



I. Título
EFICIENCIA REPRODUCTIVA DE ALPACAS MACHOS SURI EN RELACION AL TAMAÑO TESTICULAR, NIVELES DE TESTOSTERONA, CALIDAD DE SEMEN Y FERTILIDAD DURANTE EL EMPADRE.

II. Resumen del Proyecto de Tesis

Con el objetivo de determinar la relación fertilidad con niveles de testosterona, tamaño testicular, calidad de semen por edad de las alpacas machos por efecto de frecuencia monta, se realizará el estudio en el Centro Experimental Chuquibambilla UNA Puno. El tamaño testicular será medido con utilización de una regla vernier; la concentración de testosterona de 24 machos será analizadas mediante RIA, así mismo la calidad de semen serán determinados en los laboratorios de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNA. Para la determinación de la fertilidad, las hembras serán apareadas mediante empadre controlado con la consiguiente utilización de un ecógrafo para evaluar el porcentaje de gestación. Los datos serán procesados mediante el Diseño Completo al Azar y Chi Cuadrado, con ayuda de las disciplinas estadísticas de tendencia central y de dispersión.

III. Palabras claves:

Fertilidad, Progesterona, tamaño testicular, calidad semen.

VI. Justificación.

El macho reproductor cumple una función importante en el proceso reproductivo en la mejora genética, por lo tanto, depende de una adecuada selección, manejo, salud y alimentación, para el éxito de su crianza. Sin embargo, aún existen limitantes en el conocimiento científico relacionado a la calidad de semen, tamaño testicular, hormonal y finalmente la fertilidad (Huanca, 1998). Pues, no solamente la eficiencia reproductiva se basa sobre el comportamiento reproductivo de la hembra, además del índice de fertilidad, natalidad, preñez, entre otros; sino también, a estos indicadores que tienen una gran influencia la fertilidad del macho, existen factores adversos que limitan el desarrollo de la producción y productividad de la alpaca. Esto se refleja en los bajos índices de natalidad que varía entre 55-60 %. En este proceso, el macho juega un papel importante en el proceso reproductivo y mejoramiento genético, porque de su correcta selección y buen manejo dependerá el éxito de su crianza (Sumar, 1991). Por ello, el



incremento del tamaño testicular se debe principalmente al aumento significativo del diámetro de los túbulos seminíferos y secundariamente por el incremento del volumen total del tejido intersticial, el desarrollo de los túbulos seminíferos en animales en proceso de alcanzar la pubertad es dependiente en gran parte del efecto de las hormonas gonadotróficas (LH y FSH), cuando el sistema nervioso central se hace menos sensible al efecto inhibitor de la testosterona (Hochereau de Reviers et al., 1993), La dimensión testicular constituye un importante indicador en la evaluación del potencial reproductivo del macho y puede ser empleado como criterio para predecir la producción diaria de semen debido a la elevada correlación encontrada entre la medición escrotal, el peso testicular y la producción total de semen (Skidmore, 2000). Por lo tanto, se requiere seguir trabajando en el campo de la investigación para contribuir a mejorar los niveles reproductivos, si se tiene en cuenta que el 70 % de los productores desarrollan una crianza tradicional y se sabe que las hembras de los camélidos sudamericanos tienen la limitante de producir sólo 4 ó 5 crías durante toda su vida reproductiva. En la actualidad, la crianza de esta especie se lleva a cabo bajo sistemas tradicionales no siempre eficaces, que agudizan los problemas de morbilidad, mortalidad y baja eficiencia reproductiva; donde los porcentajes de natalidad anual en la mayoría de explotaciones alpaqueras es del orden del 50 % (Fernández-Baca, 1993) con índices de fertilidad (Apaza et al., 2001) que no superan el 65 %, respectivamente. Para mejorar esta limitante, la aplicación de tecnologías como la ultrasonografía puede lograr una mayor eficiencia reproductiva en alpacas, para superar, de esta manera, la producción de crías logradas por alpaca hembra contribuir a lograr el incremento de la producción.



IV. Antecedentes del proyecto.

Fisiología reproductiva del macho.

En cuanto a la fisiología reproductiva el macho presenta algunas características diferentes al de otras especies, el macho no presenta el centro cíclico, la descarga de GnRH del hipotálamo ocurre de forma intermitente durante el día y noche, esta descarga de GnRH tarda algunos minutos y causa la liberación de LH aproximadamente 30 minutos después del impulso de la GnRH, esta hormona actúa sobre las células de Leydig, las que inician su producción de progesterona, gran parte de la cual es transformada en testosterona, la cual tiene vida corta y de secreción pulsátil, durando aproximadamente 20 a 60 minutos (Senger, 2003). El factor de liberación gonadotrópico del hipotálamo (GnRH), alcanza el sistema porta hipotalámico hipofisiario donde estimula la liberación de FSH y LH cuyo órgano es el testículo. La FSH actúa sobre las células de Sertoly y de esta forma promueve la espermatogénesis y la síntesis de Proteína Lijadora de Andrógenos (Androgen Binding Protein ABP), en tanto que la LH actúa sobre las células de Leydig estimulando la síntesis de Testosterona, a partir de aquí se establece una retroalimentación negativa testículo – hipófisis – hipotálamo, que el incremento de testosterona reprime la síntesis y liberación de LH a nivel hipofisiario y de GnRH en el hipotálamo, en este último caso la reducción de la liberación de GnRH además determina una retroalimentación negativa sobre la FSH. Por otro lado, la FSH además se encuentra bajo otro mecanismo de retroalimentación



negativa, a partir de la acción de las inhibinas sintetizadas en las propias células de Sertoly. En algunos casos se plantea que la Prolactina (PRL), tiene una acción sinérgica con la LH para la producción de Testosterona (Hafez, 2000).

Colección de semen en alpacas.

La colección de semen depende de una buena y constante producción espermática para que la calidad del semen sea buena. Las técnicas de colección de semen están bastante desarrolladas en otros animales de granja, especialmente en rumiantes domésticos en los cuales ya es un procedimiento de rutina, pero en camélidos, dadas las especiales características reproductivas, anatómicas y fisiológicas de esta especie esta colección es bastante dificultosa y no existe un protocolo recomendado y una técnica óptima, así como su manejo posterior (Pacheco, 2008) de estas técnicas el método de colección por Aspiración Vaginal, con mejores resultados, consiste en colectar semen post cópula, aplicando un espéculo vaginal que consta de un proctoscopio, se introduce cuidadosamente a la vagina previamente atemperada a temperatura corporal y a través del especulo (proctoscopio), refluye el contenido o secreción vaginal hacia el exterior lo cual es colectado en un tubo falcón de 15 ml. atemperado a temperatura corporal para su posterior evaluación de semen (Bravo PW. 1998).

El método de Aspiración Vaginal post copula, no necesita el entrenamiento tedioso de machos, mediante aspiración vaginal no se altera la conducta sexual del macho y no requiere de un maniquí, ni de una vagina artificial con todos sus accesorios, ya que solo se requiere



de una hembra receptiva y un espéculo vaginal (Aller et al., 2003).

Características macro y microscópicas del semen de alpacas.

Características macroscópicas del semen.

Se evalúan mediante varios parámetros entre estos: volumen, color, aspecto y pH. Estas características del eyaculado dependerán del tipo de colección y de la manipulación, así como de las características fisiológicas reproductivas de cada animal (Pacheco, 2011).

Volumen

El volumen varía con la metodología de colección y está influenciado por factores intrínsecos y medio ambientales, el rango de volumen de eyaculado es bastante grande en alpacas, se tiene reportado desde 0.4 a 12.5 ml. (Bravo, 2002; Sumar, 2000), por el método de Aspiración Vaginal en alpacas se reporta valores de 3.6 ± 1.3 ml. (Alarcón et al., 2012).

El factor más importante en la variación del volumen eyaculado es la frecuencia de colección, pues el volumen disminuye a medida que se incrementa el uso del macho, las últimas eyaculaciones tienen menos volumen y esta disminución se presenta notoriamente después de la tercera eyaculación continua (Quispe, 1987; Tibary y Vaughan, 2006).

Color

En la mayoría de las especies el semen tiene una coloración blanquecina y su opacidad se halla en función de la concentración espermática (Derivaux, 1982).

El semen de alpaca presenta un color que varía desde el blanco lechoso hasta el blanco cristalino, siendo muy variable de acuerdo al método de



colección a la concentración espermática y a la frecuencia de colección (Bravo, 2002; Sumar, 2000). El color predominante del semen durante la época reproductiva es el blanco opaco, presente en el 76.9% de las observaciones, también de color blanco 5.1%; blanco amarillento 5.1% y blanco traslucido 12.8%, El semen colectado por aspiración vaginal es de poca viscosidad y de color rojo claro lo que se debe a la presencia de fluidos uterinos y de sangre de la hembra, en este sentido el semen colectado se podría catalogar como hemático, la colección por este método de aspiración vaginal hay presencia de sangre en la muestra de semen, se debe entender que es parte de la fisiología normal de alpacas y llamas, la sangre se debe al daño que hace el proceso peneano del macho en el endometrio uterino así presenta coloraciones; rojo claro, rojo oscuro, morado (Vélez, 1997). Color de semen por Aspiración Vaginal en alpacas; rojo claro 80%; rojo oscuro 10%; blanco lechoso 5%; blanco cristalino 5%. (Alarcón, 2012).

Aspecto

El aspecto del semen de camélidos sudamericanos (CSA), alpaca y llama es de carácter gelatinoso y viscoso, particularidad que dificulta la dilución con diluyentes comunes utilizados para otras especies (Sumar y Leiva, 1981; Sumar, 2003; Bravo et al., 1992; Pérez y Quispe, 1994).

El semen de alpacas es altamente viscoso, siendo muy difícil separar los espermatozoides del plasma seminal por centrifugación, así como la estimación de la concentración espermática por medios convencionales, además que esta viscosidad confiere al espermatozoide un movimiento lento diferente a lo observado en otras especies domésticas, por estar



aprisionado por el gel del plasma seminal (Sumar, 1985).

pH.

El pH. es la concentración de iones hidrógeno, se expresa por medio de un número que va desde el 4 al 14, un pH con valor de 7 indica que están presentes igual número de iones hidrogeno o iones hidroxilo, un pH inferior a 7 indican que existen más iones hidrogeno (acidez) y un pH superior a 7 indica que existen menos iones hidrogeno (alcalinidad) (Murray et al., 2001), en camélidos la colección de espermatozoides del conducto deferente sin la presencia de plasma seminal dio un pH de 6.5 por su alta concentración espermática (80 – 120 millones en 0.02 ml) lo cual indicaría que en su composición el plasma seminal contiene sustancias amortiguadoras (Deza, 2004).

Aunque con mucha antigüedad sin embargo es valioso el aporte de Mogrovejo (1952), empleando un potenciómetro Beckman indica un promedio de 8.32 con variaciones de 7.15 a la neutralidad, con ligera tendencia a la alcalinidad con un promedio de 7.5 (7.0 – 8.8) (Fernández-Baca Y Calderón, 1966). Recientes estudios de la misma forma con utilización de papel tornasol encontraron un promedio de 7.3 (7.0 – 7.6), en general a la actualidad se tiene varios estudios (papel tornasol) concordantes a intervalos comprendidos entre 7.09 – 7.32 de pH, es decir, ligeramente alcalino (Pérez y Quispe, 1994). El pH. En llamas reportada por Giuliano et al. (2014) es de 7.0 – 7.2.

Características microscópicas del semen.

Concentración

La concentración expresa el número de espermatozoides por milímetro



cúbico, este valor tiene gran importancia y es necesario conocerlo para juzgar la calidad de un esperma (Derivaux,1982). La concentración es un indicador muy importante para la relación de dilución (Evans Y Maxwell, 1990).

Las amplias variaciones de la concentración se debería el método de colección principalmente así mismo a frecuencia de eyaculado, edad del animal, tamaño de los testículos, número de eyaculados en el día de colección, así como sucede en otras especies domesticas (Waltón, 1984).

La determinación de la concentración del semen de llamas y alpacas se hace un poco difícil debido a la viscosidad del plasma seminal de esta especie, por lo que no facilita la expansión del semen en el hemocitómetro así mismo, en la coloración y extensión del semen en la lámina portaobjetos, sin embargo, una modificación a la técnica del hemocitómetro es realizada diluyendo previamente el semen en solución salina en 1:100; 1:50; 1:200 y tomando 10 μ l. de semen diluido para cargar en la cámara de Neubauer o hemocitómetro, luego se realizan las lecturas, este método es utilizado por investigadores de semen en alpacas por lo que los datos reportados en concentración espermática en alpacas fueron obtenidos con esta técnica (Bravo, 2002).

Concentración de espermatozoides en llamas obtenidos por Vagina Artificial reportan un promedio de: 1.48 Esp. X 10⁶ /ml. (Giuliano et al., 2014).

La concentración de espermatozoides obtenidos por el método de Aspiración Vaginal en alpacas reporto 75.3 \pm 20.3 X10⁶/ml (Alarcón et



al., 2012).

Motilidad

Sumar y Leyva (1981), reportan que no existe la “motilidad masal” por la baja concentración relativa de espermatozoides y por motilidad progresiva individual poco vigorosa, por lo que el movimiento de los espermatozoides es lento.

Los diferentes autores indican una calificación de pobre a regular así la más alta se estima en “grado 3” dentro de una escala subjetiva de 1 a 5, resumiéndose que la motilidad de los espermatozoides de alpaca y llama es individual o progresiva, lenta lineal y rotatoria (Quispe, 1987). La motilidad parámetro importante en la evaluación del semen de animales domésticos, así para el caso de la alpaca se adecua a la cuantificación de acuerdo a la siguiente escala:

0 = Sin movimiento.

1 = Ligera ondulación con vibración de la cola sin progresión

2 = Progresión lenta incluyendo detención y comienzo de movimiento

3 = Movimiento progresivo continuo y moderada velocidad

4 = Movimiento progresivo rápido

5 = Movimiento progresivo muy rápido en el cual son difíciles de seguir visualizando (Pérez y Quispe 1994).

La motilidad total o masal en camélidos no está presente como en el caso de los carneros, en camélidos es mejor referirse como motilidad individual y oscilatoria, con movimiento lento que en parte es debido a la viscosidad del semen (Bravo, 1995), la motilidad lograda a través de la desviación del conducto deferente fue 64.81% a 67.36% (Quintano,



2002), se reportó 71.89% de motilidad individual con la técnica de desviación de conducto deferente (Deza, 2004).

La motilidad del espermatozoide en medio de la masa gelatinosa y viscosa es oscilatoria con típicos movimientos individuales con una cuantificación de 85%, con variaciones que van desde 69 a 91% (Bravo et al., 1997).

Los espermatozoides de camélidos exhiben motilidad individual por la contracción del flagelo en el mismo lugar de manera oscilatoria, la evaluación de la motilidad se realiza inmediatamente a la colección y sobre una platina atemperada realizándose el conteo de los espermatozoides con movimiento en un campo y expresándose en porcentaje (Bravo, 2002).

La motilidad individual es muy baja en semen no diluido, es descrita como oscilatoria y solo un 5-10% de los espermatozoides motiles tienen movimiento de avance lineal, siendo necesario licuefactar el semen para observar mejor la motilidad, pues es muy dificultoso observar en semen entero por su naturaleza viscosa (Tibary Y Vaughan, 2006).

Usando dos llamas se obtuvo una motilidad de 75 a 95% en llamas con semen diluido con yema de huevo 20%, el movimiento fue de tipo oscilatorio inicialmente, antes de someter a congelación la motilidad fue hacia delante (Bravo, et al., 1997).

Mediante el método de colección por electroeyaculación, en llamas realizado en la Estación Experimental de Kallutaca de la Universidad de Pública de el Alto, provincia de Los Andes departamento de la Paz Bolivia, se reportó motilidad de 28.4% como máximo y 17.2% como mínimo con



promedio de 22.8% (Laruta et al., 2016).

Vitalidad

Parámetro que evalúa a los espermatozoides si están vivos o muertos, se puede determinar por varios métodos, siendo la coloración eosina, los espermatozoides vivos tienen su membrana intacta que impide la penetración del colorante, en tanto que los muertos adquieren la coloración rosada, el resultado se expresa en porcentaje (Toro Montoya, 2009).

Las tinciones permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos así en lo referente a colorantes la cabeza tiene la particularidad de dejar pasar los colorantes por perturbación de la membrana cefálica, mientras que los vivos no (Lubos, 1983).

Para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos o muertos se requiere de la utilización de coloraciones supravitales, el colorante más utilizado es el Hancock (eosina/nigrosina), que permite visualizar los espermatozoides vivos de un color blanco brillante y los muertos de un color rosado, todos sobre una superficie oscura (Bravo, 2002; Aller et al., 2003).

La vitalidad y la motilidad de los espermatozoides de llama obtenidos por vagina artificial se ve afectada negativamente por la presencia de espumas en el eyaculado el cual se forma de los movimientos de penetración del macho (Giuliano et al., 2007).

La tasa de espermatozoides vivos para llamas fue de $70.04 \pm 25.99\%$ con valores que varían desde 10 a 95%, sin diferencias significativas para el factor semana y edad. El método utilizado para la observación de la



vitalidad espermática fue de tinción eosina-nigrosina (Fernández, 2001).

Anormalidades espermáticas

Estudios indican un 11.65% de anomalías, siendo las más frecuentes en orden decreciente; cabezas solas, colas torcidas, colas enrolladas, colas quebradas, cabezas alargadas, micro cabezas, gota citoplasmática (Sumar, 2003), señala haber encontrado un 13.9% reportes corroborados por (Merlian et al., 1982).

Quintano (2002), indica para semen obtenido por desviación de conducto deferente un 25.98% de espermatozoides anormales de los cuales 15.76% corresponden a anomalías primarias y un 10.22% a anomalías secundarias, posteriormente Deza (2004), en semen obtenido por el mismo método de desviación de conducto deferente un 61.72% de espermatozoides fueron normales, el resto 7.03% de anomalías primarias y 31.25% de anomalías secundarias finalmente, Quintanilla (2009), junto a los dos autores anteriores también para semen obtenido por conducto deferente indica un $0.47\% \pm 0.09\%$ de anomalías primarias y $7.26 \pm 4.58\%$ de anomalías secundarias.

La proporción de espermatozoides normales se encuentra entre 60 y 90%, observándose alto porcentaje de espermatozoides anormales en relación a otras especies, siendo entre todas la más importante las anomalías en la cabeza, seguida por gota citoplasmática y luego problemas de cola (Bravo, 2002), el porcentaje de espermatozoides anormales es de 23.6%, este porcentaje se ve aumentado de acuerdo al incremento de la frecuencia de colección, siendo las anomalías en



la cola la que más se incrementa (Bravo, et al., 1997). Otros reportes hechos en semen de alpacas colectados por vagina artificial durante la época reproductiva indica que las anormalidades se encuentran en un 49% y la anormalidad más frecuente son los problemas de pieza intermedia seguido por problemas de la cabeza luego en la cola, se indica que las cabezas solas no se consideran como anormalidades pues se deben a un manejo brusco del semen y no se cuenta como anormalidades (Flores et al., 2002).

Estudios sobre la morfometría de espermatozoides de llama y guanaco indican una gran variabilidad entre e intra individuos, similar a los reportes en alpacas sugiriendo que existe un polimorfismo natural en las cabezas espermáticas de camélidos sudamericanos, siendo esta una evidencia aun no concluyente indica que una mejora y un ajuste en la forma tradicional de evaluación de camélidos es urgente (Casaretto et al., 2008;).

Tamaño testicular.

Los testículos de la alpaca están localizados en un escroto no pendulado es decir sin cuello definido, formando una protuberancia subanal similar a los cerdos; el escroto que protege y soporta a los testículos regulando la temperatura interna de los mismos mediante la contracción y relajación de los músculos dartos y cremáster. Los testículos están recubiertos por dos capas serosas, la túnica vaginalis y otra capa de tejido conectivo denso e irregular que constituye la túnica albugínea. (Sumar, J. 1983).

Uno de los criterios para la selección de alpacas reproductores debe ser



el buen tamaño testicular, tal como sucede en otras especies domésticas, Casas H. (1992), Así Johnson, LR.W. (1989) para 17 llamas de 3.5 años de edad indica un peso vivo promedio de 24.0 gramos con dimensiones de 5.0 a 7.0 cm de largo y 2.5 a 3.5 cm de ancho.

La producción individual espermática individual de cada macho está relacionado proporcionalmente al tamaño de los testículos, así un solo testículo del toro con un peso de 350 gr, producirá aproximadamente 5,250 millones de espermatozoides diariamente, Aman R.P. (1980) mientras que la alpaca asumiendo la misma tasa diaria de producción de espermatozoides por gramo de testículo que en el toro, producirá solamente 270 millones de espermatozoides diarios, aspecto que se debe considerar al programarse la selección de los machos. Bravo, W. (2003) en un estudio de reservas espermáticas señala no haber encontrado diferencias en la concentración espermática en los testículos del lado derecho e izquierdo, habiendo encontrado una producción promedio de 92 millones de espermatozoides por ml al momento del empadre.

El tamaño testicular así como sus dimensiones en alpacas machos adultos, aumentan cada vez con la edad, alcanzando sus valores máximos a los 5 años de edad, alcanzando sus valores máximos a los 5 años de edad, con promedios de 3.98 ± 0.40 cm de largo con valores que varían entre 3,3 a 4,8 cm, y un ancho de 2.59 ± 0.31 cm con variaciones desde 1.9 a 3,2 cm. En animales jóvenes son de tamaño pequeño y consistencia flácidos, así al año de nacimiento o poco después (tuis) tienen un tamaño de 0.5 cm, así también a la misma



edad los testículos ya debe encontrarse en la bolsa escrotal y cuando se realiza la primera selección para reproducción ambos testículos se encuentra en la bolsa escrotal de un tamaño promedio de 1.5 de largo por 0.40 cm de ancho Sumar, J, (1983), el mismo autor indica para alpacas pre-puberes es frecuente observar que uno de los testículos descienden primero que en el otro a la bolsa escrotal con ligeras diferencias en el tamaño de estos, diferencias que desaparecen al llegar a la madures sexual aproximadamente a los 3 años de edad

Bravo W. et al (1992) indican que los testículos aumentan paulatinamente de tamaño hasta los 30 meses de edad, existiendo una relación positiva entre la edad y tamaño testicular ($R= 0.88$)

El desarrollo de los testículos es creciente hasta los 3 años de edad, seguido de una estandarización cuyos resultados por edad para el largo testicular de 3.04, 4.65, 5.35, 5.25, 5.44 cm, y un grosor de 1.07, 1.58, 2.19, 2.06 y 2.20 cm, para 1, 2, 3, 4 y 5 años de edad respectivamente. Alanoca, F. (1978) con la localización del testículo que varía según la edad, ya que, en la migración testicular, tienden a deslizarse hasta la zona posterior, así en crías aún permanecen en la región inguinal, aproximadamente hasta el año de edad cuando alcanzan su ubicación en la región perineal, Obando, A. (1992).

Estudios señalan algunas anomalías testiculares para alpaca entre estos el caso de Hipoplasia testicular o denominados como testículos pequeños, anomalía más frecuente (3.33%) seguido de quistes (1.96) ubicados principalmente a nivel de la cabeza del epidídimo y



demás alteraciones en menor cuantía como ectopias testiculares (0.8%) que son localizaciones del testículo fuera de su ubicación normal y finalmente la anomalía de criptorquidismo (0.5% con ausencia de uno de los testículos, Panuera, M.A. (1989).

Niveles plasmáticos de testosterona

La testosterona, es una hormona androgénica producida por los testículos. En realidad es una pro hormona, ya que para realizar su acción fisiológica o farmacológica debe reducirse en posición 5-alfa-dihidrotestosterona, que es la hormona activa. Es una hormona propia de los machos que permite desarrollar los músculos del macho con mayor facilidad que la hembra. Las

hembras producen una cantidad mucho menor, que cumple también importantes funciones en la regulación de aspectos como su humor, apetito sexual y sensación de bienestar, (Hafez, E. 2003).

Las células de Leydig son de síntesis principal de la testosterona a partir del colesterol. También se sintetiza en la zona rugosa de la corteza suprarrenal, en las células tecaes del ovario y en la placenta. La gonadotropina hipofisaria LH, hormona luteinizante, es la hormona reguladora específica de la producción de la testosterona (Salisbury, G. et al 1978)

Martínez, J., Queipo, Z. y Salmon G. (2006) indican que la testosterona plasmática se divide en 3 fracciones: la fracción unida a la globulina fijadora de hormona sexual o SHBG (Sex-hormone Binding Globulin), la fracción unida a la albúmina y la libre. La fracción realmente activa es la libre, que supone el 2% de la testosterona total. Debido a la lábil unión



entre la testosterona y la albúmina existe un fácil intercambio de ésta con la libre (tiempo medio de disociación menor de 1 segundo), por lo que la fracción unida a la albúmina tiene una alta actividad biológica. Por ello a estas dos fracciones (libre y unida a la albúmina) se las denomina también testosterona biodisponible o bioactiva. Con la edad se observa un descenso de la testosterona plasmática total, aunque existen grandes diferencias interindividuales, con un incremento de los niveles de globulina transportadora de hormona sexual. Este descenso de la producción de testosterona y el aumento de la producción de SHBG resulta en que la testosterona biodisponible y la libre descienden aún más que la testosterona total, por lo que determinar la testosterona total puede ser un índice engañoso de la actividad androgénica. Por ello será más fiable la determinación de testosterona libre o la biodisponible.

La testosterona es transportada en la sangre por una alfa globulina denominada globulina de unión para esteroides. Aproximadamente el 98% de la testosterona circulante está unida. La testosterona restante se encuentra libre para entrar a la célula blanca, donde una enzima en el citoplasma la convierte en dihidro testosterona, la cual puede actuar en el receptor nuclear. Entre las funciones principales de la testosterona está: a) el estimular los estadios tardíos de la espermatogénesis y prolongar el lapso de vida del espermatozoide en el epidídimo, b) Promover el crecimiento, desarrollo y la actividad secretoria de los órganos sexuales secundarias y el comportamiento sexual o líbido del macho, Hafez, E. (2003).



Huanca, T. y Sumar, J. (2002), en el estudio realizado "Niveles de testosterona en alpacas, antes durante y al final de una campaña de empadre" señalan niveles de testosterona bajo la influencia de la edad de los machos de 2, 3 y 4-5 años de edad, con 7.06, 22.04 y 23.89 ng/ml respectivamente, por otro lado señalan que al inicio del empadre los niveles de testosterona no son perceptibles al análisis del RIA, sin embargo recién aparece a la mitad 0.916 ng/ml y final del empadre (1.247ng/ml).

Fertilidad en alpacas donde el semen fue depositado a nivel del cuerpo del útero fue de 10.34 % y en el cuerno ipsilateral al folículo ovulatório fue de 16.6 % siendo estadísticamente similares ($P > 0.05$). El total de hembras gestantes al finalizar el presente estudio fueron 8 (13.55 %).

La mejora del proceso de colección de semen mediante el método poscópula y la aplicación de un segundo servicio de inseminación artificial a las alpacas que no concibieron en el primer servicio permitieron obtener mayores tasas de preñez y natalidad.

V. hipótesis.

Se obtendrá una mejor fertilidad en relación a mejor calidad de semen, mayor tamaño testicular y mayor concentración de espermatozoides.

VI. Objetivo general.

Determinar la eficiencia reproductiva de alpacas machos suri en relación al tamaño testicular, niveles de testosterona y calidad de semen.

VII. Objetivos específicos:



- Determinar los niveles de testosterona
- Determinar la calidad de semen.

VIII. Metodología de investigación.

Colección de Semen. Se realizará mediante la técnica “Aspiración Vaginal post Copula” con la debida identificación de machos, luego previa limpieza de la vulva se colocará el proctoscopio a temperatura de 37 °C mediante movimientos suaves y rotatorios en el tracto genital de la hembra, seguidamente con ayuda de dos personas se levantará la parte anterior del cuerpo, de tal manera que quede la hembra en posición declive, para facilitar el descenso del semen por gravedad en el tubo falcón debidamente atemperado, luego trasladar en baño maría hacia el laboratorio para su respectiva evaluación.

Evaluación macroscópica del semen

- 1. Volumen.** Una vez colectado el semen, en un tubo colector graduado, se dará lectura directa del volumen obtenido.
- 2. Color.** Se realizará bajo una apreciación visual directa al tubo falcón transparente.
- 3. Aspecto.** Se determinará mediante la utilización de una micropipeta colocada en los tubos de falcón con contenido seminal, para luego por aspiración se obtendrá una determinada cantidad, seguidamente se extenderá sobre una lámina portaobjetos y al momento de retirar la pipeta se observará lo extendido y si es a manera de un hilo (Filancia), se medirá con una regla la longitud del extendido.
- 4. pH.** Esta determinación se realizará inmediato a la colección, colocando la parte sensible del pH peachiméetro digital por el tiempo necesario hasta su estabilización de la lectura.

Evaluación microscópica del semen.

- 1. Concentración.** Se realizará mediante el método del hemocitómetro - “Neubauer” de la siguiente manera;
 - a) Con ayuda de una micropipeta milimetrada se aspirará una muestra de semen desde el tubo colector a una temperatura de 37°C, el volumen de semen será vertida a un tubo de ensayo con contenido de



100 μ l. de NaCl. al 5%, como espermicida de manera que facilite el conteo en la cámara Neubauer.

Se homogenizará el tubo (semen y dilución), con movimiento rotatorio circular seguidamente se aspirará utilizando micropipeta de 20 μ l, para diluir y seguidamente colocar en la cámara Neubauer, de tal manera que la muestra ingrese por capilaridad a ambos lados de la cámara, se dejará en reposo de 4 a 5 min. con la finalidad de asiente o sedimente las células espermáticas en la cámara.

- b) Se localizará el área de conteo de la cámara en un microscopio a un aumento de 10X, se procederá con el conteo de espermatozoides a un aumento de 40X, el conteo de los espermatozoides se realizará en 5 cuadrados (cuatro extremos y uno del centro), de ambos lados de la cámara Neubauer.
- c) Una vez obtenido el conteo de espermatozoides, el número promedio contado por mm^3 se multiplicará: N° de Esp. \times 50 \times 100 \times 1000 = Número de Espermatozoides por mililitro.

2. Vitalidad. Se determinará mediante la técnica de coloración supra vital, tinción Eosina Nigrosina, (Eosina al 1%, Nigrosina al 5%) mediante el procedimiento siguiente:

- a) Se colocará una lámina portaobjetos sobre una platina térmica a 37°C, con la finalidad de atemperarlo.
- b) Se pipeteará del tubo colector falcón 30 μ l. de semen y lo aspirado se verterá sobre una lámina portaobjetos, luego colocar a su lado 20 μ l. de colorante Eosina – Nigrosina a 37°C, seguidamente con un puntal se mezclará homogenizando el semen con el colorante dejando en una platina térmica unos 20 segundos, con la finalidad del teñido de las células espermáticas.
- c) Se realizará un frotis con otra lámina portaobjetos, extendiendo la mezcla sobre la lámina de un extremo a otro y se procederá al secado del frotis sobre una platina atemperada a 37°C.
- b) La evaluación de la vitalidad espermática se realizará con la ayuda de un microscopio a 40X, para el conteo de 100 células espermáticas en diferentes campos del frotis.



C

- d) Se considerará espermatozoides vivos a aquellos que presenten coloración blanco grisáceo y espermatozoides muertos los teñidos de color rosado.
- e) Los resultados se expresarán en porcentajes según la siguiente ecuación;

$$\text{Vitalidad \%} = \frac{\text{Nº de Espermatozoides Sin Tinción}}{\text{Nº Total de Espermatozoides Observados}} \times 100$$

3. Morfología. (anormalidades espermáticas). Para la observación de anormalidades se procederá de la siguiente forma:

- a) Con utilización de una micropipeta se absorberá 30 µl de semen puro del tubo colectado, para luego extenderlo en una lámina portaobjetos mediante frotis en un área adecuado, se dejará secar por 3 minutos, en seguida colorear con tinción Dip Kuig, para ello sumergir en alcohol fijador por 1 minuto luego se retirará y dejará secar a medio ambiente durante 3 minutos.
- b) Se sumergirá la lámina con frotis en Eosina por 1 minuto en seguida retirar dejando escurrir el colorante por unos segundos, luego se procederá a enjuagar el revés de la lámina con agua, dejando a intemperie para su secado por 10 minutos, el mismo procedimiento se realizará con la misma lámina sumergiendo en azul de Metileno.
- c) Finalmente se procederá a evaluar las láminas en microscopio a 100X con utilización de aceite de inmersión, para observar porcentajes de anormalidades espermáticas, mediante la fórmula:

$$\text{Morfología \%} = \frac{\text{Nº de espermatozoides anormales}}{\text{Nº de espermatozoides observados}} \times 100$$

IX. Lugar del estudio.

El trabajo de investigación se realizará en el Centro Experimental



“chuquibambilla” dependencia de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado a 4237 metros de altitud y temperatura fluctuante de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $9.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una precipitación pluvial de 525.7 mm (SENAMHI 2018), ubicado en el distrito de Santa Rosa – provincia de Melgar y departamento de Puno.

La evaluación de semen se realizará en el laboratorio de “reproducción” del centro experimental, así mismo se complementará con replicas en los laboratorios de la Estación Experimental de Marangani- Sicuani Cusco, dependencia de la Universidad nacional Mayor de San Marcos.

V. Referencias

- Alarcón V, García W, Y Bravo W. 2012. Inseminación Artificial de alpacas con semen colectado por Aspiración Vaginal y Vagina Artificial. Rev Inv Vet Perú 2012; 23(1): 58 – 64.
- Bravo, W.; García, W. y Alarcón, V. 2012. Inseminación Artificial de alpacas con semen colectado por Aspiración Vaginal y Vagina Artificial. Rev Inv Vet. 23(1):58 – 64.
- Bravo, W., Flores, D. and Ordoñez, C. 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. Theriogenología.
- Bravo, PW. 1995. Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. Camelids Proceedings 257. Published by: post graduate foundation in veterinary science. University of Sydney. Australia.
- Bravo, W. 2003. Inseminación Artificial en Alpacas y Llamas, II congreso mundial de Camélidos. Potosí, Bolivia.
- Bravo PW.; Flores U. Garnica J. y Ordoñez C. 1997a. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. Theriogenology 47: 619 – 626.
- Bustanza, V. 1986. Los camélidos sudamericanos domésticos y el desarrollo andino IIDSA UNA PUNO.
- Cárdenas, M.; Vivanco, M.; Bravo, PW. 1987. Comparación de dos métodos de colección de semen en alpacas. X reunión científica anual del APPA. UNA – PUNO PERÚ.
- Carpio, M.; Ordoñez, V.; Alarcon, Y. Y Bravo, W. 1999. Presencia de



espermatozoides niveles de testosterona y tamaño testicular en alpacas. II congreso mundial sobre camélidos sudamericanos, Cusco – Perú.

Giuliano, S.; Ferrari, MR.; Spirito, SE.; Campi, SH.; Director, A. Y Fernández H. 2007a. avances en la implementación del test hipoosmotico (Hos test), en espermatozoides de llama. Avances de la investigación. Fac. Cs. Vet. UBA. Buenos Aires. Argentina.

Huanca, T. Y Sumar, J. 2002. Niveles de testosterona en alpacas, antes durante y al final de una campaña de empadre INIA IVITA UNMSM PUNO

Pérez, G. Y Quispe, F. 1994. Dilución y conservación del semen de alpacas dirección de investigación UNA – PUNO.

Pacheco, J. 2011. Efecto de la Oxitocina y la GnRH sobre las Características Seminales y Testosterona Sérica en Alpacas Machos. Tesis MAG. SCI. POST- GRADO UNA – PUNO.

Quispe, F. 1987. Evaluación de las características físicas del semen de alpaca durante la época de empadre, Tesis FMVZ – UNA – PUNO PERÚ.

Quintano, J. 2002. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (lama paco) colectado del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis FMVZ. UNA. Puno. Perú.

Quintanilla, R. 2009. Efecto del empajillado y método de colección sobre la sobre la sobrevivencia de los espermatozoides del conducto deferente de alpacas. Tesis FMVZ. UNA – PUNO.

Sumar, J. Y Leiva, V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en alpaca (lama Pacos), memorias de la IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos, Punta Arenas Chile

Sumar, J. 1985. Fisiología reproductiva de la alpaca. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, boletín Científico la Raya N° 1. P. 36.

Sumar, J. 1992. Fisiología de la Reproducción del macho y manejo reproductivo, Seminario de postgrado. Reproducción e



Inseminación Artificial en Camélidos Sudamericanos, INIA FMVZ-UNA – PUNO.

Valenzuela, M.; Rippes, F. Y Nuñez, H. 2012. Estudio Morfológico de testículo de híbridos de alpaca (lama pacos), y llama (lama glama), Int. J. Morphol. 30(3): 1187-1196, 2012.

VI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto.

Los resultados contribuirán en la mejor utilización de alpacas reproductores suri, es decir machos comprobados con producción espermática eficiente lo que implica una mayor fertilidad.

VII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

Contribuirá en el desarrollo de la ciencia y tecnología reproductiva de alpacas con la generación de conocimientos, bajo el entendido que para camélidos aún falta mucho por hacer, en otras palabras, es un campo virgen para continuar investigando en esta especie animal.

ii. Impactos económicos

Los resultados contribuirán en la obtención de un mayor número de crías nacidas, implica mayor porcentaje de saca hacia el mercado lo que significa mayores ingresos económicos.

iii. Impactos sociales

Los resultados serán difundidos a nivel de los productores de la región para su implementación, lo que beneficiara a gran número de productores alpaqueros.

IV. Impactos ambientales

Los resultados de la investigación no tendrán ningún efecto negativo ambiental, ya que al conservar los mejores animales se tendrá en cuenta una implementación adecuada con el cuidado necesario de la vegetación para el pastoreo.



VIII. Recursos necesarios:

Equipos:

Microscopio
Platina (temperatura)
Cámara Neubauer.
Filmadora
Cámara fotográfica
Laptop
Equipo de protoscopio.

Materiales de campo:

Indumentaria
Sogas
Infraestructura:
Mangas de aparto
Dormideros
Campos de pastoreo.

Material de escritorio

Libretas de campo
Lapiceros
Papel bond

IX. Localización del proyecto.

El trabajo de investigación se realizará en el Centro Experimental “Chuquibambilla” dependencia de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, ubicado a 4237 metros de altitud y temperatura fluctuante de $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $9.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una precipitación pluvial de 525.7 mm (SENAMHI 2018), ubicado en el distrito de Umachiri - Melgar Puno.

La evaluación de semen se realizará en el laboratorio de “reproducción” del centro experimental, así mismo se complementará con replicas en los laboratorios de la Estación Experimental de Marangani- Sicuani Cusco, dependencia de la Universidad nacional Mayor de San Marcos.



X. Cronograma de actividades

Actividad	Trimestres												
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Presentación del proyecto	X												
Trabajo experimental		X	X	X	X								
Análisis en laboratorio						X	X	X					
Procesamiento de datos y redacción artículo									X	X	X		
Presentación del informe final													X

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Viáticos	02 personas	1,500.00		1,500.00
Materiales de campo	varios	2,500.00		2,500.00
Reactivos	varios	1,000.00		1,000.00
Materiales -laborat.	varios	3,500.00		3,500.00
Mater. de escrit..	varios	1,500.00		1,500.00
Imprevistos		1,000.00		1,000.00
Total				11,000.00