



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

Efecto de la secreción endometrial producido durante la monta, sobre la viscosidad del semen y sobrevivencia de los espermatozoides en alpacas

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Producción animal	Reproducción animal	Ciencia Veterinaria

3. Duración del proyecto (meses)

12 meses

4. Tipo de proyecto

<u>Individual</u>	☐
<u>Multidisciplinario</u>	☐
<u>Director de tesis pregrado</u>	☐

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Perez Durand Manuel Guido Perez Guerra Uri Harold
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	947562135 992000419
Correo Electrónico	mgperez@unap.edu.pe uperez@unap.edu.pe

I. Título

Evaluación de la secreción endometrial producido durante la monta sobre la viscosidad del semen y sobrevivencia de los espermatozoides en alpacas

II. Resumen del Proyecto de Tesis

El objetivo de la presente investigación es disminuir la viscosidad del semen de alpaca y evaluar la sobrevivencia de los espermatozoides, por la adición de la secreción endometrial post copula. Se utilizarán 15 muestras de semen de 3 machos recolectado post copula y a estas muestras se les adicionara 1 ml de secreción endometrial a las 0, 4 y 8 horas mantenidos en baño maría a 37°C, producto de la monta del macho produce una inflamación en el epitelio endometrial que viene a ser un exudado y que contiene enzimas proteolíticas que hidrolizan y romperán las cadenas de proteínas. La secreción endometrial post copula se recuperará por lavado uterino con PBS, se centrifugará, filtrará se le suplementará con



antibióticos, se almacenará en refrigeración en viales hasta su uso. Además, en el semen se evaluará la sobrevivencia de los espermatozoides midiendo su motilidad, funcionalidad de membrana e integridad de acrosoma, evaluación que se realizará en las horas que se adicionara la secreción endometrial. Finalmente, la viscosidad del semen será semi-líquido o líquido que permitirá procesar y utilizar en las técnicas reproductivas como se viene realizando en las otras especies.

III. Palabras claves (Keywords)

Alpaca, semen, viscosidad, espermatozoides, viabilidad.

IV. Justificación del proyecto

La evaluación del semen de los camélidos sudamericanos es problemática por sus características por varias razones; las peculiaridades de copula y eyaculación en estas especies, la alta viscosidad del semen y la dificultad de obtener consecutivamente eyaculados de un mismo macho (Abraham et al., 2017). El plasma seminal es muy viscoso y está distribuido completamente en todo el eyaculado, esta viscosidad impide la evaluación del semen ya que atrapa a los espermatozoides, haciéndolos moverse de manera oscilatoria, con motilidad progresiva limitada (Garnica, et al., 1993; Deen et al., 2003). Además, dificulta el uso de tinciones para evaluar morfología y mezcla homogénea con diluyente, limitando el contacto con los agentes crioprotectores durante la crioconservación (Kershaw-Young and Maxwell 2012). Estos autores identificaron una proteína: mucina 5B, como el factor causante de la viscosidad más probable.

La viscosidad en el eyaculado se puede evaluar mediante una "prueba de hilo" (Kershaw-Young et al., 2013). Varios factores afectan las características del semen, como la duración de cópula y variación del macho individual (Tibary and Vaughan 2006), frecuencia y temporada de recolección (Ferré et al., 2015), nutrición (Bravo y Alarcón 2015), y técnica de recolección de semen (Morton et al., 2010; Alarcón et al., 2012).

El presente estudio evaluará la acción de la secreción endometrial que se produce por acción del proceso cartilaginoso del glande del pene por su movimiento continuo durante todo el tiempo de la copula, lacera el epitelio endometrial y producto del proceso inflamatorio se produce un exudado que dentro sus componentes poseen enzimas proteolíticas, que actuarían sobre la viscosidad del semen, así dejando libre a los espermatozoides y que posteriormente permitirían evaluar a los espermatozoides en su verdadera fisiología de movimiento y sobrevivencia.

V. Antecedentes del proyecto

Se puede usar semen aspirado del tracto femenino después del apareamiento rutinariamente para permitir la evaluación del semen (Dascanio 2014; Tibary et al., 2014; Ampuero et al., 2014), semen con viscosidad y estrías de sangre producto de la secreción endometrial. Para reducir la viscosidad, muchos autores han probado técnicas, como pipeteo, punción, vórtex, centrifugación y uso de enzimas no específicas.

Morton et al. (2008) informaron que la centrifugación, la punción y el vórtex eran ineficaces o a veces perjudicial para los espermatozoides. En cambio, Zirena (2014) no encontró diferencias entre punción repetida y agitación manual, hubo una reducción de la viscosidad sin alteración de parámetros seminales. Algunos investigadores han utilizado enzimas; sin embargo, su uso sigue siendo controvertido. Según Giuliano et al. (2010), la colagenasa redujo con éxito la viscosidad del plasma seminal de llama que mantenía la función espermática. Por el contrario, Morton et al., (2008) reportaron deterioro de la función



espermática en espermatozoides de alpaca después de usar colagenasa. El potencial fertilizante del espermatozoide de alpaca informó que se mantiene después del tratamiento de la reducción de la viscosidad con papaína (Stuart and Bathgate 2015). Sin embargo, además de papaína al semen de alpaca, seguido de la inhibición de la enzima con E-64 se consideró para reducir la viscosidad sin afectar integridad del espermatozoide (Kershaw-Young et al., 2016); espermatozoides que después de la descongelación informaron que la motilidad era razonable, aunque no se evaluó la capacidad de fertilización.

Varios investigadores a nivel nacional trabajaron sobre la viscosidad del semen y sobrevivencia de los espermatozoides, evaluando diferentes técnicas para disminuir la viscosidad. Alarcon y col. (2012) colectaron semen post copula y vagina artificial y reportaron los siguientes resultados en consistencia semi-viscosa (90%) y de viscosa ((99%) y para motilidad (73.4 y 69.0%); además lograron gestaciones del 55% y 48% para ambas técnicas de manejo respectivamente. Otro grupo de investigadores estudiaron sobre la consistencia del semen de alpacas colectados por vagina artificial y usaron 3 técnicas para medir la filancia, motilidad y vitalidad, emplearon semen pre-preduluido un medio comercial y emplearon tres tratamientos colagenasa, pipeteo e incubación, donde la filancia y sobrevivencia de los espermatozoides se midieron a los 0, 20, 40, 60 y 120 minutos, logrando disminuir en promedio de 0.95 cm a 0.33 cm en filancia con los 3 tratamientos: pero la motilidad y vitalidad disminuyeron de 52.50 y 70.64% a 31.25 y 65.29% respectivamente (Ramirez y col., 2021).

VI. Hipótesis del trabajo

Ho: Que la adición a las 0, 4, 8 horas al semen colectado post monta con la secreción endometrial (exudado) que contiene enzimas y que estas serían las responsables de degradar a la mucina 5B responsable de la viscosidad del semen.

VII. Objetivo general

Determinar el efecto de la secreción endometrial post monta sobre la viscosidad del semen y sobrevivencia de los espermatozoides en el semen recuperado post monta en alpacas

VIII. Objetivos específicos

Determinar la viscosidad del semen recuperado post monta por efecto de la adición de la secreción endometrial (exudado) a las 0, 4, 8 horas incubados a 37°C .

Determinar la sobrevivencia de los espermatozoides en el semen recuperado post monta: motilidad, funcionalidad de membrana, integridad de acrosoma a las 0, 4, 8 horas incubados a 37°C.

IX. Metodología de investigación

Lugar

El presente experimento se llevará a cabo en el laboratorio de reproducción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en la ciudad universitaria, avenida Floral 1245, de la Ciudad de Puno.

Material

Para la colección de semen post copula se utilizarán 3 machos alpaca de 4 años de edad, que se utilizan como reproductores y 20 hembras del lote de empadre y parición de la campaña 2023. De cada macho se colectarán 5 muestras de semen post copula.

Diseño

A las muestras de semen post copula se suplementarán 1.0 ml de secreción endometrial a 0, 4 y 8 horas y seguidamente se evaluarán en cuanto a la viscosidad del semen y en los espermatozoides la motilidad total, funcionalidad de membrana, integridad de acrosoma.

Cuadro. 1 distribución de los tratamientos y parámetros de evaluación

0 horas	4 horas	8 horas	Control
Viscosidad	Viscosidad	Viscosidad	Viscosidad
Motilidad	Motilidad	Motilidad	Motilidad
Funcionalidad de membrana	Funcionalidad de membrana	Funcionalidad de membrana	Funcionalidad de membrana
Integridad de acrosoma	Integridad de acrosoma	Integridad de acrosoma	Integridad de acrosoma

Técnicas

Colección de semen

Se seleccionarán 20 alpacas vacías adultas, con tres semanas postparto, sin infecciones uterinas, y sexualmente receptivas al macho. Cada hembra será empadrada con un macho entero. La frecuencia de colección de semen será dos veces por semana y el tiempo de cópula será mínimo de 15 minutos. Luego de la monta, se le sujetará a la hembra y se higienizará la región perineal con agua y jabón y se desinfectará. Se insertará un espéculo vaginal hasta la os externa del cérvix que será localizada con la ayuda de una fuente de luz adosada al espéculo vaginal. El semen que se encontrará en la vecindad de la os externa será colectado con el espéculo y depositando en un vial de plástico de 15 ml graduado y mantenido a 37 °C (Alarcón y col., 2012).

Evaluación del semen colectado

Antes de iniciar el tratamiento de adición de la secreción endometrial en el semen fresco se evaluará el volumen utilizando un vial de 15 ml graduado, el color se describirá por observación, el pH con papel tornasol, para la concentración será utilizada la cámara de Neubauer,

Preparación de la secreción endometrial

Inmediatamente concluida la colección del semen post copula, se realizará un lavado intrauterino de la hembra colocando 20 ml de PBS con ayuda de una pipeta de plástico adosado a jeringa de 20 ml, después de unos 2 a 3 minutos de mantener la solución de PBS en el útero de la hembra será recuperado y la muestra será depositada en un vial de 20 ml y colocado una caja tecnopor que posea cubos de hielo alrededor del tubo.

Llegando al laboratorio la muestra será centrifugada por 10 minutos a 3000 rpm, el sobrenadante se filtrará con un filtro de 0.22 μ m, se le adicionará 25 μ g de gentamicina/ml y 25 μ g de anfotericina B/ml y se almacenará en viales de 2 ml en refrigeración hasta su uso.

Tratamiento del semen fresco con la secreción endometrial

El volumen de semen fresco colectado se dividirá en dos porciones (tratamiento y control) en viales graduados y se mantendrá a 37°C, al tubo que contenga la porción para el tratamiento se le adicionará 1.0 ml de la secreción endometrial procesada a las 0, 4 y 8 horas. En cada hora del tratamiento se evaluará los siguientes parámetros.

1. Viscosidad

Se evaluará mediante la filancia que consiste en colocar 20 μ l de semen sobre el portaobjetos caliente y al retirar la misma gota se observará la formación o no de un hilo de extensión variable calificándose como presente o ausente de viscosidad (Carretero y col., 2018).

2. Motilidad

La motilidad de los espermatozoides se evaluará colocando una muestra de semen a un portaobjetos caliente (37°C) y se colocará en un microscopio de contraste de fase a 100X, como resultado se observará la motilidad total (oscilatoria y progresivo) de los espermatozoides y se sacará la proporción de motilidad (Giuliano et al., 2010).

3. Funcionalidad de membrana



Para la funcionalidad de la membrana se incubarán 50 μ l de muestra de semen a 37°C por 20 minutos en 200 μ l de una solución hipoosmótica: fructosa (2.45 mg/ml)–citrato de sodio (4.5 mg/ml) ajustado a 50 mOsm. Después de la incubación la reacción será parado adicionando igual cantidad de paraformaldeído al 4% en PBS y se incubará por 4 minutos a temperatura de ambiente, un mínimo de 200 espermatozoides será evaluado en un microscopio de contraste de fase a 400X y como resultado a funcionalidad membrana se sacará la proporción de espermatozoides con cola enrollada (Giuliano et al., 2008; Carretero y col., 2018).

4. Integridad de acrosoma

Una porción la muestra de HOS fijada con paraformaldeído al 4 % en PBS durante cuatro minutos a temperatura ambiente (200 μ l aproximadamente), se centrifugará a 800 g durante 10 minutos y el pellet se re-suspenderá con 100 μ l de PBS. Luego, se colocarán microgotas de la suspensión en portaobjetos marcados con Dako pen y se dejaron secar al aire. Se tiñeran con el colorante CB al 0,22 % durante 5 minutos y se observaran en microscopio óptico a 1000x. Los espermatozoides teñidos con CB se clasificarán en dos categorías: presencia de acrosoma (tinción violeta a nivel acrosomal) y ausencia de acrosoma (ausencia de tinción a nivel acrosomal). Se contabilizaron un total de 200 espermatozoides y sacara la proporción (Carretero y col., 2018).

Estadístico

Los datos se someterán a prueba de chi-cuadrado dentro una tabla de contingencia, por cada hora de evaluación y posteriormente se transformará los datos para someter a un DCA para ver la diferencia entre horas de tratamiento.

X. Referencias (Listar las citas bibliográficas con el estilo adecuado a su especialidad)

- ABRAHAM, M.C., DE VERDIER, K., BAGE, R., MORRELL, J.M. (2017). Semen Collection methods in alpacas. *Veterinary Record*. 180.
- ALARCON, V., GARCIA, W., BRAVO, P. (2012). Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev Inv Vet Perú*; 23(1): 58-64.
- BRAVO, W. & ALARCON, V. (2015) The influence of nutritional supplements on the quality of semen and fertility of the alpaca. *Revista Investigaciones Altoandinas* 17, 453-456.
- CARRETERO MI, PIGRETTI C, BERTUZZI M, FUMUSO F. (2018). Hypoosmotic Test Combined with Coomassie Blue Staining in Llama Sperm. *SPERMOVA*; 8(2): 129-132
- DASCANIO, J. (2014) Breeding soundness examination of the llama and alpaca. In *Llama and Alpaca Care: Medicine, Surgery, Reproduction and Herd Health*. 1st edn. Eds C. Cebra, D. Anderson, A. Tibary, R. Van Saun, L. Johnson. Saunders. pp 188-193.
- DEEN, A., VYAS, S. & SAHANI, M. S. (2003) Semen collection, cryopreservation and artificial insemination in the dromedary camel. *Animal Reproduction Science* 77, 223-233.
- FERRÉ, L. B., MALIK, G., ALLER, J. F., ALBERIO, R. H., FRESNO, C., KJELLAND, M. (2015) Llama (*Lama glama*) semen collection via thermo-electrical vagina: effect of seasonality and collection interval on ejaculate characteristic. *Small Ruminant Research* 133, 140-147.
- GARNICA, J., ACHATA, R. & BRAVO, P. W. (1993) Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science* 32, 85-90.
- GIULIANO, S., DIRECTOR, A., GAMBAROTTA, M., TRASORRAS, V. MIRAGAYA, M., (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science* 104 359–369.
- GIULIANO, S., CARRETERO, M., GAMBAROTTA, M., NEILD, D., TRASORRAS, V., PINTO, M. & MIRAGAYA, M. (2010) Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science* 118, 98-102.
- KERSHAW-YOUNG, C. M., EVANS, G., RODNEY, R. & MAXWELL, W. M. (2016) Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm function and improve post-thaw motility rates. *Reproduction, Fertility, and Development* doi: 10.1071/RD15261 (In press).



KERSHAW-YOUNG, C. M. & MAXWELL, W. M. (2012) Advancing artificial insemination in camelids, particularly the alpaca. <https://cdn.harper-adams.ac.uk/document/project/150604-Advancing-Artificial-Insemination-in-Alpacas423506.pdf>. Accessed April 25, 2017.

KERSHAW-YOUNG, C. M., STUART, C., EVANS, G. & MAXWELL, W. M. (2013) The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Animal Reproduction Science* 138, 261-267.

MORTON, K. M., THOMPSON, P. C., BAILEY, K., EVANS, G. & MAXWELL, W. M. (2010) Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected by semen collection procedure. *Reproduction in Domestic Animals* 45, 637-643.

MORTON, K. M., VAUGHAN, J. & MAXWELL, W. M. (2008) Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation.

RAMÍREZ, A., PALOMINO-GUERRERA, W., CONTRERAS, M. OLAGUIVEL, C., (2021). Efecto de tres tratamientos sobre la filancia del semen y su relación con la calidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú*; 32(6): e20233.

STUART, C. & BATHGATE, R. (2015) Advancing assisted reproductive technologies in camelids (especially the alpaca). <https://rirdc.infoservices.com.au/items/15-067>. Accessed April 25, 2017.

TIBARY, A. & VAUGHAN, J. (2006) Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: a review and clinical observations. *Small Ruminant Research* 61, 283-298.

ZIRENA, N. A. (2014) Comparison of two physical methods in the treatment of fresh alpaca semen and its relation to sperm quality after freezing. Thesis. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto

Los resultados del presente trabajo de investigación ayudarían a eliminar la viscosidad del semen en camélidos y su posterior uso para dilución del semen.

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

El semen sin viscosidad en forma diluida se utilizaría para su conservación y su uso en la inseminación artificial y otras técnicas reproductivas.

ii. Impactos económicos

Al generar las técnicas reproductivas con semen de camélidos se comercializarían y generaría un ingreso económico a las empresas que se dedicarían a este rubro.

iii. Impactos sociales

Al utilizar el semen de machos sobresalientes procesado se realizaría la inseminación artificial a grandes poblaciones de hembras como instrumento de mejoramiento genético. Por lo tanto, se tendría descendencia con mejora en finura de fibra, color y peso vivo, en favor las economías de los productores.

iv. Impactos ambientales

Los materiales utilizados en el presente trabajo de investigación son biodegradables, no alteraría el medio ambiente

XIII. Recursos necesarios



Infraestructura

Corrales de aparto

Laboratorio

Equipos

Vaginoscopio

Microscopio

Centrifuga

Baño maría

Refrigeradora

Ecógrafo

Destilador de agua

Micropipetas

Tecnologías

Colección de semen en camélidos

Evaluación de semen

Medios

Sales reactivas

Agua ultrapura

Hielo

Aceite de inmersión

Colorante BCB

Eosina

Nigrosina

Material de vidrio

Probetas de 100 ml

Vasos de precipitación

Erlenmeyer de 20, 50 ml

Porta objetos

Cubreobjetos

Materiales de plástico

Viales de 2, 15, 50 ml

Tip de 10, 50, 100 ul

XIV. Localización del proyecto

El presente experimento se llevará a cabo en el laboratorio de reproducción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado en la ciudad universitaria, avenida Floral 1245, de la Ciudad de Puno.

XV. Cronograma de actividades

Actividad	Meses											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Elaboración del proyecto y aprobación	X											
Ejecución del proyecto		X	X									
Tabulación de datos y revisión de literatura				X	X							
Redacción e informe final						X	X	X				X

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Colorante BCB	Frasco/gramos	150.00	5 gramos	150.00
Viales	15 ml	1.50	50	75.00
Viales	2 ml	0.50	100	100.00
Porta-objetos	Caja	50.00	1 caja	50.00
Cubreobjetos	Caja	30.00	1 caja	30.00



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN



Probetas	50 ml	50.00	2	100.00
Vasos de preci	50 ml	30.00	2	60.00
Vaginoscopio	Equipo	250.00	1	250.00
Imprevistos				500.00
			Total	1315.00