

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

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA**



---

---

**“MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA DEL ESPERMATOZOIDE DE VICUÑA  
(*Vicugna vicugna mensalis*)”**

---

---

Tesis presentada por el Bachiller en Ciencias Agrarias:  
**OLGER PUELLES LOAYZA**, para optar al Título Profesional  
de **INGENIERO ZOOTECNISTA**.

**ASESORES:**

**Ing. MSc. HERNAN CARLOS CUCHO DOLMOS**

**MVZ. LEONIDAS COILA APAZA**

**K'AYRA - 2019**

## DEDICATORIA

*A Dios y a mis padres:*

*Rosa y Lázaro*

*Con todo mi cariño y amor,  
porque hicieron todo en la  
vida para lograr mis sueños,  
por motivarme y darme la mano  
en todo momento de mi vida; a  
ustedes, por siempre mi  
corazón y mi agradecimiento  
más profundo.*

*A mis hermanas July y  
Lucero, con mucho aprecio, por  
estar siempre en los momentos  
más necesitados, por apoyarme  
en los momentos difíciles y  
también por esos momentos  
buenos que compartimos y  
seguiremos compartiendo.*

*De manera especial para mi  
hija Gi angel a Puell es N.*

## **AGRADECIMIENTO**

Deseo expresar mi agradecimiento y reconocimiento a la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, a todos y cada uno de los docentes de la Escuela Profesional de Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agrarias; por el apoyo, tiempo, amistad y conocimientos que me transmitieron.

A mis asesores: Ing. MSc. Hernán Cucho Dolmos, MVZ. Leonidas Coila Apaza e Ing. Nancy Frinee Huanca Marca, por sus asesoramientos y orientaciones en el proceso experimental, análisis de datos y culminación del presente trabajo de investigación.

A mis amigos y compañeros de la Universidad del Código 2010- I: Wini, Rosalio Kuaquira, Ruth, Mario, Juan Carlos, Danny, Elizabeth, Medalit, Hernán Quispe, Hernán Labra, Grober, Norma, Isabel etc.; y compañeros tesisistas que me apoyaron; quienes me acompañaron durante los difíciles y gratos momentos en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) - LA Raya - UNSAAC.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>II</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>X</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>XI</b>
<b>PLANTEAMIENTO DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>1</b>
<i>Descripción del Problema</i> .....	<b>1</b>
<b>CAPITULO I</b> .....	<b>2</b>
<b>OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1. OBJETIVO GENERAL .....	<b>2</b>
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	<b>2</b>
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>4</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	<b>4</b>
2.1.1. <i>Morfología espermática</i> .....	<b>4</b>
2.2. MARCO TEÓRICO.....	<b>8</b>
2.3. MÉTODOS DE COLECCIÓN DEL SEMEN DE VICUÑA .....	<b>16</b>
2.3.1. <i>Mecanismo de eyaculación</i> .....	<b>16</b>
2.3.2. <i>Técnicas andrológicas</i> .....	<b>17</b>
2.3.3. <i>Evaluación genital y biometría testicular</i> .....	<b>17</b>
2.3.4. <i>Electroeyaculación</i> .....	<b>18</b>
2.4. EVALUACIÓN DEL SEMEN.....	<b>19</b>

2.4.1. <i>Características Macroscópicas</i> .....	19
2.4.2. <i>Características Microscópicas</i> .....	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
3.1. <i>DEL LUGAR DE ESTUDIO</i> .....	22
3.1.2. <i>Condiciones ambientales del lugar de estudio</i> .....	23
3.2. MATERIALES Y EQUIPOS .....	24
3.2.1. <i>Materiales Biológicos</i> .....	24
3.2.2. <i>Equipos y Materiales para la Colección de Semen</i> .....	24
3.2.3. <i>Materiales de laboratorio para el análisis de espermatozoide</i> .....	27
3.2.4. <i>Reactivos e Insumos</i> .....	28
3.2.4. <i>Equipos y Materiales de Escritorio</i> .....	28
3.3. INSTALACIONES.....	29
3.4.1. <i>Selección de los Animales</i> .....	30
3.5. COLECCIÓN DE SEMEN.....	32
3.5.1. <i>Por el Método de Electroeyaculación</i> .....	32
3.6. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE LA VICUÑA.....	33
3.6.1. <i>Evaluación Macroscópica</i> .....	33
3.6.2. <i>Evaluación microscópica</i> .....	34
3.6.2.2. <i>Morfometría espermática</i> .....	34
3.7. DISEÑO ESTADÍSTICO PARA EVALUACIÓN DE LOS SEMEN DE VICUÑA .....	36
3.7.1. <i>Para las características macroscópicas del espermatozoide</i> .....	36
3.7.2. <i>Para las características microscópicas del espermatozoide</i> .....	37
<b>CAPITULO IV.....</b>	<b>38</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>38</b>
4.2. EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE DE LA VICUÑA .....	39
4.2.1. <i>Morfología del Espermatozoide de Vicuña con el Trumorph</i> .....	39
4.2.2. <i>Morfología del Espermatozoide con la Tinción Hemacolor</i> .....	40
4.3. EVALUACIÓN DE LA MORFOMETRÍA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DE VICUÑA .....	42
4.2.2. MORFOMETRÍA DE LA FORMA DE LA CABEZA DE ESPERMATOZOIDES DE LA VICUÑA.....	43
4.4. MORFOMETRÍA ESPERMÁTICA DE LA PIEZA INTERMEDIA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE VICUÑA	43

<b>CAPITULO V.....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>45</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Parámetros de morfometría de los valores de la cabeza del espermatozoide de vicuña ...6	6
<b>Tabla 2.</b> Caracterización morfométrica de la cabeza de espermatozoide de alpaca .....6	6
<b>Tabla 3.</b> Media, desviación estándar y coeficiente de variabilidad de parámetros morfométricos del espermatozoide de alpacas .....7	7
<b>Tabla 4.</b> Media, desviación estándar y coeficiente de variabilidad de parámetros morfométricos del espermatozoide de llamas .....8	8
<b>Tabla 5.</b> Promedio y desviación estándar del volumen eyaculado en vicuñas colectadas por electroeyaculación.....20	20
<b>Tabla 6.</b> Color de eyaculado de semen en vicuñas colectado por Electroeyaculación.....20	20
<b>Tabla 7.</b> Características microscópicas del semen de vicuñas obtenidas por electroeyaculación ..21	21
<b>Tabla 8.</b> Características microscópicas del semen de vicuñas obtenidas por electroeyaculación ..21	21
<b>Tabla 9.</b> Peso vivo (kg) y tamaño testicular (mm) de vicuña capturas en el cerco de Chullunkiani (La Raya).....31	31
<b>Tabla 10.</b> Volumen (ml) seminal de vicuña colectadas por el método de Electroeyaculación.....38	38
<b>Tabla 11.</b> Color seminal de vicuña colectadas por el método de electroeyaculación .....39	39
<b>Tabla 12.</b> Morfología de espermatozoides de 3 vicuña en porcentajes con Trumorph®.....40	40
<b>Tabla 13.</b> Morfología de la cabeza de espermatozoide de vicuña con tinción Hemacolor. ....41	41
<b>Tabla 14.</b> Morfométrica de la cabeza de espermatozoides de vicuña .....42	42
<b>Tabla 15.</b> Morfometría de la forma de la cabeza del espermatozoide de vicuña .....43	43
<b>Tabla 16.</b> Morfometría de la pieza intermedia de la cabeza del espermatozoide de vicuña .....44	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación de la morfología de la cabeza de espermatozoide de alpaca: piriformes, cortos, normales, redondeados y largos (Buendía et al., 2002) .....5	5
<b>Figura 2.</b> Sistema nervioso relacionado al mecanismo de eyaculación (Bhasin y Benson, 2006) ..17	17
<b>Figura 3.</b> Centro de investigación de camélidos sudamericanos (CICAS)" La Raya .....22	22

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>Foto 1.</b> Paisaje característico de la ecorregión puna (CICAS-La Raya) .....	23
<b>Foto 2.</b> Materiales para la colecta por electroeyaculación .....	24
<b>Foto 3.</b> Materiales para el análisis de espermatozoides .....	27
<b>Foto 4.</b> Equipos de laboratorio utilizados en la evaluación .....	28
<b>Foto 5.</b> Reactivos utilizados para la morfometría espermática .....	28
<b>Foto 6.</b> Arreglo del cerco perimétrico de Chullunkiani (La Raya).....	29
<b>Foto 7.</b> Chak'u de vicuña CICAS La Raya .....	30
<b>Foto 8.</b> Animales capturas en el cerco de Chullunkiani (La Raya).....	31
<b>Foto 9.</b> Medición del testículo de la vicuña con vernier digital .....	32
<b>Foto 10.</b> Electroeyaculación de vicuña CICAS La Raya .....	33
<b>Foto 11.</b> Tinción Hemacolor (solución I, II, III) y realizado el protocolo de la tinción. ....	35
<b>Foto 12.</b> Espermatozoide de vicuña (a) normal, (b) curva mitad del fragmento, (c) pieza parcialmente doblada, (d) y (e), pieza intermedia doblada, (f) y (g) cola enrollada, evaluadas con el Trumorph®.....	39
<b>Foto 13.</b> Caracterización morfología de espermatozoides de vicuña determinadas empleando la tinción Hemacolor (a); piriformes (b); cortos (c); normales, (d), redondos (e) largos. ....	41

## GLOSARIO

ALH	: Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza ( $\mu\text{m}$ )
BCF	: Espermatozoide Frecuencia de batida de la cabeza (Hz)
CASA	: Computer Assisted Sperm Análisis
CV	: Coeficiente de Variabilidad
DCD	: Desviación de los conductos deferentes
DMFA	: Dimetilformalmida
GAG	: Glicosaminoglicanos
HOST	: Hipoosmotic swelling test
EE	: Electroeyaculación
ISAS®	: Sistema integrado de análisis de semen
LIN	: Índice de linealidad (%)
MOsm	: Miliosmoles
SAS	: Statistical Analysis system
ABD	: Agua bidestilada
CMF	: Curva mitad del fragmento
PI	: Pieza intermedia
PID	: Pieza intermedia doblada

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación "Morfología y morfometría del espermatozoide de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*), se realizó en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos CICAS – La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicado en Marangani – Canchis – Cusco; se ejecutó entre agosto y octubre 2017. El objetivo fue determinar la morfología y morfometría y pieza intermedia del espermatozoide de vicuña, colectado por electroeyaculación, para lo cual se realizó la colección de 3 vicuñas, evaluándose la morfología y morfometría empleando el Integrated Semen Analysis System – (ISAS). Se realizó la estadística descriptiva de las variables estudiadas. El volumen promedio colectado fue de  $1,83 \pm 0,42$  ml, con un 75% de color blanco cristalino. Evaluando la morfología de la cabeza de los espermatozoides de vicuña con el Trumorph, se obtuvo un 43,61% de espermias normales, la diferencia mostraba gotas proximales, fragmento en la mitad curva, pieza proximal doblada, pieza intermedia doblada y cola enrollada. Las formas predominantes encontradas fueron los espermias normales (60,80%), redondeados (17,42%) y estrechos (12,70%), en menor proporción se hallaron espermias cortos y piriformes. Se halló que las medidas de la cabeza del espermatozoide fue 4,75  $\mu\text{m}$  de longitud; 3,04  $\mu\text{m}$  de ancho; 11,89  $\mu\text{m}^2$  de área, 14,96  $\mu\text{m}$  de perímetro, con un 47,8% de acrosoma, también se hallaron las variables de forma de la cabeza: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad. La pieza intermedia del espermatozoide tiene una anchura de 1,34  $\mu\text{m}$ , un área de 2,86  $\mu\text{m}^2$ , una distancia de inserción de 0,273  $\mu\text{m}$ , y un ángulo inserción de 12,71 grados.

## INTRODUCCIÓN

La vicuña es un camélido silvestre cuya población se viene recuperando de la condición de especie en extinción, y que ha sido muy poco estudiada, sobre todo en el aspecto reproductivo y de la fisiología de su espermatozoide (Enciso, 2009).

La exactitud de la valoración de la morfometría del espermatozoide, depende del método de tinción, la habilidad para teñir y la fijación de los espermatozoides (Menkveld, 2007). En vicuñas son escasos los reportes objetivos de la determinación de la morfometría de sus espermatozoides con un sistema CASA, además su morfología no ha sido estudiada usando el Trumorph®, lo cual sería importante en posteriores estudios en esta especie.

Para realizar estudios sobre la morfometría, morfología, de los espermatozoides de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*), de principio, es necesario realizar una buena colección de espermatozoides; sin embargo, esto representa un problema debido a la naturaleza del semen y al hecho de ser una especie silvestre, siendo en estos casos el método más recomendado el de Electroeyaculación (Menkveld, 2007).

Debido a que son escasos los reportes sobre los parámetros microscópicos de esta especie, en este caso de la morfología y morfometría, del espermatozoide de la vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*), se ha visto por conveniente realizar el presente estudio, con el cuál se acrecentará la información de la fisiología reproductiva de la vicuña.

## PLANTEAMIENTO DE INVESTIGACIÓN

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### Descripción del Problema

Debido a que los camélidos sudamericanos son especies en la cual la colección de semen es muy complicada, hasta la fecha no existe una técnica universal para hacerla, más aún en la vicuña, que es una especie silvestre, ello se torna más complicado; es por ello que son escasos los reportes sobre la morfometría y morfología del espermatozoide de la vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*), trabajo que planteamos realizar empleando un equipo CASA, el Integrated Semen Analysis System – ISAS, que nos permitirá obtener los diferentes parámetros morfométricos del espermatozoide de la vicuña como son su: largo, ancho, perímetro, área, porcentaje de acrosoma, área y ángulo de inserción de la pieza intermedia, entre otros, que nos permitirá tener una caracterización objetiva del espermatozoide de esta especie.

De igual forma, también los reportes sobre la morfología del espermatozoide de la vicuña son limitados, estudio que realizaremos empleando una nueva técnica, sin la necesidad de usar tinciones con el Trumorph.

## CAPITULO I

### OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

#### 1.1. Objetivo general

Determinar la morfología y morfometría del espermatozoide de vicuña colectado por electroeyaculación.

#### 1.2. Objetivos específicos

- Determinar el volumen y color del semen de vicuña colectado por electroeyaculación
- Determinar la morfología del espermatozoide de vicuña colectado por electroeyaculación
- Determinar los parámetros morfométricos de la cabeza de los espermatozoides de vicuña (área, perímetro, largo, ancho, elipticidad, rugosidad, elongación, regularidad, % acrosoma).
- Determinar los parámetros morfométricos de la pieza intermedia de los espermatozoides de vicuña (área, ancho, ángulo y distancia de inserción).

#### 1.3. Justificación

El presente estudio surge en razón que son escasos los estudios sobre la morfometría y la morfología del espermatozoide de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*) empleando un sistema CASA (Análisis computarizado de semen), el cual nos permitiría conocer su área, perímetro, largo, ancho, elipticidad, rugosidad, elongación, regularidad, etc. del espermatozoide de esta especie; tampoco se tienen reportes del análisis de la morfología del esperma de la vicuña usando el Trumorph®, que es una nueva técnica que nos permite trabajar en células espermáticas sin ser teñidas.

Los resultados del estudio, nos permitirá mejorar el conocimiento de estas dos características de los espermatozoides de las vicuñas (morfología y morfometría), información que posteriormente podrá servir para la conservación de esta especie, ya que tanto lo morfología como la morfometría, son muy importantes en relación a la fertilidad del espermatozoide.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

##### 2.1.1. Morfología espermática

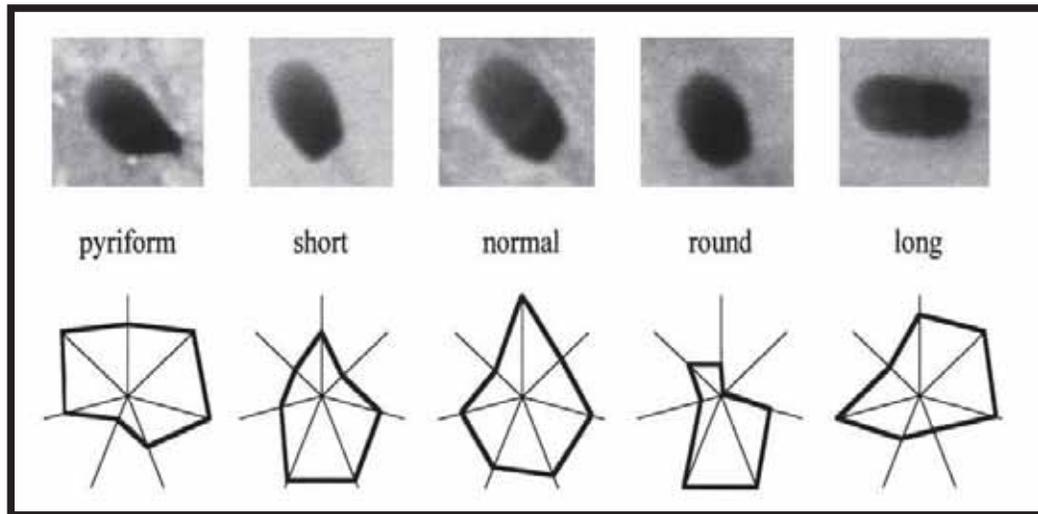
Enciso (2009), trabajando en vicuñas, halló 62,77% de espermatozoides normales y 37,23% de espermatozoides anormales, en éstos los defectos de la cabeza fueron de 13%, la presencia de gota citoplasmática 5 %, y los defectos de cola 19 %, para su estudio empleo la coloración de Papanicolau, en un equipo CASA, el Sperm Class Analyzer.

Pacheco *et al.*, (2011), colectando semen de vicuña por electroeyaculación halló 13% de espermatozoides anormales.

Giuliano *et al.*, (2013), colectando semen de vicuñas por electroeyaculación, en relación a la morfología de la cabeza del espermatozoide, halló que el 66 – 75 % mostraban cabezas normales, las cabezas anormales eran el 4 – 6 %, las cabezas sueltas fluctuaban del 0 - 6 %, la cola enrollada estaba entre el 6 - 14 %, la presencia de gota citoplasmática iba del 7- 13 %. Consideraba los espermatozoides morfológicamente normales a aquellos que no tenían ninguna de las siguientes características: cabeza con morfología anormal, cabeza suelta, cola enrollada o gota citoplasmática. Para este trabajo empleó espermatozoides coloreados con eosina.

Buendía *et al.*, (2002), evaluó la morfología del esperma de alpaca, empleando la tinción Hemacolor, y empleando un sistema CASA, encontró 50% de espermatozoides normales, 26% de pequeños y 24% de grandes, en relación al tamaño de la cabeza. Según la forma de la cabeza, los espermatozoides fueron clasificados

en 5 categorías: normales 47%, piriformes 3%, cortos 20%, redondos 1% y largos 29%, dichas formas se muestran en la figura 1.



**Figura 1.** Representación de la morfología de la cabeza de espermatozoide de alpaca: piriformes, cortos, normales, redondeados y largos (Buendía et al., 2002)

### 2.1.2. Morfometría espermática

Enciso (2009), empleando el SCA (Sperm Class Analyzer), encontró los siguientes resultados, en espermatozoides de vicuña.

**Tabla 1.** Parámetros de morfometría de los valores de la cabeza del espermatozoide de vicuña.

<b>Parámetros</b>	<b>Media</b>	<b>D.S</b>
<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	12,90	0,97
<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	14,39	0,22
<b>Longitud (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	5,29	0,08
<b>Ancho (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	2,90	0,06

Fuente: Enciso (2009)

Giuliano *et al.*, (2013), evaluó la morfometría de 156 núcleos coloreados con la reacción de Feulgen se obtuvieron las siguientes medidas: área  $11,10 \pm 1,49 \mu\text{m}^2$ , perímetro  $12,80 \pm 0,87 \mu\text{m}$ ; diagonal mínima  $2,83 \pm 0,37 \mu\text{m}$ , y la diagonal máxima  $4,96 \pm 0,37 \mu\text{m}$ . Todos los parámetros mencionados corresponden a la sección máxima del núcleo.

Buendía *et al.*, (2002), empleando el Sperm Class Analyzer (SCA), obtuvo los siguientes resultados en espermatozoides de alpaca.

**Tabla 2.** Caracterización morfométrica de la cabeza de espermatozoide de alpaca

<b>Características</b>	<b>Promedio</b>	<b>S.D.</b>	<b>CV (%)</b>
<b>Área (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	15,95	2,25	14,11
<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	15,11	1,22	8,08
<b>Elipticidad</b>	0,25	0,06	24
<b>Largo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	6,10	0,63	10,33
<b>Ancho (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	3,62	0,34	9,39

Fuente: Buendía *et al.*, (2002)

Huanca (2016), evaluó la morfometría del espermatozoide de alpaca con el Integrated Semen Analysis System – ISAS, obtuvo los siguientes resultados, para la región de la cabeza, forma de la cabeza, y pieza intermedia del espermatozoide (Tabla 3).

**Tabla 3.** Media, desviación estándar y coeficiente de variabilidad de parámetros morfométricos del espermatozoide de alpacas

<b>Región</b>	<b>Descripción</b>	<b>Unid</b>	<b>N</b>	<b>Med.</b>	<b>± D.S</b>	<b>C.V (%)</b>
<b>Cabeza</b>	<b>Longitud</b>	µm	653	5,486	0,46	8,37
	<b>Ancho</b>	µm	653	3,20	0,29	8,91
	<b>Área</b>	µm <sup>2</sup>	653	14,33	2,15	15,04
	<b>Perímetro</b>	µm	653	16,13	1,47	9,13
	<b>Acrosoma</b>	%	653	52,25	7,89	15,10
<b>Forma de cabeza</b>	<b>Elipticidad</b>		653	1,72	0,16	9,15
	<b>Rugosidad</b>		653	0,69	0,06	8,15
	<b>Elongación</b>		653	0,26	0,04	15,92
	<b>Regularidad</b>		653	0,97	0,04	4,22
<b>Pieza Intermedia (P.I)</b>	<b>Nivel de Gris</b>		653	140,32	11,84	8,44
	<b>Anchura (µm)</b>	µm	653	1,03	0,42	40,32
	<b>Área de P.I (µm<sup>2</sup>)</b>	µm <sup>2</sup>	653	2,40	0,66	27,61
	<b>Dist Inserción</b>	µm	653	0,16	0,11	66,00
	<b>Ang Inserción</b>	(°)	653	7,06	6,11	86,42

Fuente: Huanca (2016)

Gallegos (2019), ha determinado la morfometría del espermatozoide de llama mediante el ISAS ® (Tabla 4).

**Tabla 4.** Media, desviación estándar y coeficiente de variabilidad de parámetros morfométricos del espermatozoide de llamas

Región	Descripción	Unid	N	Med.	± D.S	C.V (%)
Cabeza	Longitud	µm	8866	5,21	0,41	7,86
	Ancho	µm	8866	3,17	0,27	8,66
	Área	µm <sup>2</sup>	8866	13,70	1,67	12,19
	Perímetro	µm	8866	16,75	1,51	6,47
	Acrosoma	%	8866	51,19	6,47	12,64
Forma de cabeza	Elipticidad		8866	1,65	0,16	9,84
	Rugosidad		8866	0,62	0,07	12,00
	Elongación		8866	0,24	0,05	18,60
	Regularidad		8866	0,95	0,05	4,94
Pieza Intermedia (P.I)	Nivel de Gris		8866	123,10	18,49	15,02
	Anchura	µm	8866	1,39	0,37	26,84
	Área de P.I	µm <sup>2</sup>	8866	2,94	0,82	27,84
(P.I)	Dist Inserción	µm	8866	0,23	0,17	77,25
	Ang Inserción	(°)	8866	9,50	10,99	115,66

Fuente: Gallegos (2019)

## 2.2. MARCO TEÓRICO

### 2.2.1. GENERALIDADES DE LA VICUÑA

La vicuña (*Vicugna vicugna*), es un mamífero silvestre, que pertenece al grupo de los camélidos sudamericanos (CSA), habita a gran altura, entre los 3.200 y 4.600 metros sobre el nivel de mar, donde la tensión de oxígeno es baja, en zonas desérticas e inhóspitas con gran amplitud térmica entre el día y la noche, y vientos fuertes. La subespecie geográfica austral, *Vicugna vicugna vicugna*, habita en Argentina y se localiza en la región noroeste del país, desde los 22° hasta los 29°10' de latitud sur. La otra subespecie, de la zona norte (*Vicugna vicugna mensalis*), habita en cambio en regiones del norte de Chile y en Perú (Enciso, 2009)

La vicuña es un camélido silvestre cuya población se viene recuperando de la condición de especie en extinción, y que ha sido muy poco estudiada, sobre todo en el aspecto de reproducción, colección y evaluación de semen (Enciso, 2009).

## **2.2.2. ANATOMÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO**

### **2.2.2.1. Pene y prepucio**

Sumar (1983), indica que el pene es del tipo fibroelástico, llegando a medir en las alpacas 35 - 40 cm, describe como en el toro una "S" peneana, con la primera y segunda inflexión localizadas por delante de los testículos, a diferencia del toro que los tiene localizados por detrás de los testículos.

Franco *et al.*, (1981), señala que la punta del glande que es una proyección cartilaginosa firme, tiene una forma de gancho curvado ligeramente a la derecha, que sobre pasa a una proyección cónica rígida a la que se le ha llamado "prepucio uretral" de aproximadamente de un cm de largo; la forma del glande tiene que ver con la penetración del pene por los anillos del cérvix, para la deposición intrauterina profunda del semen.

### **2.2.2.2. Testículo**

Sumar (1983), señala que, en la alpaca adulta, los testículos se encuentran en la región inguinal; es un escroto no péndulo, sin cuello definido, formando un abultamiento sub – anal, tal como sucede en los cerdos, carnívoros, y roedores, y están cubiertos por la cola, con una orientación dorso caudal y ventro – craneal, normalmente ambos testículos son del mismo tamaño de forma ovoide y en algunos casos ligeramente globosos. Al nacimiento o poco tiempo después, los testículos son

pequeños, flácidos y de 0,5 cm de diámetro, ya deben hallarse en las bolsas escrotales

### **2.2.2.3. Epidídimo y conducto deferente**

Osorio y San Martín (1966), reportan que el epidídimo de la alpaca, como en otras especies animales, al examen macroscópico, se encuentra dividido en tres zonas diferentes, que son: Cabeza (voluminosa), cuerpo (delgado y aplanado) y cola.

El conducto deferente presenta dos porciones; una anterior muy delgada en su inicio (2 mm), que continúa con la cola del epidídimo y que carece de glándulas, correspondiendo al conducto deferente propiamente dicho y una porción posterior cercana a la uretra, que muestra un ligero engrosamiento (4 mm), de aspecto glandular y que correspondería a lo que en otras especies es la ampolla del deferente (Osorio y San Martín, 1966).

### **2.2.2.4. Glándulas sexuales y 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).

#### **2.2.2.4.1 Próstata**

Tiene la forma de "H", estando ubicado dorsal y lateralmente sobre el cuello de la vejiga a  $10 \pm 2$  cm medida desde el ano. Está formada por el cuello prostático que comprenden dos lóbulos unidos y situados en el primer segmento de la uretra, la

glándula tiene un diámetro transversal aproximadamente de 4 cm y un 1 cm de grosor (Osorio y San Martin, 1966).

#### **2.2.2.4.2. Glándulas bulbo uretral**

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 Martin, 1966).

### **2.2.3. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN Y ESPERMATOZOIDE**

#### **2.2.3.1. Cabeza**

Hafez ESE y Hafez B (2002), señalan que la característica principal de la cabeza del espermatozoide es el núcleo aplanado oval, donde se encuentra la cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas.

#### **2.2.3.2. Acrosoma**

Hafez ESE y Hafez B (2002), señalan que el acrosoma es un saco membranoso de doble capa ubicado en el extremo anterior del núcleo espermático el cual se forma en las últimas etapas de la formación del espermatozoide. Esta estructura en forma de casquete contiene acrosina, hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas, los cuales participan en el proceso de fecundación, por otra parte, el segmento ecuatorial del acrosoma es importante, junto con el segmento anterior de la región post acrosómica

debido a que estos se fusionan con la membrana del oocito durante el proceso de la fecundación

### **2.2.3.3. Cuello**

En esta región se implanta el flagelo, el cual se origina del centriolo distal. El centriolo proximal está orientado oblicuamente hacia el eje de la cola (Alba, 1990).

### **2.2.3.4. Cola**

La cola de los espermatozoides de los mamíferos está formada por varios componentes funcionalmente dependientes. Aunque el tamaño y forma de estos componentes varía según las especies, su organización estructural es muy similar. La cola del espermatozoide puede dividirse en cuatro porciones anatómicas: el cuello o pieza de unión, la pieza intermedia, la pieza principal, y el segmento o pieza terminal, todas ellas rodeadas por una membrana plasmática común (Muiño, 2008).

Hafez ESE y Hafez B (2002), indican que la cola del espermatozoide está compuesta por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. La región comprendida entre el cuello y el anillo citoplasmático es el segmento medio. El centro del segmento medio, junto con toda la longitud de la cola comprende el axonema. El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos de manera periférica por numerosas mitocondrias. La vaina mitocondrial dispuesto en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de la cola, es la fuente de energía necesaria para la motilidad espermática. El axonema es el que proporciona motilidad al espermatozoide.

### **2.2.3.5. Semen**

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor macho, la porción líquida de dicha suspensión, que se forma durante el eyaculado, se conoce como plasma seminal (Garner y Hafez, 2002)

El semen es un líquido o suspensión celular semigelatinosa, que contiene los gametos masculinos o espermatozoides y la secreción de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino (Hafez, 2000)

Según Bearden y Fuquay (1982), el semen eyaculado está compuesto de espermatozoides y de plasma seminal; los testículos proveen los elementos celulares (espermatozoides) y 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 pequeña.

Giuliano *et al.*, (2013, y Enciso (2009), señalan que, en la obtención de semen de vicuña, éstas muestran bajas características seminales en comparación con los otros camélidos

### **2.2.3.6. Plasma Seminal**

Loomis (2006), indica que el plasma seminal consiste en una compleja mezcla de secreciones que se originan principalmente en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias del macho.

Töpfer-Petersen *et al.*, (2005), señalan que este cumple un rol de protección de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra (Troedsson *et al.*, 2005),

donde, por ejemplo, las proteínas presentes en el plasma seminal protegen selectivamente a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los polimorfonucleares neutrófilos presentes en el útero y, asimismo, juegan un rol importante en el transporte y eliminación de espermatozoides muertos.

#### ***2.2.3.7. Espermatogénesis***

Según Hafez (2000), la espermatogénesis es un proceso complejo que se compone de tres fases las cuales son: La espermatocitogénesis, fase que comprende el proceso por el cual las células germinales primordiales se convierten en espermátides; la fase siguiente es la espermiogénesis; fase en la cual las espermátides redondas se transforman en espermatozoides por una serie de cambios morfológicos y la última fase viene a ser la espermiación que es la liberación de las células germinales al interior de los túbulos seminíferos.

Para Aman (1970), la producción espermática de cada macho está relacionado proporcionalmente al tamaño de los testículos; así por ejemplo un solo testículo de toro con un peso de 350 gr, producirá aproximadamente 5,250 millones de espermatozoides por g de testículo y un testículo de alpaca producirá solamente 270 millones de espermatozoides diarios, aspecto este que debe considerarse al programarse los servicios de los machos.

#### ***2.2.3.8. Células espermáticas***

Hafez (1989), señala que los espermatozoides se forman en los tubos seminíferos de los testículos. Estos tubos contienen una serie compleja 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 contiene el aparato necesario para la motilidad celular. El espermatozoide entero está cubierto por el plasmolema o membrana plasmática. El acrosoma o casquete acrosómico, 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.

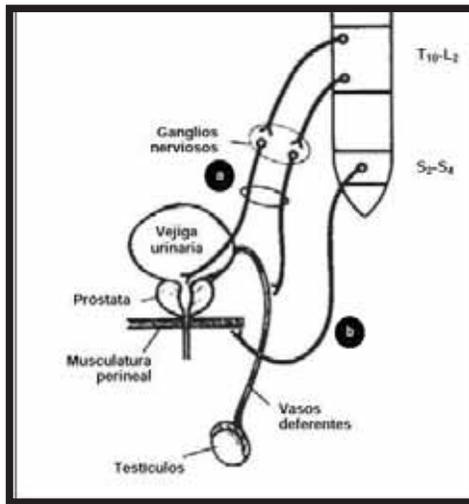
## **2.3. MÉTODOS DE COLECCIÓN DEL SEMEN DE VICUÑA**

### **2.3.1. Mecanismo de eyaculación**

Salisbury y van Demark (1961), indican que la eyaculación del semen resulta de la estimulación nerviosa que origina contracciones musculares, comenzando en el vaso eferente, pasando por el epidídimo, vaso deferente y glándulas accesorias.

McDonnell (1992), señala que la emisión es el resultado de la contracción de los músculos lisos de la pared de la cola del epidídimo, conducto deferente, ámpula, glándulas vesiculares, próstata y posiblemente, las glándulas bulbouretrales, con liberación de líquido seminal y semen en la uretra. Simultáneamente, el esfínter de la vejiga se cierra para prevenir la eyaculación retrógrada del fluido seminal en la vejiga (Benson, 1994). La eyaculación propiamente dicha es el resultado de contracciones rítmicas de los músculos estriados del cuerpo cavernoso, bulbo esponjoso y otros músculos pélvicos. Simultáneamente existe una contracción rítmica del esfínter anal.

La orina parece ser más problemática en el caso de colección de semen en camélidos y felinos, probablemente por la menor separación anatómica de las inervaciones controladoras de la eyaculación y micción en estas familias de mamíferos (Watson, 1978).



**Figura 2.** Sistema nervioso relacionado al mecanismo de eyaculación (Bhasin y Benson, 2006)

### 2.3.2. Técnicas andrológicas

Watson (1978) y Schneiders *et al.*, (2004), señalan que las técnicas andrológicas incluyen la evaluación y biometría testicular y la posterior obtención de los gametos, en este caso, la colección y evaluación del semen. Con respecto a la colección del semen, existen diferentes métodos de obtención del eyaculado en especies domésticas y silvestres: recolección post cópula, vagina artificial, masturbación y estimulación manual, estimulación vibratoria y electroeyaculación, este último método será descrito en extenso más adelante.

### 2.3.3. Evaluación genital y biometría testicular

Para, Rutter y Russo (2006), la evaluación genital comprende la inspección, palpación y medición de los diferentes órganos y componentes del aparato genital, tomando en cuenta: su presencia, desarrollo correspondiente a la madurez sexual, y analizando para cada uno de ellos, y donde correspondiese, forma, tamaño, simetría, posición,

consistencia, movilidad y sensibilidad. Esta evaluación incluye: escroto, testículos, epidídimo, cordones espermáticos, prepucio y pene.

#### **2.3.4. Electroeyaculación**

Según, Watson (1978), la electroeyaculación es de particular relevancia en la colección de semen de animales en los cuales es imposible de utilizar vaginas artificiales o estimulación manual, habiendo de resaltar que en la gran mayoría de los casos la técnica de electroeyaculación debe ser utilizada en animales anestesiados. De esta manera, puede ser fácilmente adaptada en animales silvestres.

Director *et al.*, (2004), describe que la electroeyaculación consistía en introducir un electrodo bipolar, a una longitud no mayor de 10 cm, en el recto del macho objeto de la colecta seminal manteniendo esta posición durante todo el tiempo que dure la aplicación de los estímulos; estos últimos eran aplicados en serie y a intervalos de tiempo definidos consiguiendo la erección del pene y la posterior eyaculación. Toda la operación dura entre 10 y 15 minutos, con considerables variaciones individuales. La obtención de muestras de semen con las ventajas de realizar la colección sin la necesidad de contar con hembras en celo, acortar el tiempo de colección y realizarla a lo largo de todo el año, antes de la colección se debe de realizar una ecografía transrectal para determinar la distancia ano - próstata, que es distinta para cada animal y posteriormente someter al animal a anestesia general con xilacina (0.2 mg/kg) y Ketamina (1.5 mg/Kg), para luego introducir el transductor, previa lubricación hasta la altura de la próstata y empezar los estímulos eléctricos, que tiene una duración de 6 a 12 minutos. Los voltajes se incrementan de 0.2 V, desde 2 V hasta 10 V, durando cada estímulo 3 s y en intervalos de 1 segundo de descanso.

## **2.4. EVALUACIÓN DEL SEMEN**

Según Zirena (2014), los eyaculados de los camélidos están caracterizados por un reducido volumen y baja concentración de espermatozoides comparando con otros animales de producción. Los parámetros como volumen, color, motilidad, concentración espermática, vitalidad y morfología son altamente variables entre machos y entre eyaculados colectados del mismo macho.

### **2.4.1. Características Macroscópicas**

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

#### **2.4.1.1. Volumen**

Fernández Baca y Novoa (1968), indican que 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, 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.

**Tabla 5.** Promedio y desviación estándar del volumen eyaculado en vicuñas colectadas por electroeyaculación.

<b>Autor</b>	<b>Prom (ml) ± D. S</b>
<b>Enciso (2009)</b>	0,85 ± 0,12
<b>Pacheco et al., (2011)</b>	0,40 ± 0,48

Fuentes: indicadas

#### **2.4.1.2. Color**

El color del semen de los camélidos sudamericanos ha sido descrito como blanco lechoso a blanco cristalino (Sumar, 2002). Aunque el color del semen podría depender de la concentración espermática y la proporción de la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Tibary y Vaughan, 2006); es predominantemente de color blanquecino ya sea colectado por electroeyaculación o por vagina artificial (Garnica *et al*, 1993).

**Tabla 6.** Color de eyaculado de semen en vicuñas colectado por Electroeyaculación

<b>Autor</b>	<b>Color de eyaculado</b>
<b>Enciso (2009)</b>	Blanco cristalino
<b>Pacheco et al., (2011)</b>	Blanco cristalino

Fuentes: indicadas

#### **2.4.2. Características Microscópicas**

Las características microscópicas como la movilidad, concentración, vitalidad y funcionalidad de la membrana espermática se muestran en las tablas 7 y 8, en ambos casos de colecciones de semen realizadas por electroeyaculación.

**Tabla 7.** Características microscópicas del semen de vicuñas obtenidas por electroeyaculación

<b>Características</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>
<b>Concentración (Millones spz/ml)</b>	6,25	6,30
<b>Vitalidad %</b>	24,78	18,77
<b>Motilidad %</b>	17,9	25,06
<b>Endosmosis%</b>	27,01	20,83

Fuente: (Pacheco *et al.*, 2011).

**Tabla 8.** Características microscópicas del semen de vicuñas obtenidas por electroeyaculación

<b>Parámetros</b>	<b>Media ± DS</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>PH</b>	7,09 ± 0,16	6,0	8,5
<b>Motilidad (%)</b>	28,08 ± 3,56	5,0	50
<b>Concentración espermatozoides (%)</b>	166,29 ± 60,92 x 10 <sup>4</sup>	1,8 x 10 <sup>4</sup>	782 x 10 <sup>4</sup>

Fuente: Enciso (2009)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. DEL LUGAR DE ESTUDIO

##### 3.1.1. Ubicación Geográfica

El estudio se realizó entre agosto de 2016 a enero de 2017; en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) "La Raya", de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC); situado en el Distrito de Marangani, Provincia de Canchis y Departamento del Cusco, dicho Centro está ubicado en las siguientes coordenadas:

- Latitud Sur. 14° 00' - 15° 45'
- Longitud Oeste. 69° 45' - 75° 00'
- Altitud. 4 130 m.s.n.m.
- Promedio de precipitación pluvial. 965 mm
- Temperatura promedio anual 6,54°C -13,5 °C



**Figura 3.** Centro de investigación de camélidos sudamericanos (CICAS)" La Raya

### 3.1.2. Condiciones ambientales del lugar de estudio

**Ecorregión:** se encuentra en la región puna

**Zona de vida natural:** Páramo húmedo – Subalpino subtropical (Pmh – Sas)

**Flora:** Constituida principalmente por asociaciones de gramíneas, con especies dominantes como: festucas, stipas y calamagrostis, existen también bofedales donde la vegetación dominante son las distichias, plantagos, juncus y scirpus.

**Hidrología:** Cuenta con recursos hídricos, provenientes de los deshielos del nudo del Vilcanota, estando entre los principales el Vilcanota y el Yanamayo. Existe un recurso de aguas superficiales como la laguna de Komerccochoa.



**Foto 1.** Paisaje característico de la ecorregión puna (CICAS-La Raya)

## 3.2. MATERIALES Y EQUIPOS

### 3.2.1. Materiales Biológicos

Se capturaron 3 vicuñas machos adultos, de 5 a más años de edad, con un peso promedio de 50,3 kg; previo examen clínico de los órganos genitales externos: testículo, pene y prepucio por medios propedéuticos, fueron sometidos a electroeyacuación, para coleccionar espermatozoides.

### 3.2.2. Equipos y Materiales para la Colección de Semen

#### 3.2.2.1. Para el método electroeyacuación

- Tips de 0,5 a 10 $\mu$ l.
- Dilutor Tris base.
- Papel toalla.
- Bisturí
- Sogas.
- Caja de Tecnopor
- Libreta de campo
- Tubos de ensayo.



**Foto 2.** Materiales para la colecta por electroeyacuación

### 3.2.3. Materiales de laboratorio para el análisis de espermatozoide

- Guantes quirúrgicos
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Micro pipeta de 0,5 – 10  $\mu$ l
- Tips de 0,5 – 10  $\mu$ l
- Balanza analítica de precisión.
- Aceite de inmersión.
- Alcohol isopropílico.
- Papel Bond.
- Lapiceros indelebles.
- Cuaderno



Foto 3. Materiales para el análisis de espermatozoides

### 3.2.4. Equipos y Materiales de Laboratorio

#### 3.2.3.1. Equipos

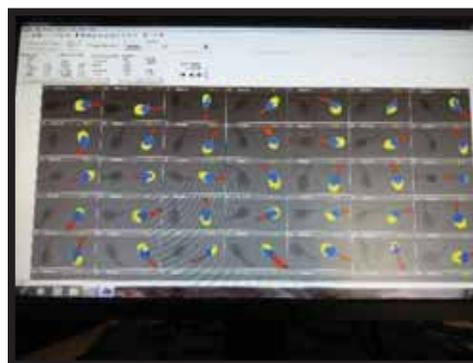
- Microscopio de contraste de fases, fluorescencia, platina térmica (UOP-UB200i) y videocámara (Proiser ISAS 782C).
- Computadora (con programa ISAS v.1.2).
- Software SAS (análisis estadístico).
- Trumorph
- Impresora.
- Cámara digital



**Foto 4.** Equipos de laboratorio utilizados en la evaluación

### 3.2.4. Reactivos e Insumos

- Dilutor: Tris, Ácido cítrico, Fructuosa.
- Agua Bidestilada (ABD)
- Coloración-tinción: Hemacolor,



**Foto 5.** Reactivos utilizados para la morfometría espermática

### 3.2.4. Equipos y Materiales de Escritorio

- Lapiceros.
- Cuaderno.
- Libros.
- Calculadora.
- Cronómetro.
- Plumones indelebles.
- Cinta masking.

- Computadora con paquete estadístico (SAS v.8).
- Cámara fotográfica.
- Laptop

### 3.3. INSTALACIONES

El chak'u, se realizó en el cerco de Chullunkiani, así como también la colección de semen por electroeyaculación; la valoración del semen se efectuó en el Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas del CICAS La Raya.



**Foto 6.** Arreglo del cerco perimétrico de Chullunkiani (La Raya)



**Foto 7.** Chak'u de vicuña CICAS La Raya

Previo al chak'u, se procedió a arreglar todo el cerco perimétrico que se encontraba en mal estado, para la captura se instaló un embudo con malla para hacer el arreo.

### **3.4. METODOLOGÍA**

#### **3.4.1. Selección de los Animales**

Los 3 machos capturados tenían un peso promedio de 50,3 kg, se hizo un clínico de los órganos genitales externos: testículo, pene y prepucio por medios propedéuticos, una vez aprobados éstos se realizó la colección de semen por electroeyaculación, y los animales fueron soltados.



**Foto 8.** Animales capturas en el cerco de Chullunkiani (La Raya)

**Tabla 9.** Peso vivo (kg) y tamaño testicular (mm) de vicuña capturas en el cerco de Chullunkiani (La Raya)

Número Animal	Peso vivo (kg)	Tamaño testicular (mm)			
		Izquierdo		Derecho	
		Largo	Ancho	Largo	Ancho
1	50	48,78	20,37	42,34	22,55
2	53	48,29	21,48	41,01	21,78
3	48	31,10	19,90	32,20	17,70
<b>Promedio</b>	<b>50,33</b>	<b>42,72</b>	<b>20,58</b>	<b>38,52</b>	<b>20,68</b>



**Foto 9.** Medición del testículo de la vicuña con vernier digital

### **3.5. COLECCIÓN DE SEMEN**

#### **3.5.1. Por el Método de Electroeyaculación**

Se utilizó 3 vicuñas machos que se capturaron en el chak'u realizado en el CICAS La Raya, sitio Chullunkiani.

Para la colección de semen por electroeyaculación el animal debe estar insensibilizado, por lo tanto, se suministró una dosis de Ketamina (2,5ml/100KgPV) y Xylazina (0,2 ml/20 kg) de acuerdo al peso vivo de cada vicuña por vía intravenosa; con un tiempo de caída aproximadamente de 25 a 30 segundos.

Se desechó semen contaminado con orina, el cual fue poco observado en este estudio.



**Foto 10.** Electroeyaculación de vicuña CICAS La Raya

### **3.6. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE LA VICUÑA**

#### **3.6.1. Evaluación Macroscópica**

##### **3.6.1.1. Volumen**

La colección de semen de las vicuñas se realizó en tubos falcón estériles y graduados en mililitros (ml), para facilitar la lectura del volumen del semen colectado, la lectura del volumen seminal se realizó por examen visual en los tubos graduados, que luego fueron atemperados en baño maría a 37°C.

##### **3.6.1.1. Color seminal**

El color seminal se determinó paralelamente al volumen a través de la observación directa.

## **3.6.2. Evaluación microscópica**

### **3.6.2.1. Morfología espermática**

La evaluación de la morfología espermática se realizó utilizando el Trumorph; después de la colección de semen se depositó 5µl de semen en un portaobjeto luego se puso un cubreobjetos, se introdujo dentro del Trumorph® (Proiser R+D, S.L., Paterna, Spain), donde la muestra es sometida a una presión de 7 Kpa y a una temperatura de 60°C.

La morfología espermática se evaluó en el Integrated Semen Analysis System - ISAS® (Proiser R+D, Paterna, Valencia, España) en el módulo de vitalidad, con el objetivo de 40X de contraste de fase negativo, se tomó fotografías a 200 espermatozoides por muestra y se clasificaron en espermatozoides en normales, piriformes, alargados, cortos y redondeados (Buendía *et al.*, 2002), que fueron establecidas para alpacas.

### **3.6.2.2. 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 morfometría espermática, para lo cual se tiñó la muestra con el colorante Hemacolor , previo a esto se rotuló el portaobjeto con los datos de la vicuña, luego se colocó a un extremo del porta objeto 5 µl del semen colectado con la ayuda de una micropipeta, y seguidamente se esparció la muestra con la ayuda de un portaobjeto generando un frotis, el frotis se dejó secar por 30 minutos. Una vez secas las láminas se procedieron a la tinción con Hemacolor de la siguiente manera.

- Se realizó 5 inmersiones durante 1 segundo cada inmersión en la solución I (solución fijadora) de la tinción Hemacolor.
- Se realizó 3 inmersiones durante 1 segundo cada inmersión en la solución II (reactivo de coloración rojo) de la tinción Hemacolor.
- Se realizó 6 inmersiones durante 1 segundo cada inmersión en la solución III (reactivo de coloración azul) de la tinción Hemacolor.
- Se drenó el excedente por gravedad y se dejó secar al aire durante 20 minutos.
- Se limpió en envés de la placa con algodón y alcohol, y se procedió con la evaluación en el módulo de morfometría del ISAS.

Se observó en el microscopio de contraste de fases con el lente de 100x, más aceite de inmersión, se realizó la captura manual de 220 espermatozoides como mínimo por animal.



**Foto 11.** Tinción Hemacolor (solución I, II, III) y realizado el protocolo de la tinción.

El módulo de morfometría de ISAS®, se 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.

### **3.7. DISEÑO ESTADÍSTICO PARA EVALUACIÓN DE LOS SEMEN DE VICUÑA**

Los resultados obtenidos de las características seminales tanto macroscópicas (volumen) y microscópicas (morfología y morfometría,) fueron evaluados en el ISAS v 1.2, los datos fueron sometidos a la prueba de la normalidad, para ver si los resultados se ajustaban a una distribución normal, se utilizó el test de Shapiro – Wilks, si había menos de 100 datos y el test de Kolmogorov – Smirnov, si el análisis se realizaba a más de 100 datos, se utilizó el paquete estadístico SAS v 8.0., para dichas evaluaciones.

#### **3.7.1. Para las características macroscópicas del espermatozoide**

Para el volumen seminal se aplicó estadística descriptiva con el procedimiento univariante del SAS v 8.0, se determinó el promedio, desviación estándar, coeficiente de variabilidad y rango de variación (mínimo y máximo del eyaculado).

En caso del color seminal se aplicó estadística descriptiva, donde se determinó el porcentaje de colores, en relación al color seminal encontrado en cada método de colecta, blanco lechoso y blanco cristalino en vicuñas.

### **3.7.2. Para las características microscópicas del espermatozoide**

#### **3.7.2.1. *Morfología y Morfometría espermática***

Para la morfología y morfometría se utilizó la estadística descriptiva, se determinó el porcentaje de la forma (normal, piriforme, estrecho, corto, redondeado, largo) de la cabeza de espermatozoide y la posición de la gota citoplasmática proximal (normales, reacción acrosomal, gota proximal, pieza intermedia doblada, cola enrollada y pieza parcialmente doblada). Para las variables morfométricas, también se empleó la estadística descriptiva.

Todos los análisis estadísticos, se realizaron con el SAS.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1. Evaluación macroscópica del semen de la Vicuña

##### 4.1.1. Volumen

La tabla 10 nos muestra el volumen de 3 vicuñas colectadas por método de electroeyaculación.

**Tabla 10.** Volumen (ml) seminal de vicuña colectadas por el método de Electroeyaculación.

n	Promedio (ml)	± D. S	C.V (%)	Min	Max
3	1,833	0,4163	22,709	1,50	2,30

Los valores hallados son similares a lo reportado por Giuliano *et al.*, (2013) de 1,0 – 2,5 ml, e inferior a lo reportado por Enciso (2009) de  $2,1 \pm 0,3$  ml, y superior a lo hallado por Pacheco *et al.*, (2011) de  $0.48 \pm 0.23$  ml. Las diferencias posiblemente se deban a los animales, sistema de manejo, cautiverio.

##### 4.1.2. Color

El color seminal se determinó paralelamente al volumen a través de la observación directa, utilizándose tubos falcón transparentes. El color seminal colectado fue blanco lechoso y blanco cristalino.

**Tabla 11.** Color seminal de vicuña colectadas por el método de electroeyaculación

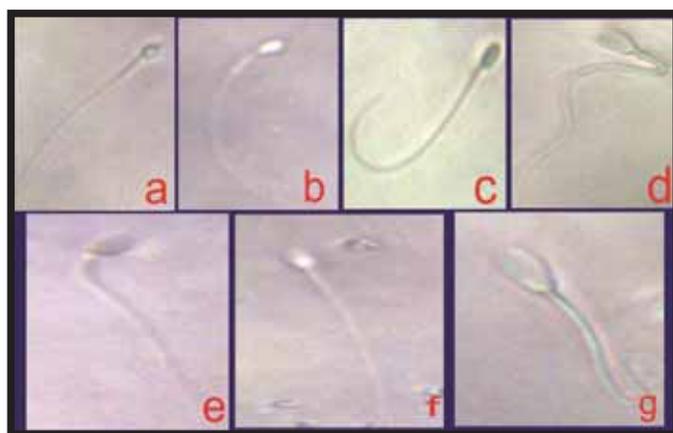
Color	%	Total (%)
Blanco lechoso	25	100
Blanco cristalino	75	

El color de semen de 3 vicuñas colectadas por electroeyaculación, es similar a los reportados por Enciso (2009), Pacheco *et al.*, (2011) y Giuliano *et al.*, (2013).

#### 4.2. Evaluación de la Morfología del Espermatozoide de la Vicuña

##### 4.2.1. Morfología del Espermatozoide de Vicuña con el Trumorph

Las formas de los espermatozoides de vicuñas, se muestran en la foto 12.



**Foto 12.** Espermatozoide de vicuña (a) normal, (b) curva mitad del fragmento, (c) pieza parcialmente doblada, (d) y (e), pieza intermedia doblada, (f) y (g) cola enrollada, evaluadas con el Trumorph®

En la tabla 12, se muestran los valores porcentuales de la morfología del espermatozoide de vicuña.

**Tabla 12.** Morfología de espermatozoides de 3 vicuña en porcentajes con Trumorph®

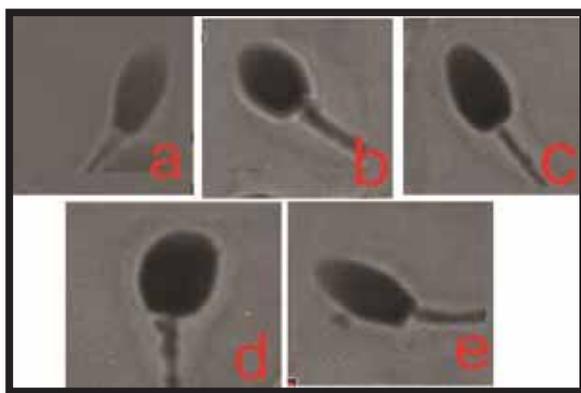
Vicuña	n° spz	Normal	Gota proximal	C.M.F.	P.P. doblada	P.I. doblada	Cola enrollada	%
1	625	42,40	15,20	17,92	10,56	12,32	1,60	100
2	363	46,01	16,53	14,05	12,40	9,64	1,38	100
3	147	42,86	8,16	28,57	8,16	8,84	3,40	100
<b>Promedio</b>		43,61	14,71	18,06	10,84	11,01	1,76	

C.M.F: Curva mitad del fragmento; P.P. Parcialmente Doblada: pieza parcialmente doblada; P.I. Doblada: pieza intermedia doblada.

El presente estudio los espermatozoides normales, muestran porcentajes inferiores a los reportados por Giuliano *et al.* (2013) de 56% - 75%; Enciso (2009) con 62,77 ± 1,96% y Pacheco con 86.62%, las diferencias probablemente se deban a las técnicas de coloración empleadas en estos estudios, versus un método que no tiñe el espermatozoide como es el Trumorph

#### **4.2.2. Morfología del Espermatozoide con la Tinción Hemacolor**

Los resultados de la morfología del espermatozoide de vicuña (Foto 13), evaluada con la tinción Hemacolor, se muestra en la tabla 13.



**Foto 13.** Caracterización morfología de espermatozoides de vicuña determinadas empleando la tinción Hemacolor (a); piriformes (b); cortos (c); normales, (d), redondos (e) largos.

**Tabla 13.** Morfología de la cabeza de espermatozoide de vicuña con tinción Hemacolor.

Animal	N° spz	FORMAS					%
		Normal	Piriforme	Estrecho	Corto	Redondeado	
1	927	60,73	1,73	12,84	7,12	17,58	100.00
2	577	63,26	2,25	11,79	5,72	16,98	100.00
3	126	50,00	3,97	15,87	11,90	18,25	100.00
<b>Promedio</b>		60,80	2,09	12,70	6,99	17,42	100.00

No se tienen referencias sobre estudios que hayan evaluado la forma de los espermatozoides de vicuñas; comparando con lo hallado por Buendía *et al.*, (2002) en alpacas, las proporciones son diferentes en cuanto a los espermatozoides normales 60,80 contra 47%, o los cortos de 6,99% contra 20% hallados por Buendía *et al.*, (2002).

### 4.3. Evaluación de la morfometría de la cabeza del espermatozoide de vicuña

En la tabla 14, se muestra la morfometría de la cabeza del espermatozoide de vicuña, por cada animal evaluado.

**Tabla 14.** Morfométrica de la cabeza de espermatozoides de vicuña

Descripción	N	Prom.	± D. S	C.V (%)	Min	Max
Longitud (µm)	1454	4,747	0,470	9,970	3,467	6,027
Ancho (µm)	1454	3,040	0,310	10,280	2,257	3,940
Área (µm <sup>2</sup> )	1454	11,887	1,747	14,843	7,710	16,897
Perímetro (µm)	1454	14,960	1,617	10,807	10,783	20,083
% de Acrosoma	1454	47,797	8,760	18,210	17,230	62,120

Las medidas del perímetro y ancho de la cabeza del espermatozoide, halladas por Enciso (2009), son similares a la del presente trabajo; y el área y longitud que hallamos son menores a las que reporta este investigador. Giuliano *et al.*, (2013) reporta medidas similares de área, longitud y ancho de la cabeza del espermatozoide; pero sus medidas del perímetro son menores. Las diferencias entre estos estudios se deben a las diferentes tinciones usadas y al tipo de análisis que se usó para evaluar dichas medidas. No se hallan reportes del porcentaje que ocupa el acrosoma en la cabeza del espermatozoide de vicuña.

#### 4.2.2. Morfometría de la forma de la cabeza de espermatozoides de la vicuña.

En la tabla 15, se muestra la información de las medidas de variables adimensionales de forma de la cabeza del espermatozoide de vicuña.

**Tabla 15.** Morfometría de la forma de la cabeza del espermatozoide de vicuña

Descripción	N	Prom.	± D. S	C.V (%)	Min	Max
<b>Elipticidad</b>	1454	1,570	0,173	10,903	1,100	2,230
<b>Rugosidad</b>	1454	0,677	0,090	13,090	0,410	0,877
<b>Elongación</b>	1454	0,220	0,053	23,847	0,047	0,380
<b>Regularidad</b>	1454	0,957	0,053	5,500	0,807	1,220

No existen reportes sobre las medidas adimensionales de la forma de la cabeza de los espermatozoides de vicuña, comparando con trabajos realizados en alpacas, dichos valores son inferiores a los reportados por López (2014), y Huanca (2016), y similares a lo hallado por Gallegos (2019) en espermatozoides de llama.

#### 4.4. Morfometría espermática de la pieza intermedia de los espermatozoides de vicuña

Las medidas morfométricas de la pieza intermedia del espermatozoide de vicuña, se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16.** Morfometría de la pieza intermedia de la cabeza del espermatozoide de vicuña

<b>Descripción</b>	<b>N</b>	<b>Prom.</b>	<b>± D. S</b>	<b>C.V (%)</b>	<b>Min</b>	<b>Max</b>
<b>Anchura (µm)</b>	1454	1,340	0,467	34,883	0,620	2,913
<b>Área de P.I (µm<sup>2</sup>)</b>	1454	2,863	0,813	28,707	1,133	5,893
<b>Dist Inserción (µm).</b>	1454	0,273	0,203	73,523	0,017	1,437
<b>Ang Inserción (°).</b>	1454	1,492	0,494	45,704	0,590	3,414

No existen reportes sobre las medidas de la pieza intermedia del espermatozoide de la vicuña, comparando con trabajos realizados en alpacas, dichos valores son inferiores a los reportados por López (2014), y Huanca (2016), y también son inferiores a lo hallado por Gallegos (2019) en espermatozoides de llama.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

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

1. El volumen promedio colectado fue de  $1,83 \pm 0,42$  ml, con un 75% de color blanco cristalino.
2. Evaluando la morfología de la cabeza de los espermatozoides de vicuña con el Trumorph, se obtuvo un 43,61% de espermatozoides normales, la diferencia mostraba gotas proximales, fragmento en la mitad curva, pieza proximal doblada, pieza intermedia doblada y cola enrollada.

Las formas predominantes halladas fueron los espermatozoides normales (60,80%), redondeados (17,42%) y estrechos (12,70%), en menor proporción se hallaron espermatozoides cortos y piriformes.

3. Se halló que las medidas de la cabeza del espermatozoide fue  $4,75 \mu\text{m}$  de longitud;  $3,04 \mu\text{m}$  de ancho;  $11,89 \mu\text{m}^2$  de área,  $14,96 \mu\text{m}$  de perímetro, con un 47,8% de acrosoma, también se hallaron las variables de forma de la cabeza: elipticidad, rugosidad, elongación y regularidad,
4. La pieza intermedia del espermatozoide tiene una anchura de  $1,34 \mu\text{m}$ , un área de  $2,86 \mu\text{m}^2$ , una distancia de inserción de  $0,273 \mu\text{m}$ , y un ángulo inserción de 12,71 grados.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios completos sobre parámetros seminales de vicuña.
2. Utilizar el método de electroeyaculación para la colección de semen en vicuñas, ya que este método es el más adecuado en animales silvestres y en extinción.
3. Realizar mayor número de muestras para evaluar las características microscópicas del semen de vicuñas.
4. Determinar los efectos de edad en la morfometría de la cabeza de espermatozoide en vicuñas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alba R. 1990. Maduración sexual del cuy domestico macho. Cochabamba: Universidad Mayor de San Simón.
2. Amann, R. 1970, Sperm production rates. In the testis vol I. Eds. Jhonson W, R. Gomes and N.L. Van Demark (eds) N.Y. Academic Press.
3. Bearden, J.; Fuquay, J. 1982. Reproducción animal aplicada. Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México.
4. Benson G.S. 1994. Male sexual function: erection, emission, and ejaculation. En: Knobill E. y J.D. Neill (eds.). The Physiology of Reproduction. 2nd ed. Raven Press, New York. Estados Unidos. p.1489-1506.
5. Buendía P, Soler C, Paolicchi F, Gago G, Urquieta B, Pérez – Sánchez F, Bustos – Obregón E. 2002. Morphometric chractrization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm Class Analyzer computer – assited system. Theriogenology 57: 1207 - 1218
6. 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
7. Director, A., Giuliano, S., Miragaya, M., 2004. Evaluation of llama (*Lama glama*) semen obtained by electroejaculation or using an artificial vagina. Proceedings 15th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). 216.
8. Enciso, M. 2009. Reproducción en la vicuña macho: evaluación de la contención química, colección de semen, evaluación del eyaculado y biometría testicular. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

9. Fernández Baca, S.; Novoa, C. 1968. Primer Ensayo de Inseminación Artificial de Alpacas (*Lama pacos*) con Semen de Vicuña (*Vicugna vicugna*). Revista FMV. UNMSM 22.9-17. Perú.
10. 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.
11. Gallegos M. 2019. Determinación de las características macroscópicas, microscópicas y subpoblaciones espermáticas del semen de llama (*Lama glama*) colectado por electroeyaculación y vagina artificial. Tesis Ingeniero Zootecnista. UNSAAC, Cusco Perú.
12. Garner D.L. y Hafez ESE. 2002. Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E. S. E., Hafez B., eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7a ed. México: McGraw Hill Interamericana. p. 98-112.
13. Garnica J., Achata R. y Bravo W. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science* 32: 85-90.
14. Giuliano, S.M, Spirito, S.E, Miragaya, M.H; Rutter, B, Agüero, A; Capdevielle, E.F ; Ferrari, M.R. 2013. Aparato reproductor y parámetros seminales de vicuña (*Vicugna vicugna vicugna*). *InVet*, 15: 47- 75
15. Hafez E. S. E. y Hafez B. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Editorial McGraw-Hill Interamericana; Séptima edición.
16. Hafez E.S.E. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales, Traducido por: Roberto Palacios Martínez, Sexta Edición, Editorial Interamericana - Mc Graw - Hill, México.
17. Hafez, E. S. E. 1989. Reproducción e inseminación artificial en animales, 5° Edición Nueva Editorial Interamericana – México.

18. Huanca N. 2016. Índice de fragmentación del ADN espermático en semen de alpacas (*Vicugna pacos*) utilizando el Integrated Semen Analysis System - ISAS. Tesis Ingeniero Zootecnista. UNSAAC, Cusco, Perú.
19. Loomis P.R. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet Clin North Am Equine Pract* 22: 663-676.
20. López Y. 2014. Comparación de tres métodos de tinción para determinar la morfometría del espermatozoide de alpaca usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). Tesis Ingeniero Zootecnista. UNSAAC, Cusco, Perú.
21. McDonnell S.M. 1992. Ejaculation: physiology and dysfunction. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*
22. 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.
23. Muiño, R. 2008. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. Tesis doctoral: Universidad de Santiago de Compostela.
24. Osorio, E., San Martín, M. 1966. Aspecto histológico del epidídimo, conducto deferente y glándulas sexuales accesorias del aparato reproductor masculino de la alpaca (*Lama pacos*). *Archivos Instituto Biología Andina.*, 1: 128-141.
25. Pacheco JI, Mamani RH, Deza HW. 2011. Colección de semen mediante electroeyaculación de vicuñas mantenidas en cautiverio. *Spermova*. 1: 131 – 132.
26. Salisbury G. W., vanDemark 1961. *Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle*. W.H. Freeman, San Francisco. Estados Unidos. 639p.

- 27.** Sumar J. 2000. Llamas y Alpacas. En: Reproducción e Inseminación artificial en animales. Editado por E.S.E. Hafez, B. Hafez. McGraw – Hill Interamericana. Séptima Edición- McGraw-Hill. México.
- 28.** Sumar J. 2002. Llamas y Alpacas. En: Hafez ESE, Hafez B, eds. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7a ed. México: McGraw Hill Interamericana. p 224-242.
- 29.** Sumar, J., 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas.MSc. thesis. Fac. Med.-vet. Swedish University of agric. Sci. Uppsala. 90pp. Art. de internet. En [www.animalreproductionsciencie.com](http://www.animalreproductionsciencie.com)
- 30.** Tibary A, Vaughan J. 2006. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids. A review and clinical observations. Small Rum Res. 61: 283 - 298
- 31.** Töpfer-Petersen E., Ekhlasihundrieser M., Tsolova M., Leeb T., Kirchhoff C. y Müller P. 2005. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. Andrologia IVITA CICAS UNMSM, Lima – Perú 37: 202- 204.
- 32.** Watson P.F. 1978. A review of techniques of semen collection in mammals. Symposium of the Zoological Society of London.
- 33.** Zirena N. 2014. Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación. Tesis Médico Veterinario UNMSM. Lima – Perú.