

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



TESIS

“DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS, MICROSCÓPICAS Y SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS DEL SEMEN DE LLAMA (*Lama glama*) COLECTADO POR ELECTROEYACULACIÓN Y VAGINA ARTIFICIAL”

Tesis presentada por la Bachiller en Ciencias Agrarias **MITZI LALESHKA GALLEGOS IBARRA** para optar el título Profesional de **INGENIERO ZOOTECNISTA**.

ASESORES:

Ing. Zoot. Dr. LUCIO ENRIQUE AMPUERO
CASQUINO Ing. Zoot. M.Sc. HERNAN CARLOS
CUCHO DOLMOS Ing. Zoot. RUTH CCALTA HANCCO

K'ayra – Cusco - Perú

2019

DEDICATORIA

A DIOS, porque no hay día en que no muestre gran amor por mí.

A mi familia, mis abuelos Rogelia y Cirilo, mis padres Wilbert, Clorinda, mi hermano Erick, mis tías y tíos: Lida, Nelida, Dante, Sandra, Roger, Lauri y Marinesa porque siempre estuvieron brindándome su apoyo y consejos para hacer de mí una mejor persona, por todo el amor familiar que da felicidad y por ser mi fortaleza.

Absolutamente todo se lo debo a ustedes cualquier logro o mérito obtenido es nuestro, los amo.

A mis primos (as), Denilson, Dana, David, Dennis y Samin por regalarme momentos tan divertidos y sacar mi niña interior.

A mis amigos de siempre, Erika, Sheyla y Rufina por formar parte de mi vida y compartir momentos de alegrías y tristezas.

AGRADECIMIENTO

- En primer lugar agradezco al Convenio CONCYTEC-UNSSAC; quienes apuestan por la investigación e innovación de los conocimientos en los camélidos sudamericanos.
- Expreso mi agradecimiento y reconocimiento a mis estimados docentes de la facultad de ciencias agrarias de la Escuela Profesional de Zootecnia por contribuir en mi formación profesional, por brindarme sus conocimientos y experiencias profesionales.
- De manera especial agradezco a mi asesor el Ing. Enrique Ampuero, Ing. Hernán Cucho Dolmos por darme la oportunidad de empezar en la investigación, por confiar en mí, por su apoyo, paciencia, orientación y por sus revisiones de la traducción final de esta tesis.
- A todo el personal administrativo y técnico del Centro de Investigación en camélidos sudamericanos CICAS - La Raya – UNSAAC; quienes me brindaron su comprensión, consejos y apoyo desinteresado.
- A mis amigos, Erika, y Orlando por sus sabios consejos y siempre sus buenos deseos e inolvidables momentos.
- Para mi amigo Pepe, por el apoyo y las bonitas experiencias hasta la culminación de la tesis.
- A mis compañeros del código 2013-I: Rufina, Sheyla, Ada, Mónica, Mayumi, Alex, Romario, Iván, Yudith, Julio, Jhugred, Daniel, Leineth, Fiorella, y compañeros tesistas Juan Carlos, José, Edén, Liz; quienes me acompañaron durante los difíciles y gratos momentos en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos CICAS – La Raya – UNSSAC.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTO.....	II
ÍNDICE DE CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XII
ÍNDICE DE ANEXO.....	XII
RESUMEN.....	XIV
INTRODUCCIÓN.....	1
PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN	3
FORMULACION DEL PROBLEMA	3
PROBLEMA GENERAL.....	3
PROBLEMAS ESPECIFICOS	3
OBJETIVOS Y JUSTIFICACION	5
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
1.3 JUSTIFICACIÓN	6
CAPITULO II	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	7
2.2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
2.2.1 GENERALIDADES DE LA LLAMA	10
2.2.2 ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO	10
2.2.2.1. Pene y prepucio.....	10
2.2.2.2. Testículo	11
2.2.2.3. Epidídimo	11

2.2.2.4. Conducto deferente	12
2.2.2.5. Glándulas sexuales accesorias	12
2.2.2.5.1 Próstata.....	12
2.2.2.5.2 Glándulas bulbo uretrales	12
2.2.3 CARACTERÍSTICAS Y COMPONENTES DEL SEMEN	13
2.2.3.1. El semen	13
2.2.3.2. Características seminales	13
2.2.3.3. Células espermáticas	13
2.2.4 FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO	14
2.2.4.1. La pubertad	14
2.2.4.2. Deposición del semen	14
2.2.5 MÉTODOS DE COLECCION DE SEMEN.....	14
2.2.5.1. Colección por electroeyaculación.....	14
2.2.5.2. Colección por vagina artificial.....	15
2.2.6 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE LLAMA	15
2.2.6.1. Características macroscópicas.....	15
2.2.6.1.1 Volumen	15
2.2.6.1.2 Color y filancia.....	16
2.2.6.1.3 Potencial de Hidrogeniones	17
2.2.6.2. Características microscópicas.....	17
2.2.6.2.1 Motilidad espermática	17
2.2.6.2.2 Concentración espermática.....	18
2.2.6.2.3 Morfología espermática.....	19
2.2.6.2.4 Morfometría espermática	21
2.2.6.3. Tinciones para determinar la morfometría espermática	22
2.2.6.3.1 Hemacolor.....	23
2.2.6.4. Determinación de sub-poblaciones espermáticas	23
CAPITULO III	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1 DEL LUGAR DE ESTUDIO	25
3.1.1 Ubicación geográfica.....	25
3.1.2 Ubicación política	25

3.1.3	Límites	26
3.2	MATERIALES Y EQUIPOS	26
3.2.1	Material biológico de la investigación	26
3.2.2	Materiales para el método de electroeyaculación	26
3.2.3	Equipo para el método de electroeyaculación	27
3.2.4	Materiales para el método de vagina artificial	27
3.2.5	Materiales y equipos de laboratorio para la evaluación de semen colectado por electro eyaculación y vagina artificial	28
3.2.5.1.	Materiales de laboratorio	28
3.2.5.2.	Reactivos para el dilutor	29
3.2.5.3.	Solución para la evaluación de morfometría	29
3.2.5.4.	Equipos de laboratorio	29
3.3	METODOLOGÍA DE ESTUDIO	30
3.3.1	Selección de las llamas	30
3.3.2	Colección de semen	30
3.3.2.1.	Pesado de las llamas y medición de testículos de las llamas	32
3.3.2.2.	Aplicación de anestésico para la colección de semen por el método de electroeyaculación.....	33
3.3.2.3.	Protocolo de limpieza del zona prepucio y estimulación eléctrica de lapróstata	33
3.3.2.4.	Del dilutor	34
3.3.2.4.1.	Preparación del dilutor	34
3.3.3	Evaluación de las características seminales de la llama	35
3.3.3.1.	Características macroscópicas del semen	35
3.3.3.1.1.	Volumen seminal	35
3.3.3.1.2.	Color seminal	35
3.3.3.1.3.	Filancia	36
3.3.3.1.4.	Potencial de hidrogeniones	36
3.3.3.2.	Características microscópicas del semen	37
3.3.3.2.1.	Motilidad espermática	37
3.3.3.2.2.	Concentración espermática.....	39
3.3.3.2.3.	Morfología y morfometría espermática	39
3.4	DISEÑO ESTADÍSTICO PARA LA EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS	41
3.4.1	Características macroscópicas del semen.....	41

3.4.2 Características microscópicas del semen	42
3.4.2.1. Motilidad y concentración espermática	42
3.4.2.2. Morfología y morfometría espermática	42
CAPITULO IV.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
4.1 DE LAS EVALUACIONES MACROSCÓPICAS DEL SEMEN	43
4.1.1 Volumen seminal	43
4.1.2 Color seminal	44
4.1.3 Filancia	44
4.1.4 Potencial de hidrogeniones.....	45
4.2 DE LAS EVALUACIONES MICROSCÓPICAS DEL SEMEN	45
4.2.1 MOTILIDAD ESPERMÁTICA.....	45
4.2.2 CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA	46
4.3 MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA	47
4.3.1 Evaluación de la morfología espermática colectada por el método de electroeyaculación	47
4.3.2 Evaluación de la morfología espermática colectada por el método de vagina artificial	48
4.3.3 Evaluación de la morfología espermática colectada por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial.....	49
4.4 MORFOMETRIA ESPERMÁTICA.....	50
4.4.1 Evaluación de la morfometria colectado por el método de electroeyaculación	51
4.4.2 Evaluación de morfometría del espermatozoide colectado por el método de Vagina Artificial	53
4.4.3 Evaluación de morfometría del espermatozoide colectado por los métodos electroeyaculación y vagina artificial	56
4.5 IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS	58
4.5.1 VARIABLES UTILIZADAS	58
4.5.2 DETERMINACION DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS	59
CAPITULO V.....	62
CONCLUSIONES.....	62

CAPÍTULO VI.....	63
RECOMENDACIONES	63
CAPITULO VII.....	64
BIBLIOGRAFIA.....	64
ANEXOS	73

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Caracterización de la morfometría de la cabeza del espermatozoide de la alpaca y llama	8
Tabla 2. Caracterización de la morfometría de la cabeza del espermatozoide de la llama.....	8
Tabla 3. Volumen y métodos de colección de semen de llamas	16
Tabla 4. Color de semen colectado en alpacas	16
Tabla 5. Motilidad espermática del semen de llama.....	18
Tabla 6. Concentración espermática por método de colección	19
Tabla 7. Morfología espermática en alpacas.....	21
Tabla 8. Parámetros de morfometría espermática de alpacas según el ISAS	22
Tabla 9. Publicaciones realizadas en subpoblaciones espermáticas en diferentes especies estudiadas en función de la morfometría espermática	24
Tabla 10. Registro del peso de las llamas y medición de testículos en llamas	32
Tabla 11. Registro de colección de semen por electroeyaculación en llamas	33
Tabla 12. Volumen seminal en llamas colectado por electroeyaculación y vagina artificial	43
Tabla 13. Color seminal en llamas colectado por electroeyaculación y vagina artificial	44
Tabla 14. Filancia (cm) del semen en llamas colectado por electroeyaculación y vagina artificial	44
Tabla 15. pH seminal en llamas colectados por electroeyaculación y vagina artificial	45
Tabla 16. Motilidad en semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación y vagina artificial	45
Tabla 17. Concentración en semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación y vagina artificial	46
Tabla 18. Porcentaje de espermatozoides del semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación.....	47
Tabla 19. Porcentaje de espermatozoides del semen de llamas colectado por el método de vagina artificial.....	48

Tabla 20. Porcentaje de espermatozoides del semen de llama colectado por ambos métodos	49
Tabla 21. Parámetros de la morfometría en semen de llamas	50
Tabla 22. Parámetros de la región de la cabeza del semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación.....	51
Tabla 23. Parámetros de la región de la forma de la cabeza del semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación	52
Tabla 24. Parámetros de la región de la pieza intermedia del semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación	53
Tabla 25. Parámetros de la región de la cabeza del semen de llamas colectado con vagina artificial	53
Tabla 26. Parámetros de la región de la forma de la cabeza del semen de llamas colectado por el método de vagina artificial	54
Tabla 27. Parámetros de la región de la pieza intermedia del semen de llamas colectado por el método de vagina artificial	55
Tabla 28. Parámetros de la región de la cabeza del semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial	56
Tabla 29. Parámetros de la región de la forma de la cabeza del semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial.....	57
Tabla 30. Parámetros de la región de la pieza intermedia del semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial.....	58
Tabla 31. Resultado del análisis principal de componentes realizado en los datos de análisis de esperma	59
Tabla 32. Numero de subpoblaciones espermáticas y parámetros de morfometría obtenidos del semen de llama colectado por ambos métodos	60

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Foto 1. Electroeyaculador Minitube 5 manual/automático 19/32 V	27
Foto 2. Materiales para el método de vagina artificial.....	28
Foto 3. Reactivos para la evaluación del semen de llama	29
Foto 4. Equipo Integrated Sperm Analysis System (ISAS) v 1.1; microscopio de contraste de fases UB200i con cámara, platina caliente y fluorescencia (derecha); monitor y teclado (centro) y CPU más la llave ISAS (izquierda) 30	
Foto 5. Colección de semen por el método de electroeyaculación.....	31
Foto 6. Colección de semen por el método de vagina artificial.....	31
Foto 7. Pesado de llamas y medición de testículos en el centro experimental CICAS la Raya	32
Foto 8. Profilaxis antes de la colección por el método de electroeyaculación	34
Foto 9. Evaluación de volumen y color seminal de llamas	36
Foto 10. Evaluación de pH en semen de llamas	37
Foto 11. Preparación de semen para la evaluación de la motilidad espermática	38
Foto 12. Evaluación de la motilidad espermática utilizando el ISAS	39
Foto 13. Solución hemacolor para la evaluación de la morfometría	40
Foto 14. Evaluación de la morfología y morfometría del espermatozoide de la llama evaluado con el software ISAS	41
Foto 15. Evaluación de la morfología del espermatozoide de la llama con el software ISAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Morfología de la cabeza de espermatozoide de llama: (a) piriforme; (b) normal; (c) largo; (d) redondeado; (e) estrecho. Fuente: (Soler et al., 2013).
21
- Figura 2.** Parámetros de evaluación morfometría del espermatozoide de llama (cabeza y pieza intermedia) (fuente: Soler et al., 2005). 22

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Grafico 1.** Identificación de subpoblaciones espermáticas 61

ÍNDICE DE ANEXO

- Anexo 1. Tabla del ANVA para el volumen de semen en llamas colectado por los**
métodos de electroeyaculación y vagina artificial 74
- Anexo 2.** Tabla del ANVA de la filancia en semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial 74
- Anexo 3.** Tabla del ANVA para el pH en semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial 74
- Anexo 4.** Tabla del ANVA para la motilidad en semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial 75
- Anexo 5.** Tabla del ANVA para la concentración en semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial 75
- Anexo 6.** Tabla del ANVA para el parámetro de longitud en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial 75
- Anexo 7.** Tabla del ANVA para el parámetro de ancho en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial 76
- Anexo 8.** Tabla del ANVA para el parámetro de área en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial 76
- Anexo 9.** Tabla del ANVA para el parámetro de perímetro en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial 76

Anexo 10. Tabla del ANVA para el parámetro de % de acrosoma en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial.....	77
Anexo 11. Tabla del procedimiento PRINCOMP en semen de llamas colectadas por electroeyaculación y vagina artificial	77
Anexo 12. Tabla del procedimiento FASTCLUS del semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial	78
Anexo 13. Tabla de código de las llamas, repeticiones de colecta y número de espermatozoides evaluados.....	80
Anexo 14. Tabla de la evaluación de la forma de la cabeza del espermatozoide de la llama por ambos métodos de colecta.....	81
Anexo 15. Tabla de la evaluación de las características macroscópicas (volumen, ph, filancia y color) del semen de llama	82

RESUMEN

El presente trabajo “Determinación de las características macroscópicas, microscópicas y subpoblaciones espermáticas del semen de llama (*Lama glama*) colectado por electroeyaculación y vagina artificial”, 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 en los meses de enero a junio del 2018, con el objetivo de determinar las características macroscópicas (volumen, color, filancia y pH) y microscópicas (motilidad, concentración, morfología y morfometría), y número de subpoblaciones espermáticas presentes en el semen de llama colectados por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial. Se manejó cuatro animales, para cada método de colecta: electroeyaculación y vagina artificial, con cuatro repeticiones a cada uno. Se determinó las características microscópicas y macroscópicas. Las variables microscópicas se analizaron con el Integrated Semen Analysis System - ISAS®. Se empleó la estadística descriptiva para las variables macroscópicas, los parámetros microscópicos se evaluaron en un arreglo factorial en bloques. Se hallaron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) para el volumen, los parámetros de morfometría de las regiones de cabeza, forma de la cabeza y pieza intermedia; se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) para la concentración y no se encontró diferencias significativas ($p > 0,05$), para la filancia, pH, y motilidad. Para identificar la morfología, se halló que existe mayor porcentaje en espermatozoides de forma larga con un 47,18%, angosto de 26,90 %, normal de 16,90%, redondo de 7,95% y piriforme de 1,07%. Para identificar las subpoblaciones espermáticas en semen de llama, se ha realizado el análisis de componentes principales (PCA), y luego, se ha determinado el número de subpoblaciones espermáticas tomando como criterio el coeficiente de determinación más alto. Se halló que los parámetros de largo, ancho, área, perímetro y acrosoma explican al 94 % de la varianza. Se han identificado 3 subpoblaciones espermáticas en función de los parámetros cinemáticos del semen de llama.

Palabras clave: morfología, morfometría, subpoblación espermática, *Lama glama*, semen de llama.

INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos (CS), constituyen un recurso genético de gran importancia social, económica, cultural y científica para el Perú así como también para algunos países de la Región Andina; asimismo es el principal medio de utilización productiva de extensas áreas de pastos naturales de las zonas alto andinas donde no es posible la agricultura ni de otras especies de animales domésticos. Los CSA convierten, con inusual eficiencia, los pastos pobres de estas alturas en productos de alta calidad como son la fibra y la carne (Fernandez 2005).

Uno de los principales objetivos en este ámbito, es contar con machos de fertilidad comprobada; es por ello, importante tener la capacidad de determinar el potencial fértil de un macho mediante la evaluación de su calidad espermática (Evangelista, 2015). La morfología espermática debe ser identificada como una característica útil para predecir esta capacidad fecundante (Maroto, 2012).

Las características seminales de camélidos sudamericanos hacen que la colección, evaluación y posterior utilización sea dificultosa, obteniéndose una gran variedad de datos entre los diferentes investigadores (Pacheco, 2008), existiendo varios factores que causan su variabilidad, entre ellos se encuentran la época, la edad, frecuencia de colección y el método de colección (Sumar, 2000). La exactitud de la valoración de la morfometría de espermatozoides depende del método de tinción, la habilidad para teñir y la fijación de los espermatozoides (Menkveld *et al.*, 1990).

Es de conocimiento que la evaluación de las características del semen es necesaria para implementar planes de manejo reproductivo y que los métodos tradicionales de estimación de la calidad de los eyaculados de diferentes especies se han basado principalmente en la evaluación de la movilidad individual, la morfología espermática y morfometría de los espermatozoides (Giuliano *et al.*, 2012).

La valoración de morfología de esperma incluyendo la morfometría, se usa para determinar una de las calidades de prueba de semen que depende de la manera y forma de tinción de espermatozoides (WHO, 1999).

Las características macroscópicas del semen de llama han sido determinadas a través de la observación y la experimentación, específicamente el color, de modo que

no se cuenta con información segura, por otro lado también es importante evaluar la caracterización de la morfología y morfometría, así mismo determinar las variables a través de un sistema computarizado de análisis, que permite inferir sobre algunas características reproductivas de las llamas; y establecer parámetros exactos de las características microscópicas del semen de llamas. (Rodríguez, 2013).

PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACIÓN FORMULACION DEL PROBLEMA

La morfología y morfometría del espermatozoide del semen de la llama genera un gran impacto para la crío preservación del semen, debido a que es necesario mantener espermatozoides viables, capacitados y de buenas características, pero el mayor impacto lo tiene en las restricciones para la exportación comercial porque hasta la fecha no se han establecido características claras, precisas y contundentes de la morfología y Morfometría del espermatozoide siendo una barrera para lograr dichos objetivos.

Es necesario resaltar que los camélidos sudamericanos son especies en la cual la colección de semen es muy complicada, es decir hasta la fecha no existe una técnica consensuada para hacerla, y debido a que los laboratorios en el país no cuentan con equipo adecuado, existen escasos reportes de la morfología y morfometría del espermatozoide de la llama (*Lama glama*), motivo por el cual se plantea realizar el presente trabajo ya que actualmente cuenta con un equipo análisis computarizado de semen – CASA, el sistema integrado de análisis de semen – ISAS, que nos permitirá obtener los diferentes parámetros morfométricos del espermatozoide de la llama como es su largo, ancho, perímetro, área, porcentaje de acrosoma, área y ángulo de inserción de la pieza intermedia, entre otros, de tal manera podremos tener una caracterización objetiva de esta célula.

PROBLEMA GENERAL

- ¿Cuáles son las características macroscópicas, microscópicas y subpoblaciones de espermatozoides de la llama obtenido mediante los métodos de colección de semen por electroeyaculación y vagina artificial?

PROBLEMAS ESPECIFICOS

1. ¿Cuáles serán las características macroscópicas (volumen, color, filancia y pH), microscópicas (motilidad, concentración, morfología y morfometría) del semen de la llama colectados por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial?

2. ¿Cuál es la morfología del espermatozoide de llama colectado por electroeyaculación y vagina artificial?
3. ¿Cuáles son los valores de los parámetros morfométricos del semen de la llama (como es su largo, ancho, perímetro, área, porcentaje de acrosoma, área y ángulo de inserción de la pieza intermedia, entre otros) colectados por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial?
4. ¿Cuáles serán las subpoblaciones espermáticas de semen de llama colectado por electroeyaculación y vagina artificial?

OBJETIVOS Y

JUSTIFICACION 1.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar las características macroscópicas, microscópicas y subpoblaciones espermáticas del semen de llama (*Lama glama*) colectado por electroeyaculación y vagina artificial.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar las características macroscópicas (color, volumen, filancia y pH) y microscópicas (motilidad, concentración, morfología y morfometría) del semen de llama colectado por electroeyaculación y vagina artificial.
2. Caracterizar la morfología de los espermatozoides del semen de llama colectado por electroeyaculación y vagina artificial.
3. Determinar los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides de la llama (área, perímetro, ancho, elipticidad, rugosidad, elongación, regularidad, porcentaje de acrosoma).
4. Determinar la existencia de subpoblaciones espermáticas por su morfometría en semen de llamas.

1.3 JUSTIFICACIÓN

En las zonas alto andinas del Perú existen miles familias que se dedican a la crianza de camélidos manejados en sistemas extensivos, pero a la vez muestran una preocupación por la baja tasa de natalidad y baja producción de machos reproductores, es por ello que se muestra interés en este trabajo para ayudar de alguna manera a los productores de estas zonas.

Existe la necesidad de medir las características espermáticas con mayor exactitud posible para establecer parámetros exactos de las características seminales, así mismo se ha incorporado en el centro de investigación CICAS la Raya, sistemas objetivos de medición de los parámetros espermáticos siendo el método confiable el Integrated Semen Analysis System (ISAS), debido a que los estudios realizados en camélidos sudamericanos en este caso en llamas (*Lama glama*) son muy variables, del tal modo que es preciso estandarizar todas las características del semen del macho con el fin de definir la calidad seminal en llamas.

Así mismo existe estudios muy variable sobre la forma de colección de semen en las llamas, debido a la mala praxis en la colección de semen y su posterior evaluación, aun no se tiene una metodología confiable y reproducible de la colección de semen y evaluación de las características microscópicas del semen de llama, para poder establecer una predicción de la fertilidad del macho.

Por lo tanto, el presente estudio “Determinación de la morfología, morfometría y de subpoblaciones espermáticas en semen de llama (*Lama glama*)”, usando el Integrated Semen Analysis System (ISAS) busca estandarizar parámetros que permitan identificar machos con aptitudes reproductivas positivas, siendo esta información relevante para futuras investigaciones.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Se tiene como base de la investigación las siguientes investigaciones:

Según (Cusiyunca, 2017) en su trabajo de investigación titulado “Características morfométricas y morfológicas de la cabeza del espermatozoide de la llama (*Lama glama*) usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS)”, menciona que mediante el método de post copula se obtiene los siguientes datos del tamaño y forma de la cabeza de los espermatozoides. Los resultados fueron: volumen promedio obtenido fue de $2,498 \pm 2,123$ ml; color de colecta blanquecino en (38,46 %), rojo claro en (28,85 %) y rojo oscuro en (32,69 %); la motilidad tuvo una media de $23,72 \pm 16,58$ %; concentración espermática fue $44,46 \pm 42,83 \times 10^6$ espermatozoides/ml. En tamaño de la cabeza longitud de $5,987 \pm 0,539$ μm ; ancho de $3,327 \pm 0,289$ μm ; área de $16,169 \pm 2,004$ μm^2 ; perímetro $17,683 \pm 1,382$ μm ; todos estos parámetros se evaluaron en 5 538 espermatozoides de llama. En parámetros de la forma de la cabeza: elipticidad $1,813 \pm 0,222$; rugosidad de $0,651 \pm 0,057$; elongación $0,285 \pm 0,056$; regularidad $0,968 \pm 0,042$ todas con distribución normal. En la morfología de la cabeza del espermatozoide se clasificó en 5 formas la cabeza de los espermatozoides de la llama, obteniendo así las siguientes medidas: 9,54 % piriforme, 15,78 % corto, 53,97 % normal, 7,01 % redondos y 13,70 % largo.

Según (Rodríguez, 2013) en su tesis titulada “Índice de fragmentación del ADN espermático y test de host en semen de llamas (*Lama glama*) utilizando el Integrated Sperm Analysis System” menciona que mediante el método de electroeyaculación obtiene los siguientes datos: Cabeza del espermatozoide (longitud de $5,2 \pm 0,5$ μm ; ancho de $3,1 \pm 0,3$ μm ; área de $13,6 \pm 1,9$ μm^2 ; perímetro de $16,6 \pm 2,0$ μm ; porcentaje de acrosoma de $46,3 \pm 6,7$ %); la forma de la cabeza (elipticidad de $1,6 \pm 0,2$; rugosidad de $0,6 \pm 0,1$, elongación de $0,2 \pm 0,1$; regularidad de $0,9 \pm 0,1$); y de la pieza intermedia (nivel de gris de $168,3 \pm 10,5$; anchura de la P.I de $1,4 \pm 0,4$ μm ; área de P.I de $3,0 \pm 0,7$ μm^2 ; distancia de inserción de la P.I de $0,2 \pm 0,2$ y ángulo de inserción de la P.I de $11,0 \pm 13,5$).

Según (Soler *et al.*, 2014) en su trabajo de investigación “Llama and alpaca comparative sperm head morphometric analysis”, caracterizo la morfometria de la cabeza del espermatozoide de la alpaca y llama hallando los siguientes datos que se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Caracterización de la morfometria de la cabeza del espermatozoide de la alpaca y llama

Parámetro	medida	Alpaca	Llama
Área	μm^2	15,9 \pm 2,3	13,7 \pm 2,8*
Perímetro	μm	15,1 \pm 1,2	14,1 \pm 1,6*
Longitud	μm	6,1 \pm 0,6	5,5 \pm 0,7*
Ancho	μm	3,6 \pm 0,3	3,4 \pm 0,4*
Rugosidad	μm	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
Factor de confort	%	1,5 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1*
Regularidad	μm	1,1 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1
Elipticidad	μm	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1*

Según (Soler *et al.*, 2013) en su trabajo de investigación titulada “Ejaculate Fractioning Effect on Llama Sperm Head Morphometry as Assessed by the ISAS CASA system”, caracterizo la morfometria de la cabeza del espermatozoide de la llama, usando una vagina artificial, se realizo tomando muestras cada 5 minutos por 20 minutos, cuyos datos se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Caracterización de la morfometria de la cabeza del espermatozoide de la llama

Parámetro	medida	Media	D.S	C.V (%)
Área	μm^2	13,75	2,82	20,51
Perímetro	μm	14,80	1,60	11,36
Longitud	μm	5,51	0,69	12,52
Ancho	μm	3,38	0,42	12,43
Rugosidad	μm	0,24	0,06	25,00
Factor de confort	%	0,87	0,06	6,70
Regularidad	μm	1,41	0,13	9,22
Elipticidad	μm	1,07	0,06	5,61

Según (Maroto, 2012) en su trabajo de investigación “Evaluación objetiva de la morfometría de ovino manchego (*Ovis aries*) Relación con la fertilidad”, identifico 4 subpoblaciones de espermatozoides diferentes en función del tamaño y forma de la cabeza espermática, en resumen los espermatozoides caracterizados por una cabeza pequeña y elongada han mostrado un efecto significativo positivo sobre el potencial fértil de los machos.

Según (Morales *et al.*, 2012) en su trabajo de investigación “Valoración de la biometría de la cabeza del espermatozoide mediante análisis computarizado de semen de cerdo recién colectado y refrigerado”, logro establecer la presencia de 3 subpoblaciones espermáticas en semen de cerdos, donde clasifiqué la subpoblación 1 como grandes, subpoblación 2 como medianos y subpoblación 3 como pequeños.

Según (Esteso, 2006) en su trabajo de investigación titulada “Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides del ciervo. Relaciones con congelación y calidad del semen”, identifico 3 subpoblaciones espermáticas morfométricamente diferentes.

Según (Nava y Quinteno, 2013) en su trabajo de investigación “Los espermatozoides bovinos con cromatina alterada están distribuidos morfométricamente en distintas subpoblaciones”, se basa en determinar las dimensiones de la cabeza del espermatozoide en semen crio preservado bovino y agruparlas en subpoblaciones para establecer el status de la cromatina (normal/dañada) en función de cada subpoblación, identificándose 3 subpoblaciones espermáticas.

2.2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.2.1 GENERALIDADES DE LA LLAMA

Es el más grande de los camélidos domésticos y se asemeja en muchos aspectos morfológicos o comportamentales a su progenitor silvestre, el guanaco. Del mismo modo que la especie silvestre, tiene un muy amplio rango de distribución geográfica, aunque en la actualidad es menor que el que se considera había antes de la llegada de la colonización europea. En la actualidad se distribuye desde Colombia, pasando por Ecuador, Perú, Bolivia, Argentina, hasta el centro de Chile (Wheeler, 1984).

La llama (*Lama glama*) es un mamífero artiodáctilo doméstico de la familia Camelidae, abundante en el Altiplano de los Andes de Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador y Perú. Fue creado por los pueblos andinos nativos mediante selección artificial a partir de guanacos salvajes que fueron domesticados, del cual la llama deriva. Fue aprovechado al máximo por el imperio Inca: ya que era utilizado como un animal de carga (San Miguel, 2008).

Las llamas se asocian a los lugares secos y áridos, siendo más rústicas que las alpacas, el cuidado de las llamas durante el pastoreo requiere de más esfuerzo, ya que ascienden a partes más altas y accidentadas, sin embargo, cuando se integran al hato de alpacas, se adecuan a su comportamiento y se dejan conducir con facilidad (Sumar, 1991).

Se le describe como un animal tímido, manso y dócil, reconoce con facilidad al dueño, no obstante si siente exceso de carga, molestias por los aperos o reciben castigos, reaccionan caprichosamente lanzando escupos y coces. La llama es utilizada para producir carne, lana, como transporte y también como carga, actualmente su mayor potencial se enmarca dentro de la producción de carne, ya que la función de carga y transporte es realizada por otros animales domésticos, motocicletas u otros vehículos motorizados. (Tapia, 2015).

2.2.2 ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

2.2.2.1. Pene y prepucio

El pene es fibroelástico con la flexura sigmoidea (semejante a la letra “S”) en posición preescrotal, presenta una proyección cartilaginosa en la punta del glande y también tiene un pequeño proceso uretral de aproximadamente 1 cm de largo (Sumar, 1985).

La longitud del pene es de 35 a 45 cm (Sumar, 1983). En el momento de la erección se extiende sobre una longitud de 18 a 25 cm, más allá de la apertura de la cavidad prepucial y tiene un diámetro de 0,8 a 2,0 cm (Johnson, 1989).

La punta del glande que es una proyección cartilaginosa firme, tiene una forma de gancho curvado ligeramente a la derecha, que sobrepasa a una proyección cónica rígida a la que se le ha llamado “prepucio uretral” de aproximadamente de 1 cm de largo; la forma del glande tiene que ver con la penetración del pene por los anillos de la cérvix, para la deposición intrauterina profunda del semen. El forro prepucial es triangular pendiendo a manera de una tela grande con un orificio prepucial en el ángulo libre del triángulo y dirigido caudalmente (Franco *et al.*, 1981).

2.2.2.2. Testículo

En la llama y la alpaca los testículos están localizados en la región perineal por debajo del ano estando a nivel del arco isquiático. Tienen de 5-7 cm de longitud, 2,5-3,5 cm de ancho y 3-4 cm de profundidad (Fowler, 1989). El peso del testículo es de aproximadamente 18 g en la alpaca (Sumar, 1991) y la orientación del eje mayor es de dorso caudal a antero ventral (similar al cerdo).

La mayor parte de veces, los dos testículos están presentes desde el nacimiento; a los 6 meses de edad descienden a un escroto no pendular, situado bajo el ano (Fowler, 1989). Son pequeños, elípticos, ubicados de manera que el diámetro principal es oblicuo con una orientación dorsal y caudal; en condiciones normales; ambos testículos son del mismo tamaño, firmes y con un movimiento libre dentro del escroto (Sumar, 2000).

El tamaño de los testículos varía según la raza y la estación (Fowler y Bravo, 1998). El diámetro de los tubos seminíferos en las llamas son de $223,07 \pm 19,8$ micras (Dehlon y Von Lawzewitch, 1987).

2.2.2.3. Epidídimo

El epidídimo es pequeño y está pegado al testículo (Smith, 1999); se compone de tres partes: la cola, el cuerpo y la cabeza. La cabeza del epidídimo está pegada a su polo

dorsal (Fowler y Bravo, 1998). La histología del epidídimo es comparable al de otras especies (Dehlon y Von Lawzewitsch, 1994).

2.2.2.4. Conducto deferente

El conducto tiene una longitud de 35 a 40 cm y un diámetro de 2 a 3 mm (Montalvo *et al.*, 1979), presenta un engrosamiento a su entrada en la cavidad abdominal. A diferencia de los camellos, los camélidos presentan una ampolla del deferente con un diámetro de 4 mm, situada sobre la cara dorsal de la vejiga (Osorio y San Martín, 1966); Contrariamente a los rumiantes esta no constituye un lugar de almacenaje de espermatozoides.

2.2.2.5. Glándulas sexuales accesorias

Las glándulas accesorias incluyen la próstata y un par de glándulas bulbouretrales (semejantes a las glándulas de Cowper) ubicadas en posición dorsolateral de la uretra. La próstata es palpable por vía rectal, siendo su tamaño de 3 x 3 x 2 cm y tiene forma de disco. No tienen glándulas vesiculares (Dehlon y Von Lawzewitch, 1987).

2.2.2.5.1 Próstata

Tiene la forma de “H”, estando ubicado dorsal y lateralmente sobre el cuello de la vejiga a 10 ± 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, 1966), (Ccoiso, 2018).

2.2.2.5.2 Glándulas bulbo uretrales

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), (Ccoiso, 2018).

2.2.3 CARACTERÍSTICAS Y COMPONENTES DEL SEMEN

2.2.3.1. El semen

El semen eyaculado está compuesto de espermatozoides y de plasma seminal, los testículos proveen los elementos celulares (espermatozoides), las glándulas accesorias proveen la mayor parte de la porción líquida (plasma seminal), la contribución del epidídimo y del conducto deferente al volumen del semen es relativamente pequeño (Bearden y Fuquay, 1982).

2.2.3.2. Características seminales

El volumen es variable con un promedio de 1,98 ml (0,4-6,6 ml), obtenido con fundas vaginales (Mogrovejo, 1952), Obtuvieron un promedio 1,36 ml (0,2-3,5 ml) con electroeyaculador. La motilidad masal es muy baja debido a que el fluido seminal es altamente viscoso y de color blanco lechoso (Sumar y Leyva, 1981).

La motilidad individual o progresiva de los espermatozoides es baja, lineal y rotatoria. El primer informe sobre la concentración espermática en semen colectado por funda vaginal (Mogrovejo, 1952) tuvo un promedio de $33,3 \pm 26,4$ millones/ml. (Fernandez y Calderon, 1966) informaron 1,000 a 255,000 espermatozoides/mm³ en semen obtenido por electroeyaculación y (Leyva *et al.*, 1984) estimaron una concentración de $292,900 \pm 84,321$ espermatozoide/mm³, obtenida por vagina artificial. El pH normal en alpaca es 8,3 (7,1 a 8,8) (Mogrovejo, 1952), mientras que el semen de llama presenta un pH de 8 (Lichtenwalner *et al.*, 1996). La morfología de los espermatozoides de llama y alpaca es muy similar a otras especies domésticas.

2.2.3.3. Células espermáticas

Los espermatozoides se forman en los tubos seminíferos de los testículos. Estos tubos contienen una serie de células germinales en desarrollo que finalmente constituirán los gametos masculinos. Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo y una cola que es necesario para la motilidad celular. El acrosoma es una estructura de doble pared situada entre la membrana plasmática y la porción anterior de la cabeza del espermatozoide. Un cuello une la cabeza del espermatozoide con su cola (flagelo), la

cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (Hafez, 1989).

2.2.4 FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

2.2.4.1. La pubertad

La pubertad en camélidos ocurre alrededor del primer año (Novoa *et al.*, 1972). Con una aparición de los primeros espermatozoides, aunque aún no son capaces de realizar una copula hasta los 2 a 3 años de edad.

El tamaño de los testículos aumenta con la edad, acompañado de un incremento de los niveles de testosterona en las llamas y alpacas (Bravo *et al.*, 1992).

Entre los 20 a 24 meses, la espermatogénesis es más evidente y los diámetros de los túbulos aumentan de manera notable, con una cantidad creciente de espermatozoides en la cabeza del epidídimo (Sumar, 1983).

2.2.4.2. Deposición del semen

Para el caso de las alpacas, debido al largo del pene, su naturaleza fibroelástico y a las formas típicas de su glande, la intromisión es sumamente fácil mediante movimientos semi rotativos y múltiples oscilaciones pélvicas; el pene es introducido alternadamente en ambos cuernos uterinos, sugiriéndose de esta manera que la eyaculación es intracorreal (Franco *et al.*, 1981).

2.2.5 MÉTODOS DE COLECCION DE SEMEN

Las particularidades de la copula de los camélidos sudamericanos, la posición sentada o prona, la eyaculación con duración de 10 a 50 minutos y el semen de escaso volumen y gran viscosidad, ha motivado a poner en práctica diversos sistemas de colección de esperma.

2.2.5.1. Colección por electroeyaculación

Reportada por (Fernandez y Calderon, 1966) (Calderón *et al.*, 1968); (Johnson, 1989), (McEvoy *et al.*, 1992; 1994); (Bourke *et al.*, 1995), desde 1966 ha sufrido modificaciones. En principio, implica tranquilizar al animal (Giuliano *et al.*, 2008) 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, lo 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 voltios a intervalos de un segundo durante tres segundos; el voltaje va incrementando progresivamente de 2 a 10 voltios en 6 a 12 minutos. Este método permitió recolectar semen en el 100% 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; no se evalúa el libido del animal (Giuliano *et al.*, 2008) (Ccoiso, 2018).

2.2.5.2. Colección por vagina artificial

Propuesta por (Sumar y Leyva 1981); implica como condición que la libido del macho sea normal (Giuliano *et al.*, 2008). El método 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 del maniquí (Dávalos *et al.*, 1999). Una dificultad reside en predisponer al macho al maniquí (Adam y Ratto, 2001); la exposición a una hembra en estado receptivo durante la colección, hace que en el 82 % de veces esta práctica sea exitosa (Aller, 2001).

La presencia de hembras durante la colección de semen con vagina no influye en las características macroscópicas y microscópicas del semen (Morton, 2010). Debido a los movimientos anteroposteriores y de rotación del pene en la vagina artificial, el 16 % de colectas resultan acompañadas de espuma, dificultando los exámenes microscópicos y macroscópicos del semen (Aller *et al.*, 2003); (Von y Hellemann, 1998); (Giuliano *et al.*, 2008). De todas las metodologías, en el presente la vagina artificial es la más utilizada (Garnica *et al.*, 1993).

2.2.6 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DEL SEMEN DE LLAMA

2.2.6.1. Características macroscópicas

2.2.6.1.1 Volumen

El volumen de semen varía según el estado fisiológico del macho, edad, raza, alimentación, frecuencia de colección, preparación psicosexual y por el método de

colección (vagina artificial, funda vaginal, esponja vaginal, fistula uretral, electroeyaculación, bulbouretrización, desviación del conducto deferente y otros). Existe una variabilidad de volumen de eyaculado entre individuos y aún en el mismo individuo de una colección a otra. (Fernández y Novoa 1968), en general el volumen es muy variable, como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 3. Volumen y métodos de colección de semen de llamas

Autor	Método	Media (ml) ± D.S
(Lichtenwalner <i>et al.</i> , 1996)	vagina artificial	3,0 ± 1,9
(Von Baer y Hellemann 1998)	vagina artificial	3,5 ± 2,6
(Aller 2001)	vagina artificial	2,2 ± 1,3
(Giuliano <i>et al.</i> , 2008)	vagina artificial	2,5 ± 1,6
(Giuliano <i>et al.</i> , 2008)	electroeyaculación	1,3 ± 4,3
(Carretero <i>et al.</i> , 2009)	electroeyaculación	3,6 ± 1,3
(Casaretto <i>et al.</i> , 2011)	electroeyaculación	3,19 ± 1,8
(Carretero <i>et al.</i> , 2012)	electroeyaculación	2,8 ± 1,6

Fuentes indicadas

2.2.6.1.2 Color y filancia

(Derivaux, 1982), Indica que en la mayoría de especies animales el semen tiene una coloración blanquecina y su opacidad se halla en función a la concentración espermática (ver tabla 04).

El eyaculado de los camélidos no está compuesto de una sola fase (Sumar, 1983, 1885); la mayor parte lo constituye el plasma seminal, en el 88,5 % y el resto son espermatozoides, 11,5 % (Garnica *et al.*, 1993).

Tabla 4. Color de semen colectado en alpacas

Autor	Método	Color
(Galindo, 1995)	V.A	Creoso lechoso a blanco cristalino
(Fernández y Novoa, 1968)	E.E	Blanco cristalino a blanco lechoso
(Ordoñez <i>et al.</i> , 2013)	E.E	Blanco lechoso claro a blanco lechoso medio
(González <i>et al.</i> , 2003)	V.A	Blanco cristalino

Leyenda: V.A: vagina artificial; E.E:

electroeyaculación Fuentes indicadas

El primer juicio en el examen visual sobre la calidad del eyaculado son la filancia y el color. En muestras obtenidas en alpacas por fundas vaginales, se ha observado que el color del semen varía de blanco lechoso, blanco cremoso y blanco cristalino. El semen es filante, ofreciendo serias dificultades en la preparación de frotices, al no correr la muestra sobre la lámina porta objetos. Debido a esta alta viscosidad del plasma seminal, el movimiento de los espermatozoides es lento (Fernández y Novoa, 1968).

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), c

(Ccalta, 2017), (Ccoiso, 2018) reporta que la filancia en alpacas colectadas por el método de post copula es de $23,8 \pm 0,70$ mm.

2.2.6.1.3 Potencial de Hidrogeniones

Un pH aproximado de 7 (de 6,9 a 7,5 para las diferentes especies) cae en límites de actividad óptima 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); (Fowler y Bravo, 1998) indica que el semen de llama colectado por vagina artificial es de 7,2-7,9, mientras que (Quispe y Delgado, 2012), indica que el semen de llama colectado por electroeyaculación es de 7,7. Por otro lado (Lichtenwalner *et al.*, 1996), indica un pH de $8,1 \pm 0,1$ en llama con vagina artificial.

2.2.6.2. Características microscópicas

2.2.6.2.1 Motilidad espermática

Según Sumar y Leyva (1981), mencionan que la motilidad de los espermatozoides constituye un elemento importante de la apreciación de su calidad e indica el grado de energía de estos, donde la determinación debe ser inmediata a la colección para apreciar la intensidad de movimiento.

La motilidad individual de la llama es lenta, lineal y rotatoria, es decir que la motilidad espermática de la llama es en mayor porcentaje de movimientos no progresivos y estáticos en relación al porcentaje de los motiles progresivos de un mismo eyaculado,

que es siempre menor, por el carácter filante que presenta el semen de la llama (Rodríguez, 2013).

Tabla 5. Motilidad espermática del semen de llama

Autor	Método	Media (%) ± D.S
(Lichtenwalner <i>et al.</i> , 1996)	vagina artificial	23,7 ± 20,0
(Von Baer y Hellemann, 1998)	vagina artificial	25,5
(Aller 2001)	vagina artificial	54,3 ± 10,5
(Giuliano <i>et al.</i> , 2008)	vagina artificial	27,02 ± 25,44
(Giuliano <i>et al.</i> , 2008)	electroeyaculación	26,88 ± 28,66
(Carretero <i>et al.</i> , 2009)	electroeyaculación	35,0 ± 17,6
(Casaretto <i>et al.</i> , 2011)	electroeyaculación	38,53 ± 28,5
(Carretero <i>et al.</i> , 2012)	electroeyaculación	28,2 ± 19,3

Fuentes indicadas

2.2.6.2.2 Concentración espermática

Fernández y Novoa (1968), mencionan que es importante 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 (Ccoiso, 2018).

La concentración espermática es diferente estadísticamente entre llamas, teniendo en general de 65×10^6 espermatozoides por ml, estos rangos se debe esencialmente a la influencia del efecto de eyaculaciones sucesivas.

Tabla 6. Concentración espermática por método de colección

Autor	Método	(10⁶/ml) ± D.S
(Lichtenwalner <i>et al.</i> , 1996)	vagina artificial	1,0 ± 0,8
(Von Baer y Hellemann 1998)	vagina artificial	85,0 ± 89,0
(Aller <i>et al.</i> , 2003)	vagina artificial	75,2 ± 20,4
(Giuliano <i>et al.</i> , 2008)	vagina artificial	72,79 ± 68,96
(Giuliano <i>et al.</i> , 2008)	electroeyaculación	50,28 ± 73,13
(Carretero <i>et al.</i> , 2009)	Electroeyaculación	148,4 ± 164,4
(Casaretto <i>et al.</i> , 2011)	electroeyaculación	126,62 ± 159,2
(Carretero <i>et al.</i> , 2012)	electroeyaculación	77,0 ± 83,6

Fuentes indicadas

2.2.6.2.3 Morfología espermática

Según (Jakso *et al.*, 1990), indican que la morfología y morfometría espermática es una parte esencial en la evaluación seminal de muchas especies, ya que una disminución en el porcentaje de espermatozoides normales está correlacionado con una disminución de la fertilidad del reproductor. (Buendía *et al.*, 2002), la distribución de espermatozoides, espermatozoides normales ($14,65 \mu\text{m}^2 \leq \text{área} \leq 17,38 \mu\text{m}^2$) con un promedio de $15,95 \mu\text{m}^2$, espermatozoides grandes ($\text{área} \geq 17,38 \mu\text{m}^2$).

Según la opinión de Salisbury y Vandermark (1982), menciona que la morfología espermática aceptable donde la fertilidad no se ve afectada es hasta el 20 % - 25 % de anomalía o que un 70 % de los espermatozoides posean morfología normal. Las anomalías morfológicas de los espermatozoides pueden ser: Primarias; debido a fallas en la espermatogénesis; Secundarias; ocurren durante el paso de los espermatozoides por el epidídimo; Terciaria; se produce durante la eyaculación, después de esta o por el manejo inadecuado de la muestra.

Reportes de investigadores sobre la morfología normal espermática de llamas colectados con vagina artificial: (Lichtenwalner *et al.*, 1996), reporta $39,7 \pm 18,5$ % en llamas; (Von y Hellemann, 1998) reportan en un estudio realizado en Chile-Temuco, porcentajes de $32,5 \pm 22,3$ % y (Giuliano *et al.*, 2008), reportan porcentajes de $65,4 \pm 16,65$ % (estudio realizado en la Universidad de Buenos Aires-Argentina).

Reportes de la morfología normal espermática en llamas usando la técnica de electroeyaculación: (Director *et al.*, 2007) reporta $61,95 \pm 17,9$ %; (Giuliano *et al.*,

2008) reporta $61,4 \pm 19,9$ %; (Casaretto *et al.*, 2011) reporta $57,14 \pm 13,1$ %; (Carretero *et al.*, 2012) reporta $62,0 \pm 10,7$ %. Todos estos estudios se realizaron en el altiplano de Argentina - Buenos Aires.

Según Von y Hellemann (1998), y (Buendía *et al.*, 2002), mencionan que la morfología en llamas y la morfometría espermática en alpacas respectivamente; muestran diferencias significativas entre machos en los parámetros estudiados.

La morfología de la cabeza del espermatozoide de la llama se clasificó en 5 formas, obteniendo así las siguientes medidas: 9,54 % piriforme, 15,78 % corto, 53,97 % normal, 7,01 % redondos y 13,70 % largo. Total se evaluaron en 5 590 espermatozoides de 26 llamas colectadas por el método de post copula (Cusiyunca, 2017).

(Mogrovejo, 1952), reporta un 41,23 % de formas anormales siendo las más frecuentes: cabezas solas, colas torcidas, micro cabezas, pieza intermedia engrosada, colas rotas, cabezas alargadas, macro cabezas y micro cabezas; estas podrían ser según la clásica nomenclatura, defectos primarios. La mayoría de las alteraciones en la cola (incluyendo el defecto "Dag"), en la vaina mitocondrial y en la pieza principal también tienen su origen en la espermatogénesis, como de una alteración en la función epididimaria. Por su parte las cabezas sueltas también se consideran defecto primario y secundario a la vez, ya que podría darse como resultado de una alteración en la base que conecta la cabeza del espermatozoide con la porción media del capitallum o bien por una función alterada del epidídimo. Otros defectos, sin embargo se consideran netamente secundarios, como las alteraciones en la parte distal del flagelo.

Tabla 7. Morfología espermática en alpacas

Autor	Método	Promedio de % formas normales	Promedio de % formas anormales
(Sumar y Leyva 1981)	vagina artificial	75,81 %	24,19 %
(Buendía <i>et al.</i> , 2001)	vagina artificial	87,6 %	12,4 %
(Director <i>et al.</i> , 2007)	electroeyaculación	61,95 %	-
(Giuliano <i>et al.</i> , 2008)	electroeyaculación	61,4 %	-
(Casaretto <i>et al.</i> , 2011)	electroeyaculación	57,14 %	-
(Carretero <i>et al.</i> , 2012)	electroeyaculación	62,0 %	-

Fuentes indicadas

Según (Buendía *et al.*, 2002); reporta una media de 47,0 % de forma normal, 3,6 % piriforme, 19,7 % corto, 1,0 % redondeado y 28,7 % alargado.

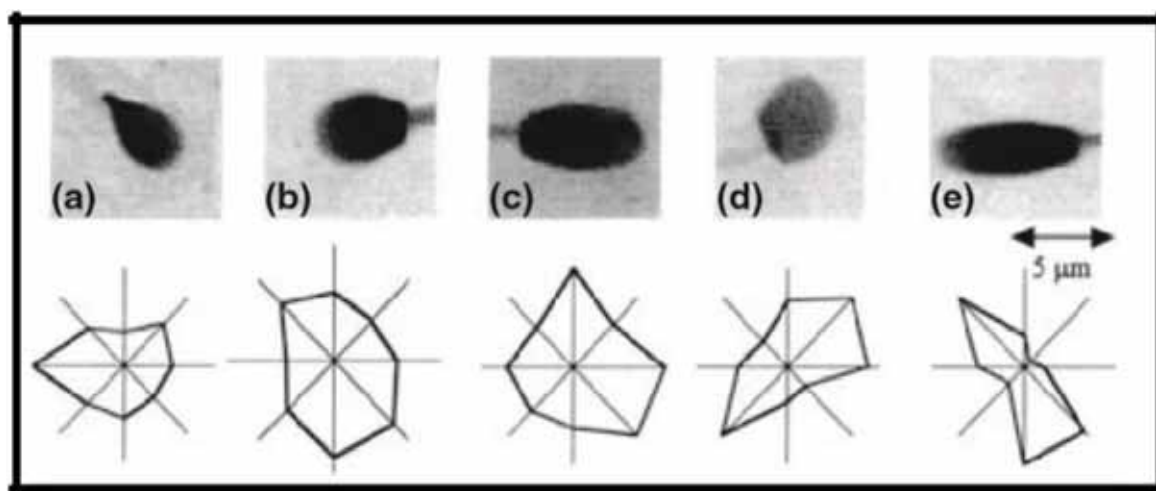


Figura 1. Morfología de la cabeza de espermatozoide de llama: (a) piriforme; (b) normal; (c) largo; (d) redondeado; (e) estrecho. Fuente: (Soler *et al.*, 2013).

2.2.6.2.4 Morfometría espermática

Según (Martí *et al.*, 2011) los análisis de morfometría asistido por computadora (CASA) han sido desarrollados para medir correctamente la forma de la cabeza de espermatozoide y las dimensiones. Estos programas han sido desarrollados para ser precisos y repetibles, revelando diferencias sutiles entre individuos las cuales no pueden ser detectadas con métodos subjetivos.

Tabla 8. Parámetros de morfometría espermática de alpacas según el ISAS

Cabeza	Pieza Intermedia (P.I)	Forma De La Cabeza/Formula	
Longitud (L) (μm)	Nivel De Gris (%)	Elipticidad	L/W
Ancho (W) (μm)	Anchura de la P.I	Rugosidad	$4\pi A/P^2$
Área (A) (μm^2)	Área De la P.I	Elongación	$(L-W)/(L+W)$
Perímetro(P) (μm)	Distancia de inserción de la P.I.	Regularidad	$\pi LW/4^a$
% de Acrosoma	Angulo de Inserción de la P.I		

Fuente: (Soler *et al.*, 2005).

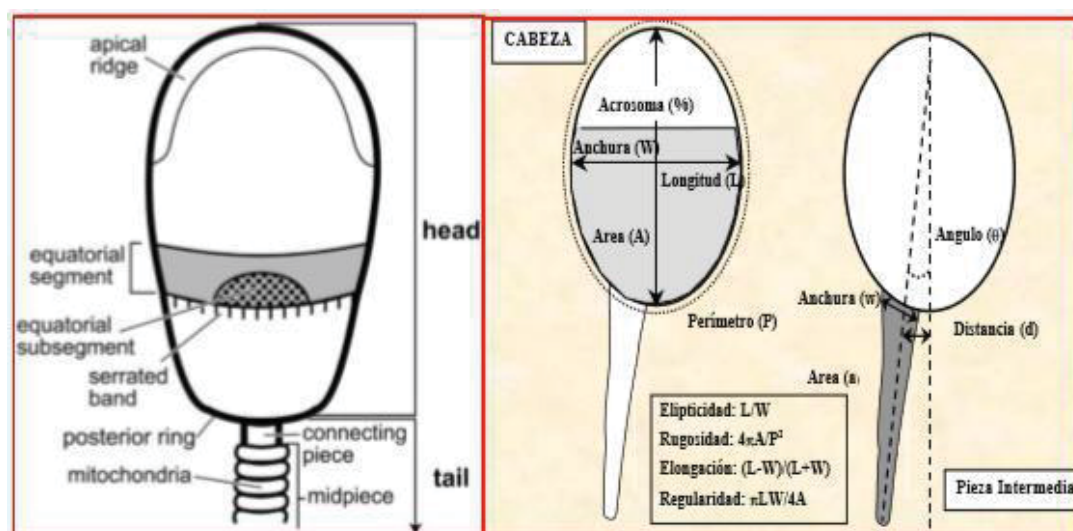


Figura 2. Parámetros de evaluación morfometría del espermatozoide de llama (cabeza y pieza intermedia) (fuente: Soler *et al.*, 2005).

2.2.6.3. Tinciones para determinar la morfometría espermática

Según la opinión de (Hidalgo *et al.*, 2006), sostienen que para el análisis morfométrico de espermatozoide (ASMA), asistido por computadora ha mejorado en la valoración de morfología y morfometría espermática, pero los resultados dependen del uso de nuestros procedimientos y adecuadas tinciones que tiñen los espermatozoides de las diferentes especies.

Según (WHO, 1999), señala que la valoración de morfología de espermatozoide incluyendo la morfometría, se usa para determinar una de las calidades de prueba de semen dependiendo de la manera y forma de tinción de espermatozoides. Una técnica de

tinción debería dar lugar a convertirse en dimensiones de esperma, formar las características de la morfometría del esperma, etc.

(Menkveld, 2007); (Davis y Gravance, 1993), sostienen que la exactitud de valoración de la morfología y morfometría del espermatozoide depende de la preparación cuidadosa, la fijación y tinción de espermatozoides, porque estos acontecimientos, entre otras cosas, pueden afectar seriamente las dimensiones de la cabeza del espermatozoide y/o forma de la cabeza del espermatozoide, o sea la morfometría de la cabeza de espermatozoide.

2.2.6.3.1 Hemacolor

Hemacolor (Merck, Darmstadt, Alemania, Cat. no. 11661) señala que la tinción Hemacolor tiene un típico color de los núcleos celulares, mayoritariamente rojo púrpura, se basa en la interacción molecular entre eosina y un complejo azul B – ADN.

Ambos colorantes forman el complejo, sin embargo la intensidad de la coloración depende del contenido de azul B y de la relación entre azul B y eosina amarilla. El resultado de tinción puede ser influido por diferentes factores como el valor del pH de la solución y de la solución tampón, las sustancias tampón (amortiguadores), el tiempo de tinción y la fijación.

2.2.6.4. 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); (Ccoiso, 2018). 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 (ver tabla 09). Además, se ha observado que espermatozoides pertenecientes a distintas subpoblaciones responden de forma diferente ante procesos como la crío preservación o la exposición al efecto de agentes capacitantes (Holt, 1996). En semen bovino fresco o congelado, de momento, no se ha publicado ningún estudio relativo a la identificación de subpoblaciones espermáticas con distintos tipos de movimientos.

Tabla 9. Publicaciones realizadas en subpoblaciones espermáticas en diferentes especies estudiadas en función de la morfometría espermática

Especie	Numero de subpoblaciones	Autor
Ovino	4	(Maroto 2012)
Cerdo	3	(Morales <i>et al.</i> , 2012)
Ciervo ibérico	3	(Esteso, 2006)
Bovino	3	(Nava y Quinteno, 2013)

Fuentes indicadas

CAPITULO III

MATERIALES Y

MÉTODOS 3.1 DEL LUGAR DE ESTUDIO

3.1.1 Ubicación geográfica

El presente trabajo se realizó de enero a julio del 2018, en la provincia de Canchis, distrito de Marangani, del departamento de Cusco, en el Centro Experimental de Camélidos Sudamericanos CICAS la Raya. Los análisis de laboratorio se efectuaron en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas, de la Escuela Profesional de Zootecnia, de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. Se halla comprendido entre:

Latitud sur : 14°21'23"

Longitud oeste : 71°10'06"

Altitud : 4130msnm

Superficie : 6320 ha

Promedio de precipitación pluvial: 965mm

Temperatura promedio anual: 6.5 -13.5°C

Fuente: Municipalidad Distrital de Marangani, (2016).

3.1.2 Ubicación política

Región : Cusco

Departamento : Cusco

Provincia : Canchis

Distrito : Marangani

Fuente: Municipalidad Distrital de Marangani, (2016).

3.1.3 Límites

Por el norte : Quispicanchis

Por el sur : Canas

Por el este : Carabaya y Melgar

Por el oeste : Chumbivilcas

Fuente: Municipalidad Distrital de Marangani, (2016).

3.2 MATERIALES Y EQUIPOS

3.2.1 Material biológico de la investigación

Se utilizó 8 llamas machos seleccionados del plantel del Centro Experimental de Camélidos Sudamericanos, de la raza Q'ara, de 4 a 6 años de edad, sexualmente maduros, sin defectos, y con antecedentes de crías, a éstos se realizó un examen clínico de sus órganos genitales externos, de los cuales se utilizó cuatro para la colección de semen por el método de vagina artificial y cuatro para la colección por electroeyaculación; alimentados en praderas nativas.

3.2.2 Materiales para el método de electroeyaculación

- Libreta de campo y lapiceros
- Sogas
- Papel toalla
- Tubos falcon de 50 ml
- Gel
- Agujas de 18 G X1/2 y de 21 G X1/2
- Anestésicos (xylazina y ketamina)
- Balanza nature visión
- Vernier

3.2.3 Equipo para el método de electroeyaculación

- Electroeyaculador (Minitube 5 manual/automático 19/32 V)



Foto 1. Electroeyaculador Minitube 5 manual/automático 19/32 V

3.2.4 Materiales para el método de vagina artificial

- Tubos falcón de 15 ml
- Maniquí
- Libreta de campo
- lapiceros
- Tubo para la vagina artificial
- Fundas (rectangular y cónica)
- jeringas de 50-60 ml
- Termómetro
- Termo (con agua caliente)
- Guantes quirúrgicos
- Frazadilla eléctrica
- Espiral (para disimular la cérvix de la llama)
- Termocupla



Foto 2. Materiales para el método de vagina artificial

3.2.5 Materiales y equipos de laboratorio para la evaluación de semen colectado por electroeyaculación y vagina artificial

3.2.5.1. Materiales de laboratorio

- Micro pipeta de 0,5 – 10 μ l y de 10 – 100 μ l
- Tips de 0,5 – 10 μ l y de 10 – 100 μ l
- Balanza analítica de precisión
- Baño seco
- Baño maría a 37 °C
- Platina caliente
- Papel Bond
- Lapiceros indelebles
- Tips
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Aceite de inmersión
- Alcohol isopropílico

- Barbijos
- Guantes quirúrgicos

3.2.5.2. Reactivos para el dilutor

- Tris (3,025 g/100ml)
- Ácido cítrico (1,7 g/100ml)
- Fructosa (1,25 g/100ml)
- Agua bidestilada

3.2.5.3. Solución para la evaluación de morfometría

- Coloración Hemacolor (solución I, II y III)



Foto 3. Reactivos para la evaluación del semen de llama

3.2.5.4. Equipos de laboratorio

- Microscopio de contraste de fases UB200i con cámara, platina caliente y fluorescencia
- Computadora con software ISAS v 1,1
- Software SAS v 9,4 (sistema de análisis estadístico)
- Vernier digital
- Impresora
- Cámara digital

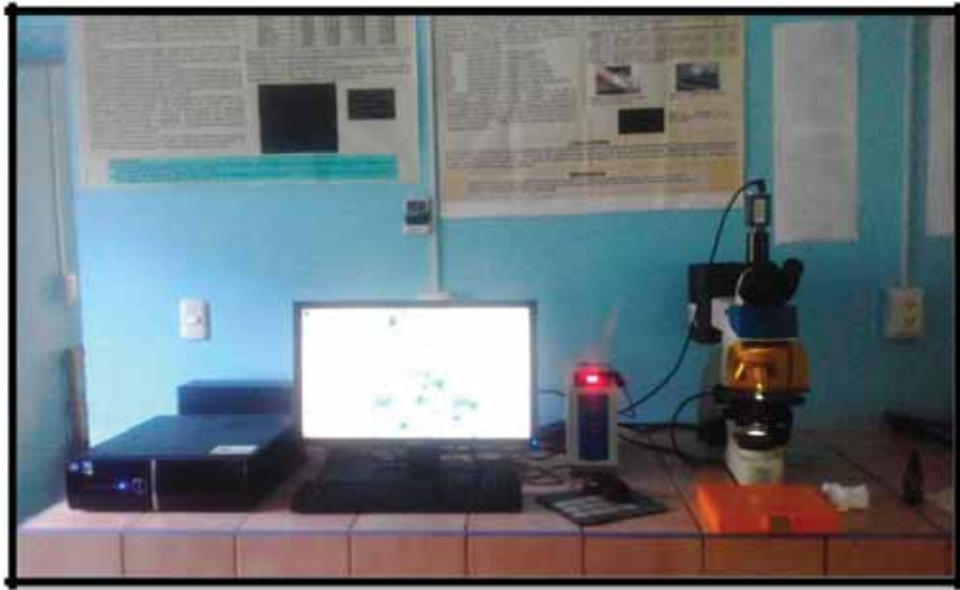


Foto 4. Equipo Integrated Sperm Analysis System (ISAS) v 1,1; microscopio de contraste de fases UB200i con cámara, platina caliente y fluorescencia (derecha); monitor y teclado (centro) y CPU más la llave ISAS (izquierda)

3.3 METODOLOGÍA DE ESTUDIO

3.3.1 Selección de las llamas

Los llamas que se utilizaron en esta investigación fueron llamas de la raza Q'ara, se preseleccionaron 10 machos del plantel de reproductores del CICAS La Raya; machos sin problemas reproductivos y con fertilidad comprobada, que oscilaban entre 4 a 6 años de edad, con pesos de $122,41 \pm 9,92$ kg

De los cuales se seleccionaron 8 llamas macho para la respectiva colección de semen por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, dichas llamas fueron codificados.

3.3.2 Colección de semen

Para efectuar la colección de semen por el método de electroeyaculación se seleccionó cuatro machos, con cuatro repeticiones a cada macho; con intervalos de descanso de una semana; animales entre 4 a 6 años, con peso promedio de $121,15 \pm 12,23$ kg, se utilizó el electroeyaculador (Minitube 5 manual/automático 19/32 V), y tubos falcon para la colección, en el tubo falcón se rotulo el código del animal en evaluación.

Por otro lado se efectuó la colecta semen por el método de vagina artificial a cuatro machos seleccionados, con cuatro repeticiones a cada macho, con intervalos de descanso de una semana; para dicha evaluación se entrenó a los llamas durante tres semanas para lograr una copula en el maniquí, una vez realizado esto se llevó a cabo la colección de semen utilizando un maniquí de alpaca, para ello se preparó la vagina artificial, se utilizó una frazadilla caliente para mantener la temperatura durante la copula, y se efectuó la colecta.

La primera colección de semen se inició el 22 enero y la ultima 30 de marzo del 2018 (época de reproducción).



Foto 5. Colección de semen por el método de electroeyaculación



Foto 6. Colección de semen por el método de vagina artificial

3.3.2.1. Pesado de las llamas y medición de testículos de las llamas

El pesado de llamas se desarrolló con la ayuda de una balanza análoga nature visión. El peso promedio de las llamas con las que se realizó esta investigación fue de 122,41 \pm 9,92 kg, consecutivamente se efectuó la medición de los testículos derecho e izquierdo de cada animal, esta medición se llevó a cabo con un vernier.

Tabla 10. Registro del peso de las llamas y medición de testículos en llamas

Llamas	Peso (Kg)	Medida de testículos			
		Derecho		Izquierdo	
		Largo (cm)	Ancho (cm)	Largo (cm)	Ancho (cm)
1	129,4	6,0	2,7	5,5	3,5
2	105,5	4,6	3,3	3,6	2,8
3	117,5	2,7	2,9	3,6	2,8
4	132,2	4,1	3,2	4,8	3,2
5	120,6	4,9	2,3	4,4	3,1
6	136,6	2,8	5,5	2,9	5,4
3	117,5	4,4	3,1	3,4	2,6
7	120,0	4,2	2,9	3,0	2,5
media \pm DS		122,41 \pm 9,92			



Foto 7. Pesado de llamas y medición de testículos en el centro experimental CICAS la Raya

3.3.2.2. Aplicación de anestésico para la colección de semen por el método de electroeyaculación

Para el proceso de la aplicación de anestésicos para la colección de semen por el método de electroeyaculación, se suministró dosis de 0,3 ml de xylacina y 2,8 ml de ketamina por 100 Kg de peso vivo, es así que se suministró hasta 3,70 ml de ketamina y 1,98 ml de xylacina como máximos, con un lapso de caída aproximadamente de 40 a 60 segundos (ver tabla 11), esta alteración se efectuó debido a que los animales manifestaron resistencia cuando se anestesiaba con el protocolo de (Rodríguez, 2013), (Ccoiso, 2018).

Tabla 11. Registro de colección de semen por electroeyaculación en llamas

Llamas	Peso (Kg)	Edad (años)	Dosis de anestésico (ml)		Respuesta al estímulo		Duración del estímulo
			ket. (0,3 mg/Kg)	Xil. (2,8 mg/Kg)			
Código					Erección	Eyaculación	
1	129,4	6	3,62	1,94	12 voltios	16 voltios	15 min
2	105,5	4	2,95	1,58	11 voltios	16 voltios	16 min
3	117,5	5	3,29	1,76	13 voltios	15 voltios	14 min
4	132,2	4	3,70	1,98	11 voltios	14 voltios	17 min
media ± DS 121,15 ± 12,23							

3.3.2.3. Protocolo de limpieza del zona prepucio y estimulación eléctrica de la próstata

Para realizar la colección de semen por el método de electroeyaculación se limpió la zona pene-prepucio con 10ml de agua destilada a 37 °C, esta praxis previa se realizó para evitar que el semen colectado sea contaminado con la suciedad ubicada a nivel del prepucio, después se utilizó guantes asépticos con agua destilada a 37 °C para proseguir con la limpieza vía rectal (Rodríguez, 2013).

Después de esta acción profiláctica se inició con la relajación de la S peniana, el posterior deservaine y sujeción de pene. Es importante tener sujetado el pene de la llama antes de empezar la estimulación eléctrica (Ccoiso, 2018).

La estimulación eléctrica fue realizada siguiendo el protocolo de (Director *et al.*, 2004), con algunas modificaciones; con el electroeyaculador (Minitube 5 manual/automático 19/32 V), se introdujo el transductor, previamente lubricado hasta la altura de la

próstata y seguidamente se empezó la estimulación eléctrica, el incremento de voltaje fue cada 3 voltios, de 3 voltios hasta 12 voltios, durando cada estímulo 3 segundos y repitiéndose cada estímulo tres veces en el mismo voltaje, con intervalos de 2 segundos de descanso. El tiempo que duró todo el proceso de colección fue de 14 a 17 minutos. Se observó la erección del pene a 11 Voltios y la eyaculación a 14 voltios, el cual fue diferente para cada llama (Rodríguez, 2013).

Para el método de vagina artificial se utilizó un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de copula, se armó la vagina artificial el cual consistía en tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 de largo con una funda interna de látex, un cono de látex al que envolvía un espiral simulando la cervix de la llama y en la parte final un tubo de 15 ml para colección de semen, con la ayuda de una jeringa se añadió agua a 45° se coloca por una válvula-espita; posteriormente se cubrió con la frazadilla eléctrica para mantener la temperatura, los machos aceptaron el maniquí después de las tres semanas de entrenamiento; la copula se interrumpía cada 10 min aproximadamente para renovar el agua caliente, el semen colectado varió, dependiendo de los machos, el tiempo de copula y el número de interrupciones que se les hacía para cambiar el agua (Ccoiso, 2018).



Foto 8. Profilaxis antes de la colección por el método de electroeyaculación

3.3.2.4. Del dilutor

3.3.2.4.1. Preparación del dilutor

La preparación del dilutor, se tuvo por conveniente preparar en base a, (Souza, 2009), Base tris: 3,025 g; ácido cítrico: 1,7 g; fructuosa: 1,25 g y agua bidestilada: 100 ml.

Preparación de dilutor en 10 ml de agua destilada; usamos cantidades en gramos; el cual obtuvimos: base tris 0,3028, ácido cítrico 0,1700 y fructosa 0,1250.

Solo se utilizó el base tris como disolución tampón, el intervalo útil de tamponamiento del tris es (7-9), uno de los más utilizados en biología y química, debido a que coincide con el pH fisiológico de la mayoría de los seres vivos. En el presente trabajo de investigación no se utilizó enzimas.

3.3.3 Evaluación de las características seminales de la llama

3.3.3.1. Características macroscópicas del semen

Después de la colección del semen de las llamas, por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, se prosiguió con la evaluación del volumen, el color seminal, filancia y pH, es decir de las características macroscópicas del semen; estas se realizaron a través del examen visual.

3.3.3.1.1. Volumen seminal

La colección de semen de las llamas para el método de electroeyaculación, se realizó en tubos falcón de 50 ml, estériles y graduados en mililitros (ml), para facilitar la lectura del volumen del semen colectado, se dio la lectura del volumen seminal a través del examen visual en los tubos graduados falcones temperados a temperatura corporal. El volumen del semen colectado por el método de electroeyaculación vario de 5,5 a 2,5 ml, encontrándose diferencias en cada llama evaluada.

La colección de semen de las llamas colectado por el método de vagina artificial, se realizó en tubos estériles y graduados en milímetros de 15 ml, la lectura del volumen fue a través de un examen visual. El volumen de semen colectado por este método vario de 9,0 a 5,6 ml.

3.3.3.1.2. Color seminal

El color seminal se comprobó paralelo al volumen a través de la observación continua, esto se facilitó por que los tubos falcón eran transparentes. El color seminal colectado

para los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, fue blanco cristalino, blanco lechoso y gris.



Foto 9. Evaluación de volumen y color seminal de llamas

3.3.3.1.3. Filancia

La filancia se midió en centímetros, se colocó una regla a la pared, se usó (5 μ l) de muestra de semen, se puso la muestra en una superficie plana y se estiro verticalmente, en seguida se prosiguió a la lectura de la medida de la filancia.

3.3.3.1.4. Potencial de hidrogeniones

La determinación del pH se realizó utilizando bandas con escala de 1 a 12.

El procedimiento para la medición del pH, fue de la siguiente manera:

Se utilizó tiras de papel tornasol para la identificación del pH, estas tiras reaccionaban con la muestra de semen y enseguida se teñían del color correspondiente al nivel de pH, estas tiras tenían una leyenda el cual describía los niveles desde básico, neutro y ácido con su respectivo color.



Foto 10. Evaluación de pH en semen de llamas

3.3.3.2. Características microscópicas del semen

3.3.3.2.1. Motilidad espermática

Para determinar la motilidad del semen se procedió a colocar una pequeña fracción de semen obtenido por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial (5 μ l) sobre una lámina portaobjetos, previamente calentado a 37 °C, cubriendo con el cubreobjetos a la misma temperatura, luego se observó en un enfoque de 10X en el Equipo ISAS, que está provista con una platina térmica.

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

- **Estáticos**, que son aquellos espermatozoides que carecen de movimiento, el sistema los marca de color amarillo.
- **Móviles progresivos**, los espermatozoides que muestran movimiento de traslación, el sistema los 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.

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:

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, %)

Parámetros de angularidad y oscilación de la cabeza:

- Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, μm)
- Frecuencia de batido (BCF, Hz).



Foto 11. Preparación de semen para la evaluación de la motilidad espermática



Foto 12. Evaluación de la motilidad espermática utilizando el ISAS

3.3.3.2.2. Concentración espermática

La concentración espermática es obtenida usando el módulo de motilidad del Integrated Semen Analysis System (ISAS), para lo cual se procede a homogenizar la muestra de semen, se deposita una pequeña cantidad de muestra (5 μ l) en un porta objetos, cubrir con un cubre-objeto; inmediatamente, usando el lente de 10X, se captura el número necesario de imágenes para el conteo de células espermáticas, se cuenta el número de espermatozoides por campo y se guarda las imágenes. Y así se determina el número de espermatozoides por ml, y se expresa en millones por ml.

3.3.3.2.3. Morfología y morfometría espermática

La evaluación de la morfometría espermática se realizó en el módulo de Morfometría del ISAS, el cual hace un análisis automático de la morfología y morfometría espermática, para lo cual se procedió con la tinción hemacolor, previo a esto se rotuló el portaobjeto con los datos de la llama, luego se colocó a un extremo del porta objeto 5 μ l del semen colectado con la ayuda de una micropipeta, y seguidamente se esparció la muestra con la ayuda de un cubreobjeto generando un frotis, el frotis se dejó secar por 20 minutos. Una vez seco las láminas se procedieron a la tinción con las 3 soluciones del hemacolor de la siguiente manera.

- Realizar 5 inmersiones con intervalo de 1 segundo cada inmersión en la solución I de la tinción Hemacolor.
- Realizar 3 inmersiones con intervalo de 1 segundo cada inmersión en la solución II de la tinción Hemacolor.

- Realizar 6 inmersiones con intervalo de 1 segundo cada inmersión en la solución III de la tinción Hemacolor.

- Dejar secar al aire durante 20 minutos y luego se empezó inmediatamente con la lectura y evaluación de la morfología y morfometría espermática en el ISAS.

La lectura de las láminas se realizó en un enfoque de 100X más aceite de inmersión. Se procedió a la captura manual entre 240-300 espermatozoides por colecta y por animal evaluado, obteniendo un total de 4 370 espermatozoides evaluados por el método de electroeyaculación y 4 496 espermatozoides evaluados por el método de vagina artificial, teniendo como resultado un total de 8 866 espermatozoides evaluados por ambos métodos de colecta.



Foto 13. Solución hemacolor para la evaluación de la morfometría

El módulo de Morfometría del ISAS mide parámetros de la morfometría espermática como: tamaño de la cabeza (área, perímetro, anchura, longitud, porcentaje de acrosoma), forma de la cabeza (elipticidad, rugosidad, regularidad y elongación), nivel de color de la cabeza, área de la pieza intermedia, anchura de la pieza intermedia, distancia de la inserción de la pieza intermedia y ángulo de inserción de la pieza intermedia.

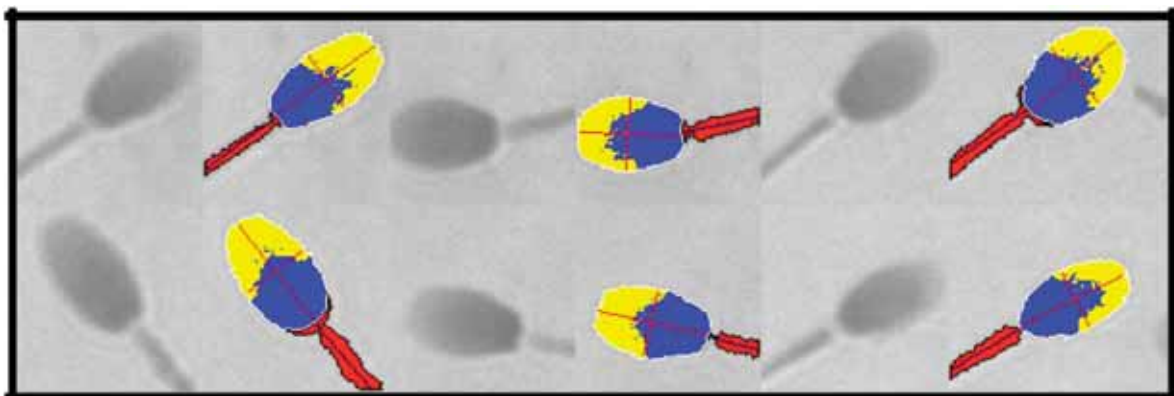


Foto 14. Evaluación de la morfología y morfometría del espermatozoide de la llama evaluado con el software ISAS

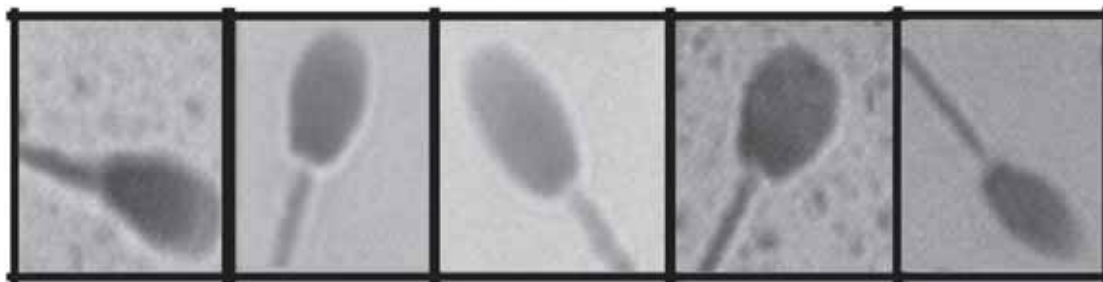


Foto 15. Evaluación de la morfología del espermatozoide de la llama con el software ISAS

3.4 DISEÑO ESTADÍSTICO PARA LA EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los datos obtenidos de las características seminales tanto macroscópicas (volumen) y microscópicas (concentración, motilidad, morfología y morfometría), evaluados en el ISAS, fueron sometidos a la prueba de la normalidad, para ver si los datos se ajustaban a una distribución normal o no y decidir si se utilizaría estadística paramétrica o no paramétrica; respecto a la morfometría se utilizó estadística no paramétrica el Test de Kruskal Wallis para datos que no tienen normalidad; y se utilizó el paquete estadístico SAS v 4.9. Para interpretar los resultados se determinó las medidas de tendencia central (promedio), de dispersión (desviación estándar, coeficiente de variabilidad) y rangos de variación máximos y mínimos.

3.4.1 Características macroscópicas del semen

Para el volumen seminal se aplicó estadística descriptiva con el procedimiento de test de normalidad del SAS v 4,9 donde se determinó el promedio, desviación estándar, coeficiente de variabilidad y rango de variación (mínimo y máximo del eyaculado). Con respecto del color seminal se utilizó también la estadística descriptiva, donde se determinó el porcentaje de colores, en función a los tres colores (blanco cristalino, blanco lechoso y gris) observados en los eyaculados obtenidos de las llamas mediante los métodos de electroeyaculación y vagina artificial. Se evaluó estas características macroscópicas del semen de llama en un total de 32 eyaculados obtenidos por ambos métodos de colecta.

3.4.2 Características microscópicas del semen

3.4.2.1. Motilidad y concentración espermática

Los datos obtenidos de las características seminales tanto macroscópicas (volumen) y microscópicas (concentración, motilidad, morfología y morfometría), evaluados en el ISAS, fueron sometidos a la prueba de la normalidad, para ver si los datos se ajustaban a una distribución normal o no y decidir si se utilizaría estadística paramétrica o no paramétrica; respecto a la morfometría se utilizó estadística no paramétrica el Test de Kruskal Wallis para datos que no tienen normalidad; y se utilizó el paquete estadístico SAS v 4,9. Para interpretar los resultados se determinó las medidas de tendencia central (promedio), de dispersión (desviación estándar, coeficiente de variabilidad) y rangos de variación máximos y mínimos.

3.4.2.2. Morfología y morfometría espermática

Según el Test de Normalidad de Kolmogorov – Smirnov, los datos de la morfometría espermática no se ajustaban a una distribución normal (excepto la elongación) motivo por el cual se aplicó estadística no paramétrica determinadas con el Test de Kruskal – Wallis, el cual utiliza la tabla de distribución del Chi Cuadrado.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 DE LAS EVALUACIONES MACROSCÓPICAS DEL SEMEN

4.1.1 Volumen seminal

En la Tabla 12 se muestra el volumen de semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, se observa que se hallaron diferencias altamente significativas entre métodos ($p < 0,01$), la media por el método de vagina artificial es mayor a la media frente al método de electroeyaculación.

Tabla 12. Volumen seminal en llamas colectado por electroeyaculación y vagina artificial

Método	n	Media (ml)	± D.S(ml)	C.V (%)	Max(ml)	Min(ml)
Electroeyaculación	16	3,8 b	0,80	21,26	5,5	2,5
Vagina artificial	16	7,4 a	1,22	16,58	9,0	5,6

Letras distintas muestran diferencias significativas ($p < 0,01$).

La media del volumen seminal de llamas colectado por el método de electroeyaculación fue: $3,8 \pm 0,80$ ml; es mayor al reportado por: (Giuliano *et al.*, 2008) de $1,3 \pm 4,3$ ml; (Carretero *et al.*, 2009) de $3,6 \pm 1,3$ ml, (Casaretto *et al.*, 2011) de $3,19 \pm 1,8$ ml y (Carretero *et al.*, 2012) de $2,8 \pm 1,6$ ml; todos estos estudios se realizaron en la Universidad de Buenos Aires-Argentina, en llamas confinadas y con suplementación alimenticia, colectadas por electroeyaculación.

Se observa diferencias numéricas en el volumen seminal esto podría estar sometida al efecto animal debido a que se utilizaron otros animales para el método de electroeyaculación y distintos para el método de vagina artificial, también en esta investigación se trabajó con llamas alimentadas con pasturas naturales, sin ningún suplemento alimenticio y estuvieron en su estado natural.

La media del volumen seminal de llamas colectado por el método de vagina artificial fue: $7,4 \pm 1,22$ ml; es mayor al reportado por (Lichtenwalner *et al.*, 1996) de $3,0 \pm 1,9$ ml; (Von y Hellemann 1998), de $3,5 \pm 2,6$ ml; (Aller 2001), de $2,2 \pm 1,3$ ml y (Giuliano *et al.*, 2008), de $2,5 \pm 1,6$ ml. Las diferencias estarían sometidos al efecto animal, condiciones del medio ambiente y la frecuencia de colecta.

4.1.2 Color seminal

El color del semen de llamas, colectados por electroeyaculación fue de cristalino brillante en 18 (56,3%) eyaculados, blanco lechoso en 11 (34,4%) eyaculados y gris en 3 (9,4%) eyaculados, en 32 eyaculados evaluados.

Tabla 13. Color seminal en llamas colectado por electroeyaculación y vagina artificial

TOTAL	Cristalino brillante	blanco lechoso	Gris
32 colectas	18	11	3
100 %	56,3	34,4	9,4

Los colores seminales reportados son similares al reporte de (Gonzales *et al.*, 2003), en estudios realizados en llamas, obteniendo el semen mediante el método de vagina artificial, observando semen de color blanco cristalino, mientras los colores blanco lechoso y gris que dependen de su concentración son iguales al reporte de (Lichtenwalner *et al.*, 1996); (Bravo *et al.*, 1997); (Tibary y Memon, 1999), en estudios realizados en alpacas, cuya recuperación de semen fue por medio de aspiración vaginal post copula.

Referente a los resultados en el método de electroeyaculación se tuvo el color predominante fue cristalino brillante, diferente a lo reportado por (Rodríguez, 2013), las diferencias se deberían posiblemente al criterio de evaluación de cada autor.

4.1.3 Filancia

En la tabla 14 se observa los resultados de la filancia del semen en llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, no se hallaron diferencias significativas entre métodos ($p > 0,05$).

Tabla 14. Filancia (cm) del semen en llamas colectado por electroeyaculación y vagina artificial

Método	n	Media (cm)	± D.S (cm)	C.V (%)	Max(cm)	Min(cm)
Electroeyaculación	16	3,7 a	0,64	17,33	5,0	2,8
Vagina artificial	16	3,4 a	0,58	17,13	4,5	2,1

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, utilizando el método de colección post cópula. La diferencia se debe posiblemente a la especie y método de colecta.

4.1.4 Potencial de hidrogeniones

En la tabla 15 se muestra el pH seminal en llamas colectados por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, no se hallaron diferencias significativas entre métodos ($p>0,05$).

Tabla 15. pH seminal en llamas colectados por electroeyaculación y vagina artificial

Método	n	Media	± D.S	C.V (%)	Max	Min
Electroeyaculación	16	7,0 a	0,1	1,64	7,1	6,8
Vagina artificial	16	7,0 a	0,1	1,68	7,2	6,8

Letras iguales muestran diferencias no significativas ($p>0,05$).

La media del pH colectado por el método de electroeyaculación y vagina artificial fue 7,0 son inferiores al reporte de Quispe y delgado (2012), Fowler y Bravo (1998), en estudios realizados en llamas, obteniendo el semen por ambos métodos de colecta respectivamente, observando pH de 7,7 con el método de electroeyaculación y 7,2 - 7,9 con el método de vagina artificial.

4.2 DE LAS EVALUACIONES MICROSCÓPICAS DEL SEMEN

4.2.1 MOTILIDAD ESPERMÁTICA

En la tabla 16 se muestra la motilidad espermática total en semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, sabiendo que se determinó la media de motilidad espermática total (MP y MNP), no se hallaron diferencias significativas entre métodos ($p>0,05$).

Tabla 16. Motilidad en semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación y vagina artificial

Método	n	Media (%)	± D.S (%)	C.V (%)	Max(%)	Min(%)
Electroeyaculación	16	44,9 a	19,1	42,7	82,3	13,3
Vagina artificial	16	41,6 a	18,4	44,2	83,9	16,0

Letras iguales muestran diferencias no significativas ($p>0,05$).

La media de la motilidad espermática total colectado por el método de electroeyaculación fue de $44,9 \pm 19,1$ % (MP y MNP), es mayor a los reportes de: (Casaretto *et al.*, 2011) de $38,53 \pm 28,5$ %; (Carretero *et al.*, 2009) de $35,0 \pm 17,6$ %; (Giuliano *et al.*, 2008) de $26,88 \pm 28,66$ % de espermatozoides motiles total, todos estos estudios fueron colectados por el método de electroeyaculación. Las diferencias se deberían a los animales utilizados y medio ambiente.

La media de la motilidad espermática total colectado por el método de vagina artificial fue de $41,6 \pm 18,4$ % (MP y MNP), es mayor a los reportes de: (Lichtenwalner *et al.*, 1996) de $23,7 \pm 20,0$ %; (Von y Hellemann 1998) de $25,5$ %; (Giuliano *et al.*, 2008) de $27,02 \pm 25,44$ %; y menor a los reportes de: (Aller 2001) de $54,3 \pm 10,5$ %. Estos estudios se realizaron en semen de llamas colectado por el método de vagina artificial. La diferencia se debería a la cantidad de animales utilizados.

4.2.2 CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA

En la tabla 17 se muestra la concentración espermática del semen de llamas colectados por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, se hallaron diferencias significativas entre métodos ($p < 0,05$).

Tabla 17. Concentración en semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación y vagina artificial

Método	n	Media(10^6 /ml)	\pm D.S(10^6 /ml)	C.V (%)	Max(10^6 /ml)	Min(10^6 /ml)
EE	16	97,14 b	44,22	45,53	186,5	22,5
VA	16	146,19 a	64,84	44,35	262,5	48,9

Leyenda: V.A: vagina artificial; E.E: electroeyaculación

Letras distintas muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

La media de la concentración espermática en semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación determinada en este estudio fue de $97,14 \pm 44,22$ por 10^6 /ml, es mayor al reporte de: Giuliano *et al.*, (2008) de $50,28 \pm 73,13$ por 10^6 /ml; (Carretero *et al.*, 2012) de $77,0 \pm 83,6$ por 10^6 /ml; y es menor al reporte de: (Carretero *et al.*, 2009) de $148,4 \pm 164,4$ por 10^6 /ml; (Casaretto *et al.*, 2011) de $126,62 \pm 159,2$ por 10^6 /ml; todos esos estudios fueron colectados por el método de electroeyaculación. En el cual se concluye que la concentración espermática no es una característica uniforme y estandarizada debido a que las concentraciones

espermáticas determinadas por otros autores y este estudio exponen variaciones muy grandes.

La media de la concentración espermática en semen de llamas colectado por el método de vagina artificial determinada en este estudio fue de $146,19 \pm 64,84$ por $10^6/\text{ml}$, mayor al reporte de: (Lichtenwalner *et al.*, 1996) de $1,0 \pm 0,8$ por $10^6/\text{ml}$; (Von y Hellemann 1998) de $85,0 \pm 89,0$ por $10^6/\text{ml}$; (Aller *et al.*, 2003) de $75,2 \pm 20,4$ por $10^6/\text{ml}$; (Giuliano *et al.*, 2008) de $72,79 \pm 68,96$ por $10^6/\text{ml}$, en todos estos estudios el semen fue colectado por el método de vagina artificial. Estos datos obtenidos ratifican lo mencionado por (Fernández y Novoa 1968), quienes indican que la concentración espermática es una característica muy variable.

4.3 MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

Se ha clasificado en 5 formas la cabeza de los espermatozoides de llama, para los cuales se evaluaron 8866 espermatozoides de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, los resultados se muestran en los siguientes cuadros.

4.3.1 Evaluación de la morfología espermática colectada por el método de electroeyaculación

Se trabajó con un total de 16 eyaculados colectado por el método de electroeyaculación, analizándose un total de 4 370 espermatozoides, los cuales fueron evaluados por los diferentes patrones de formas de la cabeza establecidos que son los siguientes; piriformes, normales, largos, redondos y angosto/estrecho; observándose en la tabla 18.

Tabla 18. Porcentaje de espermatozoides del semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación

Porcentaje de espermatozoides según la forma de la cabeza							
Llama	n	Piriforme	Normal	Largo	Redondo	Angosto/Estrecho	Total
1	4	1,35	11,25	44,02	8,16	35,21	100
2	4	0,49	10,80	47,75	4,05	36,91	100
3	4	1,94	22,21	48,26	11,30	16,29	100
4	4	1,90	12,35	51,87	5,33	28,55	100
Total	16	1,42	14,16	47,97	7,21	29,24	100

En la morfología de la cabeza del espermatozoide se clasificó en 5 formas la cabeza del espermatozoide de la llama, donde el porcentaje de la forma fue: 1,42 % piriforme, 14,16 % normal; 47,97 % largo; 7,21 % redondo; 29,24 % angosto inferior al reporte de (Cusiyunca, 2017) de 9,54 % piriforme, 53,97 % normal, 7,01 % redondos y superiores en las formas de 15,78 % corto angosto, 13,70 % largo. La variación se puede deber al total de espermatozoides evaluados, número de llamas y método de colecta (post copula).

4.3.2 Evaluación de la morfología espermática colectada por el método de vagina artificial

En el método de vagina artificial se trabajó con un total de 16 eyaculados, analizándose 4 496 espermatozoides de cada muestra elaborada, los cuales fueron evaluados por los diferentes patrones de formas de la cabeza establecida que son las siguientes; piriforme, normal, larga, redonda y angosto/estrecho. Los resultados se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Porcentaje de espermatozoides del semen de llamas colectado por el método de vagina artificial

Porcentaje de espermatozoides según la forma de la cabeza							
Llama	n	Piriforme	Normal	Largo	Redondo	Angosto/Estrecho	Total
1	4	0,62	21,49	46,32	6,33	25,23	100
2	4	0,33	16,43	43,70	20,88	18,66	100
3	4	1,36	20,21	48,58	3,29	26,56	100
4	4	0,54	20,46	46,92	4,29	27,79	100
Total	16	0,71	19,65	46,38	8,70	24,56	100

En la morfología de la cabeza del espermatozoide se clasificó en 5 formas la cabeza del espermatozoide de la llama, donde el porcentaje de la forma fue: 0,71% piriforme; 19,65 % normales; 46,38 % largos; 8,70 % redondos; 24.56 % angosto/estrecho. La media de los parámetros de la morfología determinadas en este trabajo son similares al reporte de (Soler *et al.*, 2013). Siendo menores los siguientes datos: 21,4 % de espermatozoides largos; 7,9 % de espermatozoides redondos; 7,0 % de espermatozoides angostos/estrechos, y mayores a los siguientes datos: 14,4 % de espermatozoides piriformes y 49,3 % de espermatozoides normales; este estudio fue

realizado en llamas mediante el método de vagina artificial en el centro experimental CICAS la Raya, la variación de datos se debería al número de animales, edad de llamas, número de espermatozoides evaluados e intervalos de colecta.

4.3.3 Evaluación de la morfología espermática colectada por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

De manera general, se trabajó con un total de 32 eyaculados colectados por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, analizándose 8 866 espermatozoides de las muestras elaboradas colectados por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, los cuales fueron evaluados por los diferentes patrones de formas de la cabeza establecida, piriforme, normal, larga, redonda y angosto/estrecho; observándose en la tabla 20.

Tabla 20. Porcentaje de espermatozoides del semen de llama colectado por ambos métodos

Porcentaje de espermatozoides según la forma							
Método	n	Piriforme	Normal	Largo	Redondo	Angosto	Total
Electroeyaculación	16	1,42	14,16	47,97	7,21	29,24	100
Vagina artificial	16	0,71	19,65	46,38	8,70	24,56	100
Total	32	1,07	16,90	47,18	7,95	26,90	100

La media de los parámetros de morfología espermática colectada por el método de electroeyaculación y vagina artificial determinadas en este estudio fue de 1,07 % de espermatozoides piriformes; 16,90 % de espermatozoides normales; 47,18 % de espermatozoides largos; 7,95 % de espermatozoides redondos y 26,90 % de espermatozoides angostos/estrechos. Siendo similares al reporte de (Soler *et al.*, 2013); Siendo menores los siguientes datos: 21,4 % de espermatozoides largos; 7,9 % de espermatozoides redondos; 7,0 % de espermatozoides angostos/estrechos, y mayores a los siguientes datos: 14,4 % de espermatozoides piriformes y 49,3 % de espermatozoides normales; este estudio fue realizado en llamas mediante el método de vagina artificial en el centro experimental CICAS la Raya, la variación de datos se debería al número y edad de llamas, número de espermatozoides evaluados e intervalos de colecta.

Por otro lado la son menores al reporte de (Cusiyunca, 2017), en los siguientes datos, 15,78 corto-agosto, 7,01 redondos y 13,70 largos; y mayores en los siguientes datos, 0,54 piriforme y 53,97 normal, este estudio fue realizado en llamas mediante el método de post copula en el centro experimental CICAS la Raya, la variación se debería a la cantidad de animales y método de colecta.

4.4 MORFOMETRIA ESPERMÁTICA

Se evaluaron un total de 8866 espermatozoides, colectados por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial.

Tabla 21. Parámetros de la morfometria en semen de llamas

Región	Parámetros	n	Media	± D.S	C.V (%)	Máx.	Min.
Cabeza	Longitud (µm)	8866	5,21	0,41	7,86	9,73	3,47
	Ancho (µm)	8866	3,17	0,27	8,66	4,30	2,07
	Área (µm ²)	8866	13,70	1,67	12,19	20,69	9,94
	Perímetro (µm)	8866	16,75	1,51	6,47	24,31	11,36
	% de Acrosoma	8866	51,19	6,47	12,64	69,22	9,73
Forma de la cabeza	Elipticidad	8866	1,65	0,16	9,84	2,98	1,00
	Rugosidad	8866	0,62	0,07	12,00	0,84	0,30
	Elongación	8866	0,24	0,05	18,60	0,50	0,00
	Regularidad	8866	0,95	0,05	4,94	1,79	0,62
Pieza intermedia P.I	Nivel de gris	8866	123,10	18,49	15,02	179,60	34,94
	Anchura (µm)	8866	1,39	0,37	26,84	5,66	0,58
	Área de P.I (µm)	8866	2,94	0,82	27,84	7,60	0,72
	Dist Inserción	8866	0,23	0,17	77,25	2,75	0,00
	Ang Inserción	8866	9,50	10,99	115,66	179,77	0,00

SDN: Sin distribución normal

La media de los parámetros de la morfometria espermática determinadas en esta investigación son menores al reporte de (Casaretto *et al.*, 2011), área de $20,09 \pm 2,75 \mu\text{m}^2$; longitud de $6,60 \pm 3,83 \mu\text{m}$; ancho de $4,14 \pm 2,78 \mu\text{m}$; perímetro de $18,54 \pm 0,47 \mu\text{m}$; elipticidad de $1,28 \pm 3,70$ y elongación de $1,59 \pm 1,02$; estudio realizado en Argentina en llamas colectadas por electroeyaculación. La diferencia se debería a que este estudio se realizó con un equipo especializado en el análisis espermático el

ISAS y los datos reportados por (Casaretto *et al.*, 2011) se realizó con un equipo no específico para la evaluación de la morfometría espermática, el Leica Microsystems Co., Wetzlar, Germany y medido con el Software QWin Plus.

4.4.1 Evaluación de la morfometría colectado por el método de electroeyaculación

Tabla 22. Parámetros de la región de la cabeza del semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación

Parámetros	Media	± D.S	C.V (%)	Max	Min
Longitud (µm)	5,23	0,39	7,54	9,46	3,85
Ancho (µm)	3,10	0,27	8,66	4,17	2,07
Área (µm ²)	13,55	1,61	11,89	20,63	7,81
Perímetro (µm)	16,61	1,43	8,64	24,31	11,83
% de Acrosoma	51,67	6,23	12,06	66,71	9,73

La media de los parámetros de la morfometría de la región de la cabeza colectada por el método de electroeyaculación determinadas en este estudio fue: longitud de 5,23 ± 0,39 µm; ancho de 3,10 ± 0,27 µm; área de 13,55 ± 1,61 µm²; perímetro de 16,61 ± 1,43 µm; porcentaje de acrosoma 51,67 ± 6,23.

La media de los parámetros de la morfometría espermática de la región de la cabeza determinadas en este trabajo son menores al reporte de (Casaretto *et al.*, 2011), área de 20,09 ± 2,75 µm²; longitud media de 6,60 ± 3,83 µm; ancho media de 4,14 ± 2,78 µm; perímetro media de 18,54 ± 0,47 µm, estudio realizado en Argentina en llamas colectadas por electroeyaculación. La diferencia se debería a que este estudio se realizó con un equipo no específico para la evaluación de la morfometría espermática, el Leica Microsystems Co., Wetzlar, Germany y medido con el Software QWin Plus.

Los parámetros de la morfometría espermática de la cabeza determinadas en este estudio son similares al reporte de (Rodríguez, 2013), longitud de 5,2 ± 0,5 µm; ancho de 3,1 ± 0,3 µm; área de 13,6 ± 1,9 µm²; perímetro 16,6 ± 2,0 µm y porcentaje de acrosoma de 46,3 ± 6,7, estudio realizado en la raya, en llamas colectados por el método de electroeyaculación. La similitud se debería a las mismas condiciones medio ambientales y al equipo especializado el ISAS.

Tabla 23. Parámetros de la región de la forma de la cabeza del semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación

Parámetros	Media	± D.S	C.V (%)	Max	Min
Elipticidad	1,70	0,16	9,55	2,97	1,14
Rugosidad	0,62	0,07	11,57	0,83	0,33
Elongación	0,26	0,04	17,06	0,50	0,07
Regularidad	0,94	0,05	5,00	1,66	0,77

La media de los parámetros de la morfometría de la región de la forma de la cabeza colectada por el método de electroeyaculación determinadas fue: elipticidad de $1,70 \pm 0,16$; rugosidad de $0,62 \pm 0,07$; elongación de $0,26 \pm 0,04$; regularidad de $0,94 \pm 0,05$.

La media de los parámetros de la morfometría espermática de la región de la forma de la cabeza determinadas en este trabajo son mayores al reporte de (Casaretto, *et al.*, 2011), elipticidad media de $1,28 \pm 3,70$ y elongación media de $1,59 \pm 1,02$; estudio realizado en Argentina en llamas colectadas por electroeyaculación. La diferencia se debería a que este estudio se realizó con un equipo especializado en el análisis espermático el ISAS y los datos reportados por (Casaretto *et al.*, 2011) se realizó con un equipo no específico para la evaluación de la morfometría espermática, el Leica Microsystems Co., Wetzlar, Germany y medido con el Software QWin Plus.

Los parámetros de la morfometría espermática de la forma de la cabeza determinadas son similares al reporte de (Rodríguez, 2013), elipticidad de $1,6 \pm 0,2$; rugosidad $0,6 \pm 0,1$; elongación $0,2 \pm 0,1$ y regularidad $0,9 \pm 0,1$, estudio realizado en la raya, en llamas colectados por el método de electroeyaculación. La similitud se debería a las mismas condiciones medio ambientales y al equipo especializado el ISAS.

Tabla 24. Parámetros de la región de la pieza intermedia del semen de llamas colectado por el método de electroeyaculación

Parámetros	Media	± D.S	C.V (%)	Max	Min
Nivel de gris (%)	119,81	20,66	17,24	170,35	34,94
Anchura (µm)	1,39	0,39	27,80	4,42	0,58
Área de P.I (µm)	2,89	0,84	29,15	7,60	0,92
Dist Inserción (µm)	0,23	0,18	78,79	2,75	0,00
Ang Inserción (µm)	10,72	12,09	112,74	177,65	0,01

La media de los parámetros de la morfometría de la región de la pieza intermedia colectada por el método de electroeyaculación determinada en este estudio fue: nivel gris de $119,81 \pm 20,66$; anchura de la pieza intermedia $1,39 \pm 0,39 \mu\text{m}$; área de pieza intermedia de $2,89 \pm 0,84 \mu\text{m}^2$; distancia de la inserción de la pieza intermedia de $0,23 \pm 0,18$; y ángulo de inserción de la pieza intermedia de $10,72 \pm 12,09$.

Los parámetros de la morfometría espermática de la pieza intermedia determinadas en este estudio son similares al reporte de (Rodríguez, 2013), nivel gris de $168,3 \pm 10,5$; anchura de la pieza intermedia de $1,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$; área de la pieza intermedia de $3,0 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$; distancia de la inserción de la pieza intermedia de $0,2 \pm 0,2$ y ángulo de inserción de la pieza intermedia de $11,0 \pm 13,5$, estudio realizado en la raya, en llamas colectados por el método de electroeyaculación. La similitud se debería a las mismas condiciones medio ambientales y al equipo especializado el ISAS.

4.4.2 Evaluación de morfometría del espermatozoide colectado por el método de Vagina Artificial

Tabla 25. Parámetros de la región de la cabeza del semen de llamas colectado con vagina artificial

Parámetros	Media	± D.S	C.V (%)	Max	Min
Longitud (µm)	5,19	0,42	8,14	5,89	3,47
Ancho (µm)	3,23	0,26	8,17	4,30	2,11
Área (µm ²)	13,84	1,71	12,37	20,69	6,86
Perímetro (µm)	16,89	1,57	9,30	23,81	11,36
% de Acrosoma	50,72	6,67	13,14	69,22	13,13

La media de los parámetros de la morfometría de la región de la cabeza colectada por el método de vagina artificial determinadas en este estudio fue: longitud de $5,19 \pm 0,42 \mu\text{m}$; ancho de $3,23 \pm 0,26 \mu\text{m}$; área de $13,84 \pm 1,71 \mu\text{m}^2$; perímetro de $16,89 \pm 1,57 \mu\text{m}$; porcentaje de acrosoma $50,72 \pm 6,67$.

La media de los parámetros de la morfometría espermática de la región de la cabeza determinadas en este trabajo son mayores al reporte de (Soler *et al.*, 2014), área $13,7 \pm 2,8 \mu\text{m}^2$; perímetro $14,1 \pm 1,6 \mu\text{m}$; longitud $5,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$; ancho $3,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$; similares al reporte de (Soler *et al.*, 2013), siendo mayor los datos de longitud de $5,51 \pm 0,69 \mu\text{m}$ y ancho de $3,38 \pm 0,42 \mu\text{m}$, y menores los siguientes datos, área de $13,75 \pm 2,82 \mu\text{m}^2$ y perímetro de $14,80 \pm 1,60 \mu\text{m}$, cuyos estudios fueron realizados por el método de vagina artificial en el centro experimental cicas la raya. La variación se debería al número de animales utilizados.

Tabla 26. Parámetros de la región de la forma de la cabeza del semen de llamas colectado por el método de vagina artificial

Parámetros	Media	\pm D.S	C.V (%)	Max	Min
Elipticidad	1,61	0,15	9,44	2,98	1,00
Rugosidad	0,61	0,08	12,38	0,84	0,30
Elongación	0,23	0,04	18,86	0,50	0,00
Regularidad	0,95	0,05	4,81	1,79	0,62

La media de los parámetros de la morfometría de la región de la forma de la cabeza colectada por el método de vagina artificial determinadas fue: elipticidad de $1,61 \pm 0,15$; rugosidad de $0,61 \pm 0,08$; elongación de $0,23 \pm 0,04$; regularidad de $0,95 \pm 0,05$.

La media de los parámetros de la morfometría espermática de la región de la cabeza determinadas en este trabajo son similares al reporte de (Soler *et al.*, 2014), rugosidad $0,9 \pm 0,1$; regularidad $1,1 \pm 0,1$; elipticidad $0,2 \pm 0,1$; similares al reporte de (Soler *et al.*, 2013), elipticidad de $0,24 \pm 0,06$, rugosidad de $0,87 \pm 0,06$ y regularidad de $1,07 \pm 0,06$, cuyos estudios fueron realizados por el método de vagina artificial en el centro experimental cicas la raya.

La media de los parámetros de la morfometría espermática de la región de la cabeza determinadas en este trabajo son menores al reporte de (Cusiyunca, 2017), rugosidad $0,65 \pm 0,06$; regularidad $0,96 \pm 0,04$ $1,1 \pm 0,1$; elipticidad $1,81 \pm 0,22$ y elongación $0,28 \pm 0,06$, cuyos estudios fueron realizado en llamas, en el centro experimental CICAS la Raya, la variación posiblemente se debería al método de colecta (post copula) y número de animales.

Tabla 27. Parámetros de la región de la pieza intermedia del semen de llamas colectado por el método de vagina artificial

Parámetros	Media	± D.S	C.V (%)	Max	Min
Nivel de gris	126,30	15,45	12,23	179,60	70,10
Anchura (µm)	1,40	0,36	25,88	5,66	0,58
Área de P.I (µm)	2,99	0,79	26,48	7,10	0,72
Dist Inserción	0,22	0,17	75,66	2,10	0,00
Ang Inserción	8,31	9,65	116,14	179,77	0,00

La media de los parámetros de la morfometría de la región de la pieza intermedia colectada por el método de vagina artificial determinada en este estudio fue: nivel gris de $126,30 \pm 15,45$; anchura de la pieza intermedia $1,40 \pm 0,36$ µm; área de pieza intermedia de $2,99 \pm 0,79$ µm²; distancia de la inserción de la pieza intermedia de $0,22 \pm 0,17$; y ángulo de inserción de la pieza intermedia de $8,31 \pm 9,65$.

No se encontraron reportes colectado por vagina artificial, los parámetros de la morfometría espermática de la pieza intermedia determinadas en este estudio son similares al reporte de (Rodríguez, 2013), nivel gris de $168,3 \pm 10,5$; anchura de la pieza intermedia de $1,4 \pm 0,4$ µm; área de la pieza intermedia de $3,0 \pm 0,7$ µm²; distancia de la inserción de la pieza intermedia de $0,2 \pm 0,2$ y ángulo de inserción de la pieza intermedia de $11,0 \pm 13,5$, estudio realizado en la raya, en llamas colectados por el método de electroeyaculación. La similitud se debería a las mismas condiciones medio ambientales y al equipo especializado el ISAS.

4.4.3 Evaluación de morfometría del espermatozoide colectado por los métodos electroeyaculación y vagina artificial

En la tabla 28, se muestra los parámetros de la región de la cabeza colectada por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial; para los parámetros de longitud y porcentaje de acrosoma se hallaron diferencias altamente significativas entre métodos ($p < 0,01$), para los parámetros de ancho, área y perímetro también se hallaron diferencias altamente significativas entre métodos ($p < 0,01$).

Tabla 28. Parámetros de la región de la cabeza del semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Parámetros	Electroeyaculación	Vagina artificial
Longitud (μm)	5,23 a	5,19 b
Ancho (μm)	3,10 b	3,23 a
Área (μm^2)	13,55 b	13,84 a
Perímetro (μm)	16,60 b	16,89 a
% de Acrosoma	51,67 a	50,72 b

Letras distintas muestran diferencias significativas ($p < 0,01$)

La media de los parámetros de la morfometría de la región de la cabeza determinadas en este estudio son similares al reporte de (Rodríguez, 2013), longitud de $5,2 \pm 0,5 \mu\text{m}$; ancho de $3,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$; área de $13,6 \pm 1,9 \mu\text{m}^2$; perímetro $16,6 \pm 2,0 \mu\text{m}$ y porcentaje de acrosoma de $46,3 \pm 6,7$, estudio realizado en la raya, en llamas colectados por el método de electroeyaculación. La similitud se debería a las mismas condiciones medio ambientales y al equipo especializado el ISAS.

La media de los parámetros de la morfometría de la región de la cabeza determinadas en este estudio es menor al reporte de (Cusiyunca, 2017), longitud de $5,98 \pm 0,54 \mu\text{m}$, ancho de $3,33 \pm 0,29 \mu\text{m}$, área de $16,17 \pm 2,00 \mu\text{m}^2$ y perímetro de $17,68 \pm 1,38 \mu\text{m}$, cuyo estudio se realizó en llamas, en el centro experimental CICAS la Raya, la variación se debería al número de animales y método del colecta.

En la tabla 29 se muestran los parámetros de la región de la forma de la cabeza donde se hallaron diferencias altamente significativas entre métodos ($p < 0,01$).

Tabla 29. Parámetros de la región de la forma de la cabeza del semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Parámetros	Electroeyaculación	Vagina artificial
Elipticidad	1,70 a	1,61 b
Rugosidad	2,26 a	0,61 b
Elongación	0,26 a	0,23 b
Regularidad	0,94 b	0,95 a

Letras distintas muestran diferencias significativas ($p < 0,01$)

Los parámetros de la morfometría espermática de la forma de la cabeza determinadas son similares al reporte de (Rodríguez, 2013), elipticidad de $1,6 \pm 0,2$; rugosidad $0,6 \pm 0,1$; elongación $0,2 \pm 0,1$ y regularidad $0,9 \pm 0,1$, estudio realizado en la raya, en llamas colectados por el método de electroeyaculación. La similitud se debería a las mismas condiciones medio ambientales y al equipo especializado el ISAS.

La media de los parámetros de la morfometría espermática de la región de la cabeza determinadas en este trabajo son similares al reporte de (Soler *et al.*, 2014), rugosidad $0,9 \pm 0,1$; regularidad $1,1 \pm 0,1$; elipticidad $0,2 \pm 0,1$; similares al reporte de (Soler *et al.*, 2013), elipticidad de $0,24 \pm 0,06$, rugosidad de $0,87 \pm 0,06$ y regularidad de $1,07 \pm 0,06$, cuyos estudios fueron realizados por el método de vagina artificial en el centro experimental cicas la raya.

En la tabla 30, se muestran los parámetros de la región de la pieza intermedia, donde se hallaron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) en los parámetros de nivel gris, anchura, área de la pieza intermedia y ángulo de inserción; por otro lado no se hallaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el parámetro de distancia de inserción.

Tabla 30. Parámetros de la región de la pieza intermedia del semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Parámetros	Electroeyaculación	Vagina artificial
Nivel de gris (%)	119,81 b	126,30 a
Anchura (μm)	1,39 b	1,40 a
Área de P.I (μm)	2,89 b	2,99 a
Dist Inserción(μm)	0,23 a	0,22 a
Ang Inserción (μm)	10,72 a	8,31 b

Letras iguales muestran diferencias no significativas ($>0,05$)

Los parámetros de la morfometría espermática de la pieza intermedia determinadas en este estudio son similares al reporte de (Rodríguez, 2013), nivel gris de $168,3 \pm 10,5$; anchura de la pieza intermedia de $1,4 \pm 0,4 \mu\text{m}$; área de la pieza intermedia de $3,0 \pm 0,7 \mu\text{m}^2$; distancia de la inserción de la pieza intermedia de $0,2 \pm 0,2$ y ángulo de inserción de la pieza intermedia de $11,0 \pm 13,5$, estudio realizado en la raya, en llamas colectados por el método de electroeyaculación. La similitud se debería a las mismas condiciones medio ambientales y al equipo especializado el ISAS.

4.5 IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS

4.5.1 VARIABLES UTILIZADAS

Para la identificación de subpoblaciones espermáticas se evaluaron 8866 espermatozoides colectados por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, para ello se siguió el criterio de elegir aquellos con un auto valor y porcentaje acumulado. Esto se realizó como primer paso para conocer las subpoblaciones espermáticas, para ello se tomó el criterio de escoger el coeficiente de determinación o R^2 más alto. En el resultado del análisis de principales componentes elaborado con los datos de análisis de espermias procesados por el programa PRINCOM, se obtuvo lo siguiente:

Tabla 31. Resultado del análisis principal de componentes realizado en los datos de análisis de esperma

n	Variable	AUTO VALOR	ACUMULADA
PRIN 1	Largo	2,92	0,32
PRIN 2	Ancho	2,46	0,60
PRIN 3	Área	1,21	0,73
PRIN 4	Perímetro	1,01	0,84
PRIN 5	Acrosoma	0,85	0,94

4.5.2 DETERMINACION DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS

Para el resultado de las subpoblaciones espermáticas los datos de espermas se procesaron con el programa FASTCLUS, donde se evaluó 8866 espermatozoides, donde se identificaron 3 subpoblaciones.

Subpoblación 1: constituida por espermatozoides con parámetros de la cabeza, (largo de $5,24 \pm 0,48 \mu\text{m}$; ancho de $3,18 \pm 0,33 \mu\text{m}$; área de $13,66 \pm 2,10 \mu\text{m}^2$; perímetro de $16,23 \pm 1,62 \mu\text{m}$ y porcentaje de acrosoma de $38,78 \pm 4,53$), del total de espermatozoides, el 11,19 % fue asignada a esta población. Esta subpoblación con los resultados de morfometría es calificada como normales.

Subpoblación 2: constituida por espermatozoides con parámetros de la región de la cabeza, (largo de $5,20 \pm 0,39 \mu\text{m}$; ancho de $3,15 \pm 0,27 \mu\text{m}$; área de $13,54 \pm 1,62 \mu\text{m}^2$; perímetro de $16,50 \pm 1,40 \mu\text{m}$ y porcentaje de acrosoma de $48,77 \pm 2,51$), del total de espermatozoides, el 43,40 % fue asignada a esta población. Esta subpoblación con los resultados de morfometría es calificada como microcefálicos.

Subpoblación 3: constituida por espermatozoides con parámetros de la cabeza, (largo de $5,21 \pm 0,41 \mu\text{m}$; ancho de $3,19 \pm 1,58 \mu\text{m}$; área de $13,86 \pm 1,58 \mu\text{m}^2$; perímetro de $17,12 \pm 1,52 \mu\text{m}$ y porcentaje de acrosoma de $56,56 \pm 2,97$), del total de espermatozoides, el 45,41 % fue asignada a esta población. Esta subpoblación con los resultados de morfometría es calificada como macrocefálicos.

Tabla 32. Numero de subpoblaciones espermáticas y parámetros de morfometría obtenidos del semen de llama colectado por ambos métodos

Parámetros de morfometria	Subpoblaciones de espermatozoides		
	1	2	3
n de espermas	992	3848	4026
Porcentaje	11.19 %	43.40 %	45.41 %
Largo	5,24±0,48	5,20 ± 0,39	5,21 ± 0,41
Ancho	3,18±0,33	3,15 ± 0,27	3,19 ± 1,58
Área	13,66±2,10	13,54 ± 1,62	13,86 ± 1,58
Perímetro	16,23±1,62	16,50 ± 1,40	17,12 ± 1,52
Acrosoma	38,78±4,53	48,77 ± 2,51	56,56 ± 2,97

No existen reportes acerca de subpoblaciones espermáticas morfométricos en camélidos sudamericanos, pero si se hicieron estudios utilizando semen fresco como el presente trabajo en otras especies con resultados similares tales como: (Meza, 2014); (Quinteno *et al.*, 2003) y (Abaigar *et al.*, 1999), en alpacas, porcinos y Mono titi, reportando 3 subpoblaciones respectivamente; en subpoblaciones espermáticas de motilidad; por otro lado en subpoblaciones morfométricos tales como: (Maroto 2012); (Morales *et al.*, 2012); (Esteso, 2006); (Nava y Quinteno, 2013) en ovinos, cerdos, ciervo iberico y bovino, reportando en ovinos 4 y las demás especies 3 subpoblaciones espermáticas.

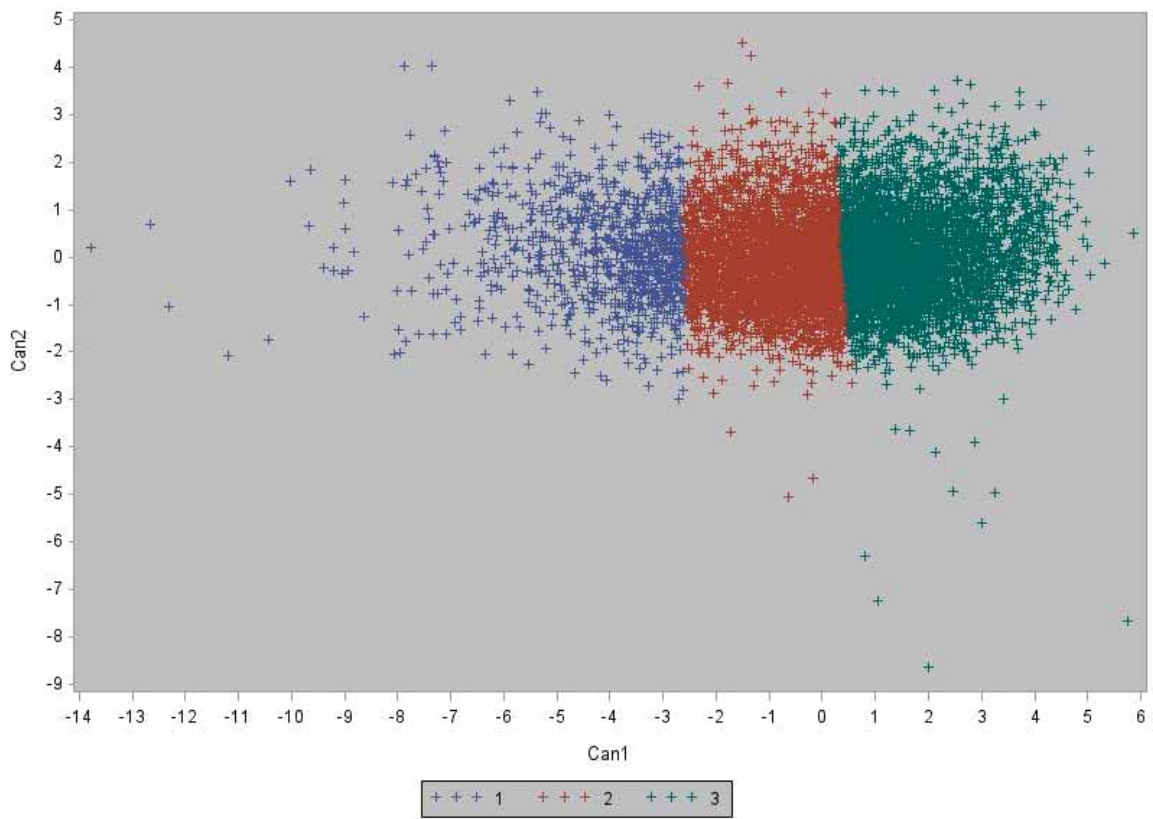


Grafico 1. Identificación de subpoblaciones espermáticas

CAPITULO V

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones del presente trabajo de investigación se concluye lo siguiente:

1. En las características macroscópicas del semen de llama se halló diferencias significativas ($p < 0,01$) para el volumen, siendo el método por vagina artificial mayor frente al método por electroeyaculación. Para las características microscópicas del semen de llama se halló diferencias significativas ($p < 0,05$) para la concentración, siendo el método de vagina artificial mayor frente al método electroeyaculación. No se halló diferencias significativas ($p > 0,05$) para el pH, filancia y motilidad entre métodos de colecta.
2. Para la morfología del espermatozoide del semen de llama se halló que existe mayor porcentaje en espermatozoides de forma larga con un 47,18%, angosto de 26,90 %, normal de 16,90%, redondo de 7,95% y piriforme de 1,07%.
3. Se obtuvo parámetros de morfométricos donde se halló diferencias altamente significativas entre métodos ($p < 0,01$), para los parámetros de ancho, área y perímetro, Elipticidad, rugosidad, elongación, regularidad, nivel gris, anchura, área de la pieza intermedia y ángulo de inserción; por otro lado no se hallaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el parámetro de distancia de inserción.
4. Se identificó las subpoblaciones espermáticas en semen de llama, hallándose que el largo, ancho, área, perímetro y acrosoma explican el 85% de varianza de los componentes principales, e identificándose 3 SPE en función a los parámetros de morfometría de los espermatozoides de llama.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda el uso del método de vagina artificial para la conservación de semen, puesto que fue más efectivo al proporcionar mayor porcentaje de volumen y concentración.
2. Se recomienda realizar trabajos complementarios a este estudio, donde se determine todas las características microscópicas en el semen fresco y crio preservado de llamas.
3. Se recomienda realizar trabajos de inseminación artificial en llamas, obteniendo semen por el método de vagina artificial.
4. Contrastar los parámetros de morfometría reportados en este estudio con trabajos futuros, realizando inseminaciones tanto con semen fresco y crio preservado y determinar la tasa de preñez en función a la morfología y morfometría.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

- Abaigar, T., Holt, W., Harrison, R., & Del Barrio, G. (1999). Sperm subpopulation in boar (sub scrofa) and gazelle (Gazella dama mhorr) semen as revealed by patten analysis of computer-assisted motility assessments. . *Biol. Reproduction.*, 60: 32-41.
- Adam, G., & Ratto, M. (2001). Reproductive biotechnology in South American camelids. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.*, 1: 134-141.
- Aller, J. (2001). Cryopreservation of semen aand artificial insemination in South American camelids. *Internacional Foundation for Sciences Final Report.*
- 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). *Arch. de Zootecnia*, 152:15-23.
- Balliache, D. (2009). *Universidad Nacional de san Juan*. Obtenido de http://www.unsj.edu.ar/unsjVirtual/comunicacion/seminarionuevastecnologias/wp-content/uploads/2015/06/01_Planteo-del-problema_SI.pdf.
- Bearden, J., & Fuquay, J. (1982). Reproducción Animal Aplicada. *El manual moderno* S.A, Mexico.
- Bourke, D., Kyle, C., McEvoy, T., Young, P., & Adam, C. (1995). Advanced reproductive techologies in South American camelids. *En: Proceeding II European Symposium South American camelids.*, 235-243.
- Bravo, P., Flores, U., Garnica, J., & Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology.*, 47: 619-626.
- Bravo, P., Fowler, M., Stabenfeldt, G., Lasley, B., & Frey, R. (1992). Testis growth and testosterone concentrations in the male llama. *En: Resumenes 12th ICAR, La Haya, Paises bajos.*, 3: 789.

- Buendia, P., Soler, C., Paolicchi, F., Gago, G., & Urquieta, B. (2002). Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm Class Analyzer Computer Assisted System. España.
- Calderón, W., Sumar, J., & Franco, E. (1968). Avances en la inseminación artificial de las alpacas (Lama pacos). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Mayor Nacional San Marcos- Lima*, 22: 19-35.
- Carretero, M., Giuliano, S. M., Casaretto, C. I., Gambarotta, M. C, & Neild. D., M. (2009). *Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina*. Argentina.: *Invet* 11(1): 55-63.
- Carretero, M., Lombardo, D., Giuliano, S., Gambarotta, M., & Neild, D. (2012). Evaluación de la fragmentación del ADN espermático de llamas (Lama glama) utilizando el test dispersión de la cromatina espermática. *Anim. Reprod. Sci.*, 131: 63-71. *Argentina*.
- Casaretto, C., Lombardo, D., Giuliano, S., Gambarotta, M., Carretero, M., & Miragaya, M. (2011). Morphometric Analysis of llama (Lama glama) Sperm head. Cátedra de Teriogenealogia, UBA-Argentina.
- Ccalta Hanco, R. (2017). Efecto de la adición del colesterol en la criopreservación de semen de alpaca (vicugna pacos). Tesis. *Escuela Profesional de Zootecnia. Facultad de Ciencias Agrarias -Cusco*.
- Ccoiso Aguila, R. (2018). Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas (Lama glama). Tesis. *Facultad de ciencias agrarias. Escuela Profesional de zootecnia*.
- Cusiyunca, P. E. (2017). Características morfométricas y morfológicas de la cabeza del espermatozoide de la llama (Lama glama) usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS.) Tesis. *Escuela Profesional de Zootecnia. Facultad de Ciencias Agrarias-Cusco*.
- Dávalos, R., Olazabal, J., & Echevarria, L. (1999). Avances en la evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Resúmenes II Congreso Mundial sobre Camelidos, Cusco.*, 74.

- Davis, R., & Gravance, C. (1993). Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis. *Fertil Steril*, 59: 412–417.
- Davis, R., & Siemers, R. (1995). Derivation and reliability of kinematics measures of sperm motion. *Reprod. Fertil Dev.*, 7: 857-869.
- Dehlon, G., & Von Lawzewitch, I. (1987). Reproduction in the male llama (*Lama glama*) a South American camelid: I. *Spermatogenesis and organization of the intertubular space on the mature testis.*, *Acta Anatomica*. 129: 59-66.
- Dehlon, G., & von Lawzewitsch, I. (1994). Ductus epididymis compartment and morphology of epididymal spermatozoa in llamas. *Anatomia Histologia Embryologia.*, 23: 217-225.
- Derivaux, J. (1982). Reproducción de animales domesticos. 2da. Ed. Edit. Acribia Zaragoza-España.
- Director, A., Giuliano, S., Trasorras, V., Carretero, I., Pinto, M., & Miragaya, M. (2007). Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research*. 14(2): 203-206. Argentina.
- Esteso, M. (2006). *Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides del ciervo. Relaciones con congelación y calidad del semen.* Ronda de toledo-Madrid.: CSIC-UCLM-Instituto de investigación en Recursos Cinegeneticos (IREC).
- Evangelista Vargas, O. D. (2015). *Caracterización morfométrica de los espermatozoides en alpaca macho (Vicugna pacos) de fertilidad comprobada.* Lima-Perú.
- Fernandez Baca, S. (Junio, 2005). *Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú.* Peru: Oficial de Salud Animal FAO/RLC.
- Fernandez, B. S., & Calderon, M. (1966). Método de colección de semen de la alpaca, *Rev. Fac. Med. Vet., Univ. Nac. M. San Marcos. Perú*, 18 (20): 13-26.
- Fernandez, B. S., & Novoa, C. (1968). Primer ensayo de inseminación Artificial en Alpacas (*Lama pacos*) con semen de Vicuña (*vicugna vicugna*). *Revista. Med. Vet. UNMSM-Perú*, 22. 9-17.

- Fowler, M. (1989). *Medicine and Surgery of South American camelids:llama, alpaca, vicuña, guanaco*. Iowa state University Press, Iowa.
- Fowler, M. E., & Bravo, P. (1998). Reproduction. En: Fowler ME, *Medicine and surgery of South American camelids. 2dnd edition. Iowa State University Press. Iowa*.
- Franco, J., Sumar, J., & Valera, M. (1981). *Eyaculación en la alpaca (lama pacos) IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Corporación Nacional Forestal. Instituto de la Patagonia. Punta Arenas – Chile*.
- Galindo, M. (1995). *Efecto de las Eyaculaciones Sucesivas Sobre las Características del Semen de la Alpaca. Tesis. Puno. Perú. : FMVZ-UNA*.
- Garnica, J., Achata, R., & Bravo, P. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science.*, 32: 85-90.
- Giuliano, S., Bisiau, C., & Carretero, M. (2012). Use of Coomassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. *Preliminary results. Invet*, 14(1): 279.
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., & Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics using colagenasa. *Animal Reproduction Science*.
- Gonzáles, V., Copa, S., & Ochoa, R. (2003). *Efecto de la bulbouretrectomia y la periodicidad de colección en las características macroscópicas y microscópicas del eyaculado en llamasde tres edades. III Congreso Mundial sobre Camelidos Potosí. Tomo II: 743-746*.
- Hafez, E. (1989). *Reproducción e inseminación Artificial en animales. 5° Edición-Nueva Editorial Interamericana-Mexico*.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., & Dorado, J. (2006). Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. España. *Theriogenology.*, 66: 996–1003.
- Holt, W. (1996). Can we predict fertility rates. Making sense of sperm motility. *Reprod. Dom. Anim.* 31, 17–24.
- Jakso, D., Lein, D., & Foote, R. (1990). Determination of the relationship between sperm morphologic classification and fertility in stallions.

- Johnson, L. W. (1989). Llama Reproduction. En: Johnson LW (ed) Llama medicine. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice WB Saunders Philadelphia.*, 5: 159-182.
- Leyva, V., Sumar, J., & Franco, E. (1984). Estudio preliminar de la concentración de espermatozoides de semen de alpaca obtenido con vagina artificial (Preliminary study of alpaca semen). *En resúmenes de la VIII Reunión Científica Anual del APPA. Huancayo- Perú*, 35.
- Lichtenwalner, A. B., Woods, G. L., & Weber, J. A. (1996). Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology.*, 46: 293-305.
- Maroto Morales, A. (2012). *Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino manchego (Ovis aries). Relación con la fertilidad.* Universidad de Castilla-La Mancha. Albacete. España.: Tesis doctoral. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos.
- Martí, J., Aparicio, I., & García, H. (2011). Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. *Theriogenology. España*, 75: 473-481.
- McEvoy, T. G., Bourke, D., & Adam, C. (1994). Recent advances in understanding and controlling the reproductive biology of South American camelids. *En: Proceeding Assisted Reproductive Technology and Andrology Meeting, Spain.*, 5: 277-298.
- McEvoy, T., Kyle, C., Slater, D., Adam, C., & Bourke, D. (1992). Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *Journal of Reproduction and Fertility.*, 9: 48.
- Menkveld, R. (2007). The basic semen analysis. Chapter 9. *In: Oehninger S, Kruger TF (eds). Male Infertility. Diagnosis and treatment. Oxon, UK: Informa Healthcare.*, 141–170.
- Menkveld, Stander, T., Kotze, T., Kruger, & Van Zyl, J. (1990). The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction* 5, 586-92.

- 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.
- Mogrovejo, D. (1952). Estudio del semen de la alpaca. *Tesis Bachiller Fac. Med. Vet. UNMSM. Lima-Perú.*, 28.
- Montalvo, C., Cevallos, E., & Copaira, M. (1979). Estudio microscópico del parenquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. *Proyectos de investigación, Periodo 1975-1979. Univ. Mayor San Marcos, Lima.*, 37.
- Morales, B., Quinteno, M. A., Osorio, M. C., & Rubio, G. J. (2012). *Valoración de la biometría de la cabeza del espermatozoide mediante análisis computarizado en semen de cerdo recién colectado y refrigerado*. Argentina.: Revista de la Facultad de Agronomía 29 (3).
- Morton, K. (2010). Quality parameters for alpaca (*vicugna pacos*) semen are affected by semen procedure. . *Reproduction in domestic animals*, 637-645.
- Municipalidad distrital de Marangani*. (14 de Diciembre de 2018). Obtenido de maranganinmc.blogspot.com/2016/03/marangani-histori-el-distrito-fue.html?m=1
- Nava, T. H., & Quinteno, M. A. (2013). *Los espermatozoides bovinos con cromatina alterada están distribuidos morfométricamente en distintas subpoblaciones*. Venezuela: XV Jornadas sobre producción animal) Tomo I, 419-421.
- Novoa, C., Fernandez, B. S., Sumar, J., & Leyva, V. (1972). Pubertad en la alpaca. *Rev. Inv. Fertility.*, 1: 29-35.
- Ordoñez, C., Cucho, H., Ampuero, E., Antezana, W., & Cayo, S. (2013). *Inseminación artificial de alpacas con semen fresco refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación*. *Spermova* 3(1): 65-66.
- Osorio, E., & San Martín, M. (1966). Aspecto histológico del epididimo, conducto deferente y glándulas sexuales accesorias del aparato reproductor masculino de la alpaca (*Lama glama pacos*). *Archivos Instituto Biología Andina.*, 1: 128-141.

- Pacheco, J. (2008). REDVET, vol IX, nº 4. En *Metodos de coleccion de semen en camelidos sudamericanos* (págs. 1-17).
- Quinteno, M. A., Miro, J., Rigau, T., & Rodriguez, G. (2003). *Identification of sperm subpopulation with specific motility characteristics in stallion ejaculates*. Theriology 59 (9).
- Quispe, C. H., & Delgado, P. A. (2012). *Desarrollo de tres protocolos de colección de semen en llamas (lama glama)*. Arica. pg. 157: En: Resumen VI Congreso Mundial de Camelidos Sudamericanos.
- Rivera García, P. (1998). Marco Teorico, elemento fundamental en el proceso de investigación científica. *Topico de investigación y posgrado*.
- Rodríguez, C. M. (2013). *Índice de Fragmentación del ADN Espermático y Test de HOS en semen de llamas (Lama glama) utilizando el Integrated Sperm Analysis*. Tesis. Escuela Profesional de Zootecnia. Facultad de Ciencias Agrarias. Cusco.
- Salisbury, G., & Vandermark, L. (1982). Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los bóvinos. Editorial Acribia. S.A. Zaragoza. España.
- San Miguel. (2008). *Evaluacion de la morfometria testicular y la concentración espermatica por edad (2-4 y de 4-6 años) en llamas (lama glama) en el barrio igshagua, parroquia Juan Montalvo, Latacunga- Ecuador*. 2008: LATACUNGA/UTC/.
- Smith, B. (1999). *Overview of reproduction in the male llama and alpaca*. En: *Proceedings of the Society for Theriogenology*. 191-216.
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A., Fernández, M., & Nuñez, J. (2005). Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS. *Theriogenology*. España., 64: 1236–1243.
- Soler, C., Sancho, M., García, A., Fuentes, M., Núñez, J., & Cucho, H. (2013). Ejaculate Fractioning Effect on Llama Sperm Head Morphometry as Assessed by the ISAS CASA system. *Reproduction in Domestic Animals*.

- Soler, C., Sancho, M., García, A., Núñez, J., Parráquez, V., Contell, J., & Obregón, B. E. (2014). Llama and alpaca comparative sperm head morphometric analysis. *Soler et al./Journal of Camelid Science.*, 7: 48–58.
- Souza, T. (2009). *Tesis Magister Scientiae. Universidad Federal de Viçosa. Viçosa. Brasil.*
- Sumar, J. (1983). Studies on reproductive pathology in alpacas. MS Thesis Department of Obstetrics and Gynaecology, College of Veterinary Medicine, Swedish University of Agriculture and Science. Uppsala, 9-103.
- Sumar, J. (1985). Reproductive Physiology in South American Camelids. Genetics of Reproduction in Sheep. Veterinary Institute for Tropical and High Altitude Research. IVITA, San Marcos, Lima.
- Sumar, J. (1991). *Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos.* En: FAO, Oficina de la FAO para América Latina y el Caribe.
- Sumar, J. (2000). Llamas y Alpacas. En: Reproducción e inseminación artificial. Editado por E.S.E. Hafez. McGraw - Hill Interamericana. Séptima Edición .
- Sumar, J., & Leyva, V. (1981). Colección de semen mediante Vagina Artificial en la alpaca (*Lama pacos*). *IV convención Internacional sobre Camelidos Sudamericanos.*
- Tapia, P. (2015). *Universidad Tecnica de Cotopaxi.* Obtenido de <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/2861>
- Tibary, A., & Memon, M. (1999). Reproduction in the male South American Camelidae. *Journal of Camel Practice and Research.*, 6: 235-248.
- Von Baer, A., & Helleman, C. (1998). *Semen characteristics in the llama (Lama glama).* Archivos de Medicina Veterinaria. 30:171-176.
- Wheeler, J. (1984b). *La domesticación de la alpaca (Lama pacos) y la llama (Lama glama) y el desarrollo temprano de la ganadería autóctona en los Andes Centrales.* Boletín de Lima 36: 74-84.

WHO, W. H. (1999). *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction* . Cambridge, UK : Cambridge University Press.

ANEXOS

Anexo 1. Tabla del ANVA para el volumen de semen en llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	103,68	103,680	163,12	<,01
animal	6	17,245	2,874	4,52	0,43
colecta	3	1,363	0,454	0,71	0,55
metodo*animal	0	0,000	.	.	.

C.V=14,33

Anexo 2. Tabla del ANVA de la filancia en semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	0,781	0,781	2,52	0,12
Animal	6	3,103	0,517	1,67	0,17
Colecta	3	1,652	0,550	1,78	0,18
método*animal	0	0,000	.	.	.

C.V=15,67

Anexo 3. Tabla del ANVA para el pH en semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	0,001	0,001	0,08	0,77
animal	6	0,067	0,011	0,72	0,63
colecta	3	0,013	0,004	0,30	0,82
método*animal	0	0,000	.	.	.

C.V=1,77

Anexo 4. Tabla del ANVA para la motilidad en semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	86,790	86,790	0,22	0,64
animal	6	1 466,296	244,382	0,61	0,72
colecta	3	674,563	224,854	0,56	0,64
método*animal	0	0,000	.	.	.

C.V=46,35

Anexo 5. Tabla del ANVA para la concentración en semen de llamas colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	19 250,163	19 250,163	6,22	0,02
animal	6	1 9727,885	3 287,980	1,06	0,41
colecta	3	7 649,242	2 549,747	0,82	0,49
método*animal	0	0,000	.	.	.

C.V=45,73

Anexo 6. Tabla del ANVA para el parámetro de longitud en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	4,824	4,824	29,86	<,01
animal	6	50,913	8,485	52,51	<,01
colecta	3	1,376	0,458	2,84	0,03
método*animal	0	0,000	.	.	.

C.V=7,71

Anexo 7. Tabla del ANVA para el parámetro de ancho en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	38,487	38,487	591,99	<.01
animal	6	52,666	8,777	135,01	<.01
colecta	3	0,821	0,273	4,21	0,05
método*animal	0	0,000	.	.	.

C.V=8,04 Pr > Chi-cuadrado <.01

Anexo 8. Tabla del ANVA para el parámetro de área en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	182,248	182,248	70,42	<.01
animal	6	1570,486	261,747	101,14	<.01
colecta	3	27,663	9,221	3,56	0,02
método*animal	0	0,000	.	.	.

C.V=11,74 Pr > Chi-cuadrado <.01

Anexo 9. Tabla del ANVA para el parámetro de perímetro en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	190,410	190,410	90,19	<.01
animal	6	1 623,818	270,636	128,19	<.01
colecta	3	29,595	9,865	4,67	0,03
método*animal	0	0,000	.	.	.

C.V=8,67

Anexo 10. Tabla del ANVA para el parámetro de % de acrosoma en semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
método	1	1 991,871	1 991,871	49,62	<,01
animal	6	1 2295,461	2 049,243	51,05	<,01
colecta	3	1 648,818	549,606	13,69	<,01
método*animal	0	0, 000	.	.	.

C.V=12,37 Pr > Chi-cuadrado <,01

Anexo 11. Tabla del procedimiento PRINCOMP en semen de llamas colectadas por electroeyaculación y vagina artificial

Procedimiento PRINCOMP

Observaciones	8 866
Variables	9

Estadísticos simples					
	Largo(μm)	Ancho(μm)	Área(μm ²)	Perímetro(μm)	Acrosoma%
Media	5,210	3,169	13,696	16,750	51,189
D.S. (μm)	0,410	0,274	1,669	1,521	6,472

Autovalores de la matriz de correlación				
	Autovalor	Diferencia	Proporción	Acumulada
1	2,919	0,460	0,324	0,32
2	2,458	1,253	0,273	0,59
3	1,205	0,194	0,133	0,73
4	1,011	0,161	0,112	0,84

Autovalores de la matriz de correlación				
	Autovalor	Diferencia	Proporción	Acumulada
5	0,849	0,528	0,094	0,94
6	0,321	0,134	0,035	0,97
7	0,187	0,161	0,020	0,99
8	0,025	0,003	0,002	0,99
9	0,022		0,002	1,00

Anexo 12. Tabla del procedimiento FASTCLUS del semen de llama colectado por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial

Procedimiento FASTCLUS

Replace=FULL Radius=0 Maxclusters=3 Maxiter=10 Convergence=0.02

Semillas iniciales					
Cluster	Largo(μm)	Ancho(μm)	Área(μm)	Perímetro(μm^2)	Acrosoma%
1	5,500	3,000	13,300	15,20	9,70
2	5,700	3,800	18,000	19,70	39,20
3	4,600	3,700	14,400	16,90	69,20

Resumen de conglomerados						
Clúster	Frecuencia	Desviación estándar RMS	Distancia máxima de la semilla a la observación	Radio sobrepasado	Conglomerado más próximo	Distancia entre Centroides del cluster
1	992	2,363	28,755		2	10,002
2	3 848	1,489	8,871		3	7,812
3	4 026	1,666	17,017		2	7,812

R-cuadrado general aproximado esperado = 0,78

Procedimiento FASTCLUS

Replace=FULL Radius=0 Maxclusters=4 Maxiter=10 Convergence=0,02

Semillas iniciales					
Clúster	Largo(μm)	Ancho(μm)	Área(μm^2)	Perímetro(μm)	Acrosoma%
1	5,500	3,500	15,600	0,200	57,100
2	6,100	3,900	20,400	18,700	35,400
3	5,300	3,300	13,700	23,800	61,000
4	5,500	3,000	13,300	15,200	9,700

Distancia mínima entre semillas inic 23,99

Resumen de conglomerados						
Clúster	Frecuencia	Desviación estándar RMS	Distancia máxima de la semilla a la observación	Radio sobrepasado	Conglomerado más próximo	Distancia entre Centroides del cluster
1	3 683	1,295	8,306		3	6,701
2	1 720	1,451	9,811		1	6,804
3	3 082	1,561	17,098		1	6,701
4	381	2,351	24,377		2	9,779

R-cuadrado general aproximado esperado = 0,83

Medias del clúster					
Clúster	Largo(μm)	Ancho(μm)	Área(μm^2)	Perímetro(μm)	Acrosoma%
1	5,208	3,149	13,593	16,613	50,90
2	5,202	3,154	13,504	16,339	44,10
3	5,209	3,198	13,906	17,212	57,56
4	5,269	3,207	13,860	16,197	34,33

Desviaciones estándar del clúster					
Clúster	Largo(μm)	Ancho(μm)	Área(μm^2)	Perímetro(μm)	Acrosoma%
1	0,397	0,265	1,601	1,389	1,913

Desviaciones estándar del clúster					
Clúster	Largo(μm)	Ancho(μm)	Área(μm^2)	Perímetro(μm)	Acrosoma%
2	0,415	0,285	1,762	1,498	2,220
3	0,409	0,261	1,569	1,54	2,666
4	0,506	0,360	2,337	1,712	4,342

Anexo 13. Tabla de código de las llamas, repeticiones de colecta y número de espermatozoides evaluados

Llamas				Evaluación	Peso (kg)
Color	Código	Método	Repetición	n de spz	
Negro	1	Electroeyaculación	4 colectas	1044	129,4
Plomo	2	Electroeyaculación	4 colectas	1157	105,5
Marrón con blanco	3	Electroeyaculación	4 colectas	1059	117,5
Blanco	4	Electroeyaculación	4 colectas	1110	132,2
Marrón	5	Vagina artificial	4 colectas	1147	120,6
Negro	6	Vagina artificial	4 colectas	1114	136,6
Marrón con blanco	7	Vagina artificial	4 colectas	1154	117,5
Blanco con negro	8	Vagina artificial	4 colectas	1081	120,0
Total			32 colectas	spz. 8866	

Anexo 14. Tabla de la evaluación de la forma de la cabeza del espermatozoide de la llama por ambos métodos de colecta

Método	n		Forma %				
	Colecta	Llama	Piriforme	Normal	Largo	Redondo	Angosto
Electroeyaculación	1	1	1,384	11,072	43,252	16,609	27,681
Electroeyaculación	1	2	1,020	11,564	40,816	8,843	37,755
Electroeyaculación	1	3	3,070	30,263	43,859	8,333	14,473
Electroeyaculación	1	4	4,291	13,733	42,060	6,008	33,905
Electroeyaculación	2	1	2,325	11,295	51,495	8,305	26,578
Electroeyaculación	2	2	0,000	10,344	48,902	2,821	37,931
Electroeyaculación	2	3	2,040	17,142	49,387	11,020	20,408
Electroeyaculación	2	4	1,027	11,643	54,794	4,452	28,082
Electroeyaculación	3	1	0,378	12,121	43,181	3,787	40,530
Electroeyaculación	3	2	0,000	11,111	50,000	2,614	36,274
Electroeyaculación	3	3	1,754	20,175	50,000	13,157	14,912
Electroeyaculación	3	4	1,532	11,494	57,471	4,597	24,904
Electroeyaculación	4	1	1,315	10,526	38,157	3,947	46,052
Electroeyaculación	4	2	0,955	10,191	51,273	1,910	35,688
Electroeyaculación	4	3	0,905	21,267	49,773	12,669	15,384
Electroeyaculación	4	4	0,738	12,546	53,365	6,273	27,306
Vagina artificial	5	1	0,354	19,503	43,262	10,638	26,241
Vagina artificial	5	2	0,322	14,193	48,709	23,225	13,548
Vagina artificial	5	3	1,087	19,927	51,087	2,536	25,362
Vagina artificial	5	4	0,000	17,921	53,763	4,659	23,655
Vagina artificial	6	1	0,348	20,209	45,644	5,923	27,874
Vagina artificial	6	2	0,666	15,000	54,000	10,666	19,666
Vagina artificial	6	3	0,809	19,433	54,251	5,263	20,242
Vagina artificial	6	4	0,714	20,714	43,571	3,928	31,071
Vagina artificial	7	1	0,000	19,788	48,409	2,473	29,328
Vagina artificial	7	2	0,321	15,434	41,157	12,540	30,546
Vagina artificial	7	3	1,792	21,147	42,652	4,301	30,107
Vagina artificial	7	4	1,067	22,064	44,281	3,914	28,825
Vagina artificial	8	1	1,793	26,457	47,982	6,278	17,488
Vagina artificial	8	2	0,000	21,088	30,952	37,074	10,884
Vagina artificial	8	3	1,754	20,350	46,315	1,052	30,526
Vagina artificial	8	4	0,358	21,147	46,236	4,659	27,598
Total			1,015	16,140	47,112	7,974	27,284

Anexo 15. Tabla de la evaluación de las características macroscópicas (volumen, pH, filancia y color) del semen de llama.

Metodo	Llama	Colecta	Volumen (ml)	pH	Filancia (cm)	Color
Electroeyaculación	1	1	4,1	7,0	4,0	Cristalino brillante
Electroeyaculación	2	1	4,4	6,9	5,0	Cristalino brillante
Electroeyaculación	3	1	3,0	7,0	4,7	Blanco lechoso
Electroeyaculación	4	1	2,5	7,0	3,2	Gris
Electroeyaculación	1	2	5,5	7,0	4,2	Blanco lechoso
Electroeyaculación	2	2	4,0	7,0	4,0	Blanco lechoso
Electroeyaculación	3	2	3,7	7,2	3,6	Cristalino brillante
Electroeyaculación	4	2	4,0	6,9	2,9	Cristalino brillante
Electroeyaculación	1	3	4,0	6,8	3,2	Cristalino brillante
Electroeyaculación	2	3	3,0	7,0	3,5	Cristalino brillante
Electroeyaculación	3	3	2,8	7,2	2,8	Cristalino brillante
Electroeyaculación	4	3	3,2	7,0	3,4	Gris
Electroeyaculación	1	4	5,0	7,0	4,3	Cristalino brillante
Electroeyaculación	2	4	4,1	7,2	4,0	Cristalino brillante
Electroeyaculación	3	4	3,3	6,9	3,5	Cristalino brillante
Electroeyaculación	4	4	3,6	7,1	3,0	Cristalino brillante
Vagina artificial	5	5	6,0	7,0	3,2	Blanco lechoso
Vagina artificial	6	5	8,0	7,2	3,8	Blanco lechoso
Vagina artificial	3	5	7,3	7,0	3,8	Cristalino brillante
Vagina artificial	7	5	9,0	7,0	3,4	Blanco lechoso
Vagina artificial	5	6	6,0	7,0	3,7	Gris
Vagina artificial	6	6	7,0	7,2	3,5	Blanco lechoso
Vagina artificial	3	6	9,0	7,0	4,1	Blanco lechoso
Vagina artificial	7	6	7,0	7,0	3,0	Blanco lechoso
Vagina artificial	5	7	6,0	7,2	3,8	Cristalino brillante
Vagina artificial	6	7	7,4	7,0	4,5	Blanco lechoso
Vagina artificial	3	7	8,0	6,9	2,8	Cristalino brillante
Vagina artificial	7	7	7,5	6,8	3,0	Cristalino brillante
Vagina artificial	5	8	5,6	7,0	2,8	Cristalino brillante
Vagina artificial	6	8	9,0	6,9	3,3	Cristalino brillante
Vagina artificial	3	8	6,0	7,2	2,1	Cristalino brillante
Vagina artificial	7	8	9,0	7,0	3,5	Blanco lechoso