia 1998*.
- Von Baer, L., & Hellemann, C. (1998). Variables seminales en llama (Lama glama). *Arch. med. vet. vol.30 n.2 Valdivia 1998*.

# ANEXOS

**Anexo 1:** ANVA para la filancia de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion y vagina artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	6	1.14843750	0.19140625	0.69	0.6624
MET	1	0.28125000	0.28125000	1.01	0.3265
COL	3	0.21093750	0.07031250	0.25	0.8588
Error	21	5.85156250			
Total corregido	31	7.49218750			

CV=22.24990

**Anexo 2:** ANVA para el PH de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion y Vagina artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	6	18.62093750	3.10348958	4.45	0.0047
MET	1	0.78125000	0.78125000	1.12	0.3019
COL	3	5.11343750	1.70447917	2.44	0.0924
Error	21	14.64406250			
Total corregido	31	39.15968750			

CV=7.296679

**Anexo 3:** ANVA para el volumen de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion y Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	6	136.8084375	22.8014063	17.54	<.0001
<b>MET</b>	1	57.7812500	57.7812500	44.44	<.0001
<b>COL</b>	3	28.3509375	9.4503125	7.27	0.0016
<b>Error</b>	21	27.3065625			
<b>Total corregido</b>	31	250.2471875			

CV=19.62883

**Anexo 4:** ANVA para la Concentración de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	6	24813.14375	4135.52396	1.30	0.3011
<b>MET</b>	1	404.70125	404.70125	0.13	0.7251
<b>COL</b>	3	10190.13250	3396.71083	1.07	0.3847
<b>Error</b>	21	66920.9425			
<b>Total corregido</b>	31	102328.9200			

CV=45.54334

**Anexo 5:** ANVA para la motilidad total de semen colectado por Electroeyaculación

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	709.098438	236.366146	1.13	0.3670
<b>COL</b>	3	207.235937	69.078646	0.33	0.8027
<b>TRAT</b>	1	2791.912813	2791.912813	13.40	0.0023
<b>ANI*COL</b>	9	4951.165313	550.129479	2.64	0.0466
<b>Error</b>	15	3125.88219			
<b>Total corregido</b>	31	11785.29469			

CV=26.72 % R-Cuadrado: 0.73

**Anexo 6:** ANVA para la motilidad no progresiva de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Tipo I SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>ANI</b>	3	564.092500	188.030833	0.82	0.5018
<b>COL</b>	3	287.005000	95.668333	0.42	0.7425
<b>TRAT</b>	1	1997.120000	1997.120000	8.73	0.0098
<b>ANI*COL</b>	9	3508.262500	389.806944	1.70	0.1736
<b>Error</b>	15	1815.437188			
<b>Total</b>	31	7998.472188			

CV=24.85298

R-Cuadrado: 0.65

**Anexo 7:** ANVA para la motilidad progresiva de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Tipo I SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>ANI</b>	3	564.092500	188.030833	0.82	0.5018
<b>COL</b>	3	287.005000	95.668333	0.42	0.7425
<b>TRAT</b>	1	1997.120000	1997.120000	8.73	0.0098
<b>ANI*COL</b>	9	3508.262500	389.806944	1.70	0.1736
<b>Error</b>	15	14.63500000			
<b>Total corregido</b>	31	71.03500000			

CV=40.11202

R-Cuadrado: 0.63

**Anexo 8:** ANVA para velocidad curvilínea (VCL) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion



Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	1953.325938	651.108646	2.33	0.1153
<b>COL</b>	3	299.728437	99.909479	0.36	0.7841
<b>TRAT</b>	1	3001.187813	3001.187813	10.75	0.0051
<b>ANI*COL</b>	9	2014.460312	223.828924	0.80	0.6210
<b>Error</b>	15	4185.92719			
<b>Total corregido</b>	31	11454.62969			

CV=23.69419

R-Cuadrado: 0.63

**Anexo 9:** ANVA para la velocidad rectilínea (VSL) de semen de llamas colectadas por

Electroeyaculación

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	93.9984375	31.3328125	2.39	0.1096
<b>COL</b>	3	39.9909375	13.3303125	1.02	0.4130
<b>TRAT</b>	1	267.3828125	267.3828125	20.39	0.0004
<b>ANI*COL</b>	9	227.9153125	25.3239236	1.93	0.1249
<b>Error</b>	15	196.7421875			
<b>Total corregido</b>	31	826.0296875			

CV=22.63956

R-Cuadrado: 076

**Anexo 10:** ANVA para la velocidad media (VAP) se semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion.

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Tipo I SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>ANI</b>	3	277.3525000	92.4508333	3.04	0.0616
<b>COL</b>	3	5.6425000	1.8808333	0.06	0.9791
<b>TRAT</b>	1	421.9512500	421.9512500	13.88	0.0020
<b>ANI*COL</b>	9	456.6350000	50.7372222	1.67	0.1829
<b>Error</b>	15	456.098750			
<b>Total corregido</b>	31	1617.680000			

CV=17.03233

R-Cuadrado: 0.71

**Anexo 11:** ANVA para el índice de linealidad (LIN) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion.

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Tipo I SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>ANI</b>	3	141.6009375	47.2003125	2.85	0.0726
<b>COL</b>	3	26.4659375	8.8219792	0.53	0.6667
<b>TRAT</b>	1	27.1953125	27.1953125	1.64	0.2194
<b>ANI*COL</b>	9	309.9878125	34.4430903	2.08	0.1008
<b>Error</b>	15	248.3496875			
<b>Total corregido</b>	31	753.5996875			

CV=17.65526

R-Cuadrado: 0.63

**Anexo 12:** ANVA para el índice de rectitud (STR) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculación

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	99.3250000	33.1083333	0.97	0.4314
<b>COL</b>	3	169.8075000	56.6025000	1.66	0.2173
<b>TRAT</b>	1	349.8012500	349.8012500	10.28	0.0059
<b>ANI*COL</b>	9	425.6775000	47.2975000	1.39	0.2752
<b>Error</b>	15	510.388750			
<b>Total corregido</b>	31	1555.000000			

CV=11.92269

R-Cuadrado: 0.67

**Anexo 13:** ANVA para el índice de oscilación (WOB) de semen de llamas colectadas por electroeyaculación

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	237.9059375	79.3019792	2.76	0.0788
<b>COL</b>	3	41.7784375	13.9261458	0.48	0.6983
<b>TRAT</b>	1	39.3828125	39.3828125	1.37	0.2602
<b>ANI*COL</b>	9	344.2578125	38.2508681	1.33	0.3005
<b>Error</b>	15	431.482187			
<b>Error corregido</b>	31	1094.807188			

CV=11.43342

R-Cuadrado: 0.67

**Anexo 14:** ANVA para la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	3	3.48843750	1.16281250	1.71	0.2070
COL	3	1.16843750	0.38947917	0.57	0.6409
TRAT	1	0.16531250	0.16531250	0.24	0.6288
ANI*COL	9	11.77781250	1.30864583	1.93	0.1254
Error	15	10.17968750			
<b>Total corregido</b>	<b>31</b>	<b>26.77968750</b>			

CV=25.32333 R-Cuadrado: 0.62

**Anexo 15:** ANVA para la frecuencia de batido de la cabeza (BCF) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	3	2.26093750	0.75364583	0.35	0.7913
COL	3	10.87093750	3.62364583	1.67	0.2155
TRAT	1	29.45281250	29.45281250	13.59	0.0022
ANI*COL	9	26.31531250	2.92392361	1.35	0.2922
Error	15	32.5121875			
<b>Total corregido</b>	<b>31</b>	<b>101.4121875</b>			

CV= 31.76774 R-Cuadrado: 0.68

**Anexo 16:** ANVA para la vitalidad espermática en semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	3	851.112554	283.704185	2.36	0.1157
COL	3	1021.091780	340.363927	2.83	0.0767
TRAT	1	155.376033	155.376033	1.29	0.2749
ANI*COL	9	1409.742550	156.638061	1.30	0.3176
Error	14	1684.768767			
<b>Total corregido</b>	<b>30</b>	<b>5122.091684</b>			

CV=17.44260

R-Cuadrado: 0.67

**Anexo 17:** ANVA para la funcionalidad de la membrana (HOST) de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Tipo I SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>ANI</b>	3	665.039650	221.679883	12.97	0.0002
<b>COL</b>	3	230.716150	76.905383	4.50	0.0192
<b>TRAT</b>	1	142.974050	142.974050	8.37	0.0112
<b>ANI*COL</b>	9	1032.948950	114.772106	6.72	0.0007
<b>Error</b>	15	256.292750			
<b>Total corregido</b>	31	2327.971550			

CV=7.486439

R-Cuadrado: 0.89

**Anexo 18:** ANVA para la reacción acrosomal de semen de llamas colectadas por Electroeyaculacion

<b>Fuente</b>	<b>DF</b>	<b>Tipo I SS</b>	<b>Cuadrado de la media</b>	<b>F-Valor</b>	<b>Pr &gt; F</b>
<b>ANI</b>	3	412.2466000	137.4155333	12.34	0.0002
<b>COL</b>	3	415.4331000	138.4777000	12.44	0.0002
<b>TRAT</b>	1	0.1922000	0.1922000	0.02	0.8972
<b>ANI*COL</b>	9	488.2413000	54.2490333	4.87	0.0036
<b>Error</b>	15	166.997000			
<b>Total corregido</b>	31	1483.110200			

CV=5.631214

R-Cuadrado: 0.89

**Anexo 19:** ANVA para la Motilidad total de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	3904.310938	1301.436979	10.35	0.0006
<b>COL</b>	3	809.083438	269.694479	2.15	0.1372
<b>TRAT</b>	1	849.750312	849.750312	6.76	0.0201
<b>ANI*COL</b>	9	1696.125312	188.458368	1.50	0.2345
<b>Error</b>	15	1885.594687			
<b>Total corregido</b>	31	9144.864688			

CV=23.99386

R-Cuadrado: 0.79

**Anexo 20:** ANVA para la Motilidad no progresiva (MNP) se semen de llamas colectadas por Vagina Artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	3377.965938	1125.988646	9.30	0.0010
<b>COL</b>	3	715.810937	238.603646	1.97	0.1616
<b>TRAT</b>	1	609.877812	609.877812	5.04	0.0403
<b>ANI*COL</b>	9	1479.380313	164.375590	1.36	0.2883
<b>Error</b>	15	1815.437188			
<b>Total corregido</b>	31	7998.472188			

CV=24.85298

R-Cuadrado: 0.77

**Anexo 21:** ANVA para la Motilidad progresiva (MP) en semen de llamas colectadas por Vagina Artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	19.82750000	6.60916667	6.77	0.0042
<b>COL</b>	3	6.32750000	2.10916667	2.16	0.1351
<b>TRAT</b>	1	19.84500000	19.84500000	20.34	0.0004
<b>ANI*COL</b>	9	10.40000000	1.15555556	1.18	0.3708
<b>Error</b>	15	14.63500000			
<b>Total corregido</b>	31	71.03500000			

CV=40.11202

R-Cuadrado: 0.75

**Anexo 22:** ANVA para la velocidad curvilínea (VCL) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	2491.708438	830.569479	8.12	0.0019
<b>COL</b>	3	299.363437	99.787812	0.98	0.4304
<b>TRAT</b>	1	942.865312	942.865312	9.21	0.0083
<b>ANI*COL</b>	9	1124.252812	124.916979	1.22	0.3519
<b>Error</b>	15	1534.879687			
<b>Total, corregido</b>	31	6393.069687			

CV=16.44896

**Anexo 23:** ANVA para la velocidad rectilínea (VSL) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	139.5534375	46.5178125	5.02	0.0131
<b>COL</b>	3	18.1834375	6.0611458	0.65	0.5924
<b>TRAT</b>	1	230.5878125	230.5878125	24.91	0.0002
<b>ANI*COL</b>	9	121.4403125	13.4933681	1.46	0.2493
<b>Error</b>	15	138.8671875			
<b>Total corregido</b>	31	648.6321875			

CV=18.14824 R-Cuadrado:0.70

**Anexo 24:** ANVA para la velocidad media (VAP) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	3	536.7484375	178.9161458	5.38	0.0102
COL	3	42.0284375	14.0094792	0.42	0.7402
TRAT	1	328.3203125	328.3203125	9.88	0.0067
ANI*COL	9	418.2303125	46.4700347	1.40	0.2718
Error	15	498.444688			
<b>Total corregido</b>	<b>31</b>	<b>1823.772188</b>			

CV=18.14703 R-Cuadrado:0.75

**Anexo 25:** ANVA para el índice de linealidad (LIN) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	3	103.7009375	34.5669792	4.84	0.0149
COL	3	5.5709375	1.8569792	0.26	0.8529
TRAT	1	93.5028125	93.5028125	13.10	0.0025
ANI*COL	9	23.0653125	2.5628125	0.36	0.9376
Error	15	107.0321875			
<b>Total corregido</b>	<b>31</b>	<b>332.8721875</b>			

CV=9.808309

**Anexo 26:** ANVA para el índice de rectitud (STR) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	3	48.2384375	16.0794792	1.54	0.2445
COL	3	46.6234375	15.5411458	1.49	0.2572
TRAT	1	316.8903125	316.8903125	30.41	<.0001
ANI*COL	9	56.4103125	6.2678125	0.60	0.7774
Error	15	156.3146875			
<b>Total corregido</b>	<b>31</b>	<b>624.4771875</b>			

CV=6.141919 R-Cuadrado:0.75



**Anexo 27:** ANVA para el índice de oscilación (WOB) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	3	170.1909375	56.7303125	3.61	0.0382
COL	3	23.5784375	7.8594792	0.50	0.6875
TRAT	1	0.9453125	0.9453125	0.06	0.8095
ANI*COL	9	79.3878125	8.8208681	0.56	0.8075
Error	15	235.4796875			
<b>Total corregido</b>	<b>31</b>	<b>509.5821875</b>			

CV=7.651249

**Anexo 28:** ANVA para la amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	3	2.70593750	0.90197917	10.57	0.0005
COL	3	1.49093750	0.49697917	5.83	0.0076
TRAT	1	0.47531250	0.47531250	5.57	0.0322
ANI*COL	9	1.68031250	0.18670139	2.19	0.0865
Error	15	1.27968750			
<b>Total corregido</b>	<b>31</b>	<b>7.63218750</b>			

CV=8.75975 R-Cuadrado:0.83

**Anexo 29:** ANVA para la frecuencia de batido (BCF) de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
ANI	3	2.64093750	0.88031250	0.85	0.4882
COL	3	12.99593750	4.33197917	4.18	0.0245
TRAT	1	53.30281250	53.30281250	51.44	<.0001
ANI*COL	9	10.45781250	1.16197917	1.12	0.4055
Error	15	15.54218750			
<b>Total corregido</b>	<b>31</b>	<b>94.93968750</b>			

CV=19.4003 R-Cuadrado: 0.83

**Anexo 30:** ANVA para la Vitalidad espermática de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	2676.865938	892.288646	19.86	<.0001
<b>COL</b>	3	10.055938	3.351979	0.07	0.9727
<b>TRAT</b>	1	274.365312	274.365312	6.11	0.0259
<b>ANI*COL</b>	9	1120.102812	124.455868	2.77	0.0392
<b>Error</b>	15	673.819687			
<b>Total corregido</b>	31	4755.209688			

CV=9.958433 R-Cuadrado:0.85

**Anexo 31:** ANVA para la Funcionalidad de la membrana de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	1387.451250	462.483750	26.64	<.0001
<b>COL</b>	3	57.756250	19.252083	1.11	0.3765
<b>TRAT</b>	1	310.005000	310.005000	17.85	0.0007
<b>ANI*COL</b>	9	1100.551250	122.283472	7.04	0.0005
<b>Error</b>	15	260.455000			
<b>Total corregido</b>	31	3116.218750			

CV=8.139613 R-Cuadrado: 0.91

**Anexo 32:** ANVA para la Reacción acrosomal de semen de llamas colectadas por Vagina Artificial.

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
<b>ANI</b>	3	2122.791250	707.597083	30.05	<.0001
<b>COL</b>	3	89.936250	29.978750	1.27	0.3193
<b>TRAT</b>	1	5.780000	5.780000	0.25	0.6275
<b>ANI*COL</b>	9	343.231250	38.136806	1.62	0.1965
<b>Error</b>	15	353.190000			
<b>Total corregido</b>	31	2914.928750			

CV=7.249860 R-Cuadrado:0.87

**Anexo 33:** Procedimiento PRINCOMP en semen fresco de llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial.

Procedimiento PRINCOMP

**Observaciones** 30890

**Variables** 6

**Estadísticos simples**

	<b>VCL</b>	<b>VSL</b>	<b>VAP</b>	<b>STR</b>	<b>ALH</b>	<b>BCF</b>
<b>Medi</b>	60.464567	14.212437	29.627471	48.748926	3.3501197	4.1347232
<b>a</b>	82	68	67	51	80	11
<b>StD</b>	30.798332	10.246911	14.475843	23.207486	1.4679376	2.3288134
	36	02	44	34	79	19

**Matriz de correlación**

	<b>VCL</b>	<b>VSL</b>	<b>VAP</b>	<b>STR</b>	<b>ALH</b>	<b>BCF</b>
<b>VCL</b>	1.0000	0.3999	0.7779	-.2425	0.9413	0.2763
<b>VSL</b>	0.3999	1.0000	0.6734	0.6172	0.3180	0.1307
<b>VAP</b>	0.7779	0.6734	1.0000	-.0683	0.7143	0.2192
<b>STR</b>	-.2425	0.6172	-.0683	1.0000	-.2787	-.0934
<b>ALH</b>	0.9413	0.3180	0.7143	-.2787	1.0000	0.1909
<b>BCF</b>	0.2763	0.1307	0.2192	-.0934	0.1909	1.0000

**Autovalores de la matriz de correlación**

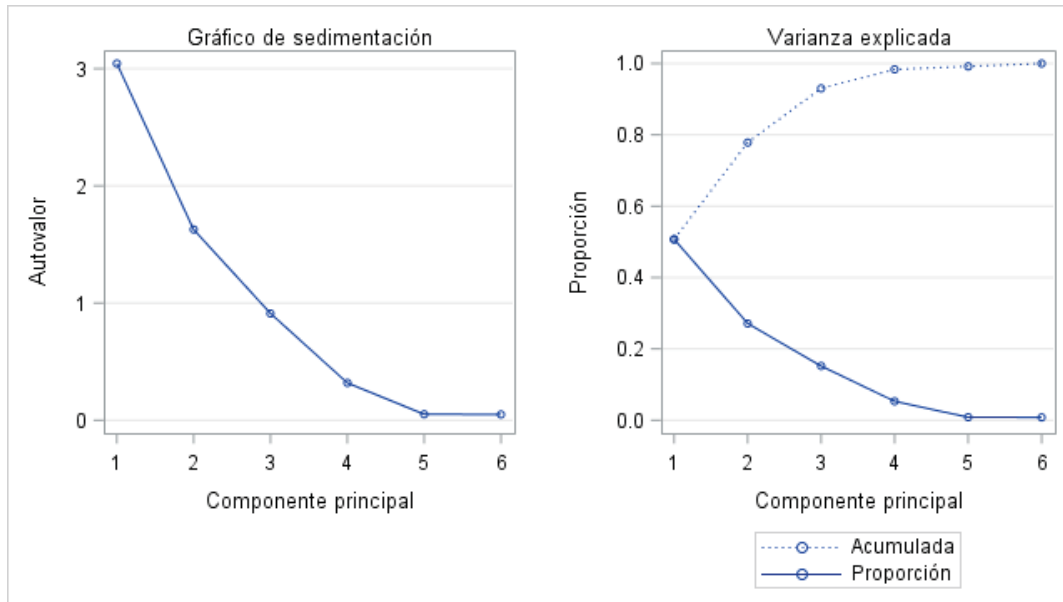
	<b>Autovalor</b>	<b>Diferencia</b>	<b>Proporción</b>	<b>Acumulada</b>
<b>1</b>	3.04406365	1.41733797	0.5073	0.5073
<b>2</b>	1.62672568	0.71569179	0.2711	0.7785
<b>3</b>	0.91103390	0.59255309	0.1518	0.9303
<b>4</b>	0.31848080	0.26762088	0.0531	0.9834
<b>5</b>	0.05085993	0.00202388	0.0085	0.9919
<b>6</b>	0.04883604		0.0081	1.0000

**Autovectores**

	<b>Prin1</b>	<b>Prin2</b>	<b>Prin3</b>	<b>Prin4</b>	<b>Prin5</b>	<b>Prin6</b>
<b>VCL</b>	0.539359	-.163369	-.093353	0.332963	-.388800	0.641606
<b>VSL</b>	0.355115	0.595225	0.007655	-.225382	-.572347	-.375718

### Autovectores

	Prin1	Prin2	Prin3	Prin4	Prin5	Prin6
<b>VAP</b>	0.525091	0.083037	-.095640	-.626985	0.521677	0.207316
<b>STR</b>	-.053527	0.747770	0.054192	0.461510	0.401314	0.246970
<b>ALH</b>	0.513298	-.209952	-.186690	0.480361	0.292105	-.584397
<b>BCF</b>	0.202296	-.094248	0.971746	0.038603	0.052240	-.041045



**Anexo 34:** Procedimiento PRINCOMP en semen de llamas degelificados con papaína ( 20 minutos) colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial.

Procedimiento PRINCOMP

**Observaciones** 33103

**Variables** 6

#### Estadísticos simples

	VCL	VSL	VAP	STR	ALH	BCF
<b>Medi</b>	72.403685	19.012908	35.561199	53.395583	3.6852158	5.2591366
<b>a</b>	47	20	89	78	41	34
<b>StD</b>	36.413726	12.530326	17.044566	21.445292	1.6655060	2.6654827
	74	25	67	65	73	56

### Matriz de correlación

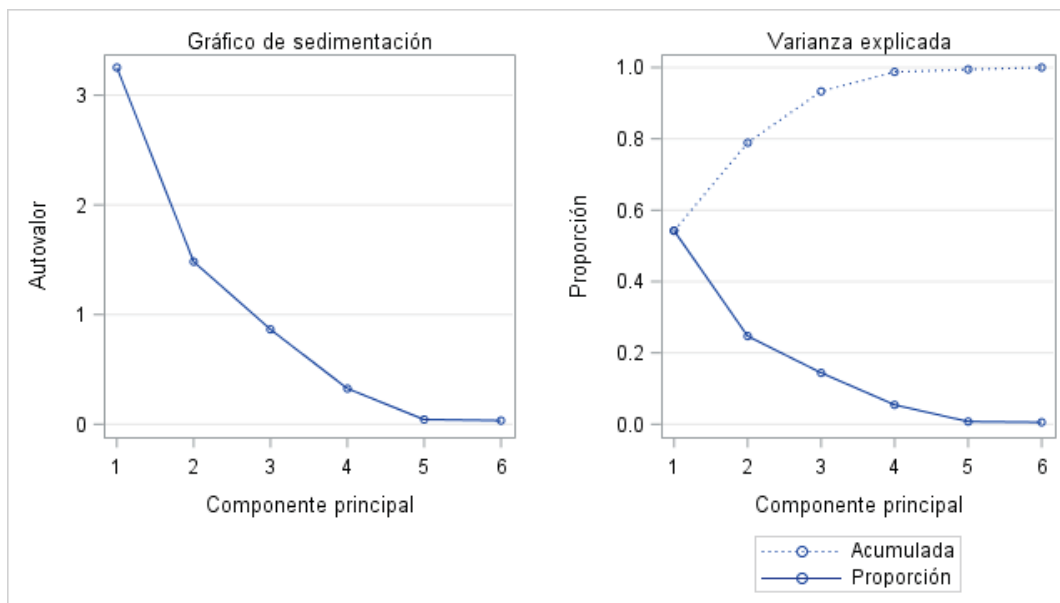
	VCL	VSL	VAP	STR	ALH	BCF
VCL	1.0000	0.5627	0.8143	-.0962	0.9510	0.2431
VSL	0.5627	1.0000	0.7540	0.5958	0.4555	0.2937
VAP	0.8143	0.7540	1.0000	0.0066	0.7225	0.2374
STR	-.0962	0.5958	0.0066	1.0000	-.1566	0.1472
ALH	0.9510	0.4555	0.7225	-.1566	1.0000	0.1471
BCF	0.2431	0.2937	0.2374	0.1472	0.1471	1.0000

### Autovalores de la matriz de correlación

	Autovalor	Diferencia	Proporción	Acumulada
1	3.25285185	1.77125029	0.5421	0.5421
2	1.48160156	0.61749647	0.2469	0.7891
3	0.86410509	0.53857663	0.1440	0.9331
4	0.32552846	0.28277279	0.0543	0.9873
5	0.04275567	0.00959830	0.0071	0.9945
6	0.03315737		0.0055	1.0000

### Autovectores

	Prin1	Prin2	Prin3	Prin4	Prin5	Prin6
VCL	0.516068	-.237555	-.012898	0.303518	0.237534	-.727000
VSL	0.443328	0.435302	-.197623	-.278100	-.685997	-.164275
VAP	0.510217	-.058023	-.089492	-.626393	0.504157	0.285939
STR	0.076669	0.765649	-.240907	0.409224	0.411632	0.113856
ALH	0.479072	-.315786	-.070115	0.519451	-.222161	0.588785
BCF	0.203529	0.254508	0.943301	0.029582	-.004027	0.055613



**Anexo 35:** Procedimiento FACTCLUS en semen fresco de llamas colectadas por Electroeyaculación y Vagina artificial

Procedimiento FASTCLUS  
 Replace=FULL Radius=0 Maxclusters=4 Maxiter=10 Converge=0.02

**Semillas iniciales**

Cluster	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
1	137.7000000	105.7000000	121.8000000	6.2000000	6.3000000
2	274.8000000	43.1000000	97.0000000	11.8000000	0.0000000
3	7.1000000	6.6000000	6.8000000	0.6000000	1.0000000
4	161.4000000	2.7000000	31.0000000	7.2000000	7.3000000

**Distancia mínima entre las semillas inic 137.5579**

**Historia de iteración**

**Iteración Criterio Cambio relativo en valores germinales del conglomerado**

		1	2	3	4
1	24.0803	0.4455	0.3916	0.3289	0.4294
2	10.0569	0.1270	0.2544	0.0130	0.0565
3	9.4623	0.0941	0.1222	0.0125	0.0536
4	8.9683	0.0705	0.0342	0.0128	0.0451

### Historia de iteración

Iteración	Criterio	Cambio relativo en valores germinales del conglomerado			
		1	2	3	4
5	8.5933	0.0523	0.0230	0.0121	0.0365
6	8.3135	0.0383	0.0296	0.0104	0.0281
7	8.1297	0.0275	0.0210	0.00860	0.0215
8	8.0107	0.0237	0.0211	0.00709	0.0175
9	7.9206	0.0214	0.0264	0.00586	0.0142
10	7.8477	0.0202	0.0268	0.00478	0.0121

WARNING: Iteration limit reached without convergence.

**Criterio basado en las semillas 7.7852**

### Resumen de conglomerados

Cluster	Frecuencia	Desviación estándar RMS	Distancia máxima de la semilla a la observación	Radio sobrepasado	Conglomerado más próximo	Distancia entre Centroides del cluster
1	4175	9.9893	75.5501		4	39.5014
2	919	15.5700	123.6		1	52.7404
3	14914	6.3027	36.0012		4	34.7077
4	10884	7.5940	50.9479		3	34.7077

### Estadísticos para variables

Variable	Total STD	STD interior	R-cuadrado	RSQ/(1-RSQ)
VCL	30.79751	11.58598	0.858488	<b>6.066561</b>
VSL	10.24670	9.08618	0.213765	<b>0.271884</b>
VAP	14.47562	8.86510	0.624983	<b>1.666548</b>
ALH	1.46802	0.72900	0.753427	<b>3.055592</b>
BCF	2.32896	2.24091	0.074273	<b>0.080232</b>
OVER-ALL	15.94118	7.75804	0.763178	<b>3.222588</b>

**Estadístico Pseudo F 33179.77**

**R-cuadrado general aproximado esperado = 0.73602**

**Criterio de agrupamiento cúb 27.523**

**Medias del cluster**

<b>Cluster</b>	<b>VCL</b>	<b>VSL</b>	<b>VAP</b>	<b>ALH</b>	<b>BCF</b>
<b>1</b>	104.7700359	20.9437844	47.1474970	5.3870659	4.8924551
<b>2</b>	152.8603917	31.9544070	65.7040261	7.2014146	4.9203482
<b>3</b>	36.6646507	10.5123240	19.8532623	2.2633968	3.4824728
<b>4</b>	68.2795112	15.2032525	33.2529309	3.7324237	4.6714627

**Desviaciones estándar del cluster**

<b>Cluster</b>	<b>VCL</b>	<b>VSL</b>	<b>VAP</b>	<b>ALH</b>	<b>BCF</b>
<b>1</b>	13.47047581	12.82351245	12.08986467	0.95930636	2.43969589
<b>2</b>	22.48443418	19.05019169	18.30983090	1.28492523	2.60042092
<b>3</b>	10.76052626	6.04751806	6.43419336	0.59608843	2.12174670
<b>4</b>	10.49191859	9.51422920	9.05442647	0.72745654	2.28700825



**Anexo 36:** Procedimiento FASTCLUS de semen de llamas degelificados con papaína (20 minutos) colectadas por el método de Electroeyaculacion y Vagina artificial.

Procedimiento FASTCLUS  
 Replace=FULL Radius=0 Maxclusters=4 Maxiter=10 Converge=0.02

**Semillas iniciales**

Cluster	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
1	0.0000000	54.4000000	0.0000000	0.0000000	0.0000000
2	239.1000000	55.4000000	87.6000000	9.1000000	10.0000000
3	103.7000000	2.5000000	16.4000000	4.4000000	3.0000000
4	118.9000000	85.0000000	101.3000000	4.7000000	8.9000000

**Distancia mínima entre las semillas inic** 117.2375

**Historia de iteración**

Iteración	Criterio	Cambio relativo en valores germinales del conglomerado			
		1	2	3	4
1	22.9988	0.4781	0.5027	0.3104	0.4232
2	9.8427	0.0632	0.1289	0.0171	0.1518
3	8.7745	0.0167	0.0533	0.00910	0.0583
4	8.5674	0.00315	0.0423	0.00882	0.0350
5	8.4720	0.00131	0.0316	0.0107	0.0264
6	8.4022	0.00301	0.0256	0.0114	0.0224
7	8.3464	0.00355	0.0209	0.0106	0.0186
8	8.3038	0.00353	0.0152	0.00974	0.0152

Criterio de convergencia satisfecho.

**Criterio basado en las semillas** 8.2726

### Resumen de conglomerados

Clu- ster	Frecuen- cia	Desviaci- ón estándar RMS	Distancia máxima de la semilla a la observaci- ón	Radio sobrepasa- do	Conglomera- do más próximo	Distancia entre Centroid- es del cluster
1	12346	6.5551	61.7462		3	38.4053
2	2507	13.0201	110.7		4	46.0024
3	10575	7.7840	42.8473		1	38.4053
4	6499	9.4650	66.1777		3	39.1389

### Estadísticos para variables

Variable	Total STD	STD interior	R-cuadrado	RSQ/(1-RSQ)
VCL	36.50459	12.18439	0.888603	<b>7.976940</b>
VSL	12.50149	9.87418	0.376211	<b>0.603106</b>
VAP	16.98541	9.38420	0.694788	<b>2.276414</b>
ALH	1.66890	0.77693	0.783297	<b>3.614611</b>
BCF	2.65195	2.55404	0.072567	<b>0.078245</b>
OVER-ALL	18.90606	8.26013	0.809133	<b>4.239249</b>

**Estadístico Pseudo F** 45109.84

**R-cuadrado general aproximado esperado =** 0.73364

**Criterio de agrupamiento cúb** 105.594

**Aviso: los dos valores anteriores no son válidos para variables correlacionadas.**

### Medias del cluster

Cluster	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
1	38.2462498	10.8704277	20.1121335	2.2118824	4.3484205
2	150.8522138	35.5104507	63.0399681	6.9972876	6.0188672
3	71.5234421	19.6261371	37.0525957	3.6485957	5.7224019
4	107.4122019	26.5855670	50.9423758	5.2215418	5.8599631

**Desviaciones estándar del cluster**

Cluster	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
1	11.46279632	5.84232981	6.54663034	0.63113794	2.46154933
2	18.53554463	16.42776573	15.03564500	1.10309757	2.62576235
3	10.85893531	9.70483197	9.11771185	0.74694489	2.67600323
4	12.46330621	12.52211897	11.34652164	0.91188117	2.49462526

Procedimiento FASTCLUS  
 Replace=FULL Radius=0 Maxclusters=4 Maxiter=10 Converge=0.02

**Semillas iniciales**

Cluster	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
1	137.7000000	105.7000000	121.8000000	6.2000000	6.3000000
2	274.8000000	43.1000000	97.0000000	11.8000000	0.0000000
3	7.1000000	6.6000000	6.8000000	0.6000000	1.0000000
4	161.4000000	2.7000000	31.0000000	7.2000000	7.3000000

**Distancia mínima entre las semillas inic** 137.5579

**Historia de iteración**

Iteración	Criterio	Cambio relativo en valores germinales del conglomerado			
		1	2	3	4
1	24.0803	0.4455	0.3916	0.3289	0.4294
2	10.0569	0.1270	0.2544	0.0130	0.0565
3	9.4623	0.0941	0.1222	0.0125	0.0536
4	8.9683	0.0705	0.0342	0.0128	0.0451
5	8.5933	0.0523	0.0230	0.0121	0.0365
6	8.3135	0.0383	0.0296	0.0104	0.0281
7	8.1297	0.0275	0.0210	0.00860	0.0215
8	8.0107	0.0237	0.0211	0.00709	0.0175
9	7.9206	0.0214	0.0264	0.00586	0.0142
10	7.8477	0.0202	0.0268	0.00478	0.0121

**Criterio basado en las semillas 7.7852**

**Resumen de conglomerados**

Cluster	Frecuencia	Desviación estándar RMS	Distancia máxima de la semilla a la observación	Radio sobrepasado	Conglomerado más próximo	Distancia entre Centroides del cluster
1	4175	9.9893	75.5501		4	39.5014
2	919	15.5700	123.6		1	52.7404
3	14914	6.3027	36.0012		4	34.7077
4	10884	7.5940	50.9479		3	34.7077

**Estadísticos para variables**

Variable	Total STD	STD interior	R-cuadrado	RSQ/(1-RSQ)
VCL	30.79751	11.58598	0.858488	<b>6.066561</b>
VSL	10.24670	9.08618	0.213765	<b>0.271884</b>
VAP	14.47562	8.86510	0.624983	<b>1.666548</b>
ALH	1.46802	0.72900	0.753427	<b>3.055592</b>
BCF	2.32896	2.24091	0.074273	<b>0.080232</b>
OVER-ALL	15.94118	7.75804	0.763178	<b>3.222588</b>

**Estadístico Pseudo F 33179.77**

**R-cuadrado general aproximado esperado = 0.73602**

**Criterio de agrupamiento cúb 27.523**

**Medias del cluster**

Cluster	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
1	104.7700359	20.9437844	47.1474970	5.3870659	4.8924551
2	152.8603917	31.9544070	65.7040261	7.2014146	4.9203482
3	36.6646507	10.5123240	19.8532623	2.2633968	3.4824728
4	68.2795112	15.2032525	33.2529309	3.7324237	4.6714627

### Desviaciones estándar del cluster

Cluster	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF
1	13.47047581	12.82351245	12.08986467	0.95930636	2.43969589
2	22.48443418	19.05019169	18.30983090	1.28492523	2.60042092
3	10.76052626	6.04751806	6.43419336	0.59608843	2.12174670
4	10.49191859	9.51422920	9.05442647	0.72745654	2.28700825