

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA – SEDE CANCHIS



**EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS FÍSICOS DEL ESPERMATOZOIDE Y
ANÁLISIS BIOQUÍMICO DEL PLASMA SEMINAL OBTENIDO DEL
TRACTO REPRODUCTIVO DE LA ALPACA HEMBRA DESPUÉS DE LA
CÓPULA**

**Tesis presentada por la Bachiller en Medicina Veterinaria:
MIRIAM JESUSA CCANAHUIRE CONDORI, para optar el
título profesional de MÉDICO VETERINARIO.**

ASESORES:

M.V.Z PhD. Pedro Walter Bravo Matheus

M.V.Z Mgt. Juan Pinto León

M.V.Z Mgt. Celso Zapata Coacalla

CUSCO- 2019

DEDICATORIA

A Dios por estar conmigo en cada paso que doy, por su gran amor, sabiduría, fortaleza y salud que me da día a día para seguir adelante

A mis amados padres: mi papito Sergio Ccanahuire Quispe y mi mamita Andrea Condori Saraya quienes con su amor, sacrificio y comprensión que dan todo por mí, para poder lograr mis objetivos y metas.

A mi querido hermanito Yuri Ronaldo Ccanahuire Condori por su apoyo incondicional y su gran amor. Para que día a día se esfuerce y pueda lograr todos sus sueños.

Al amor de mi vida Julian Domínguez Mendoza por su gran amor, comprensión y apoyo incondicional que llena de alegría mi vida.

A mis abuelitos, mis tíos(as), primos (as) que siempre me brindaron su cariño y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por haberme encaminado a obtener el grado académico y guiar mis pasos.

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco y a la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria Sede - Canchis, por ser alma mater de mi formación profesional.

Al asesor principal de mi tesis Dr. Pedro Walter Bravo Matheus, por brindarme la oportunidad de recurrir a su gran capacidad y experiencia profesional, en un marco de confianza, afecto y amistad; por su inmensa paciencia y su apoyo incondicional. Por contribuir todos sus conocimientos para realizar el presente trabajo de investigación.

A los Asesores de mi tesis Mgt. Celso Zapata Coacalla y al Mgt. Juan Pinto León por sus valiosos aportes y consejos que hicieron posible la culminación del presente trabajo de investigación.

A cada uno de mis docentes quienes me impartieron sus conocimientos y sabias experiencias.

Al director del CICAS - La Raya Ing. Hernán Cucho por haberme brindado las facilidades para poder realizar el presente trabajo de investigación.

A mis amigos: Neyda Challco Choque, Cristóbal Severo Huamani Carrion, quienes han sido un gran apoyo, gracias por su amistad, ánimo y colaboración.

A los trabajadores del CICAS - La Raya por su amistad, colaboración y apoyo incondicional.

A todas aquellas personas, que me apoyaron y me brindaron su amistad durante el periodo de estudio.

ÍNDICE

GLOSARIO	xiii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
IDENTIFICACIÓN DE PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN	3
CAPÍTULO I.....	4
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	4
1.1. Objetivo general.....	4
1.2. Objetivos específicos	4
1.3. Justificación	4
CAPÍTULO II.....	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Características reproductivas y fisiológicas de la hembra	6
2.2. Fisiología reproductiva de la alpaca macho.....	8
2.2.1. Espermatogénesis.....	8
2.2.2. Pubertad.....	9
2.3. Características del semen de camélidos	10
2.4. Características macroscópicas del semen.....	10
2.4.1. Volumen	10
2.4.2. Color.....	11
2.4.3. Viscosidad y filancia	12
2.5. Características microscópicas del semen.....	12
2.5.1. Motilidad.....	12
2.5.2. Vitalidad	13
2.5.3. Concentración	14
2.5.4. Morfología	15
2.6. Bioquímica del plasma seminal	16
2.6.1. Glucosa	17
2.6.2. Fructosa	17
2.6.3. Citrato.....	18
2.6.4. Calcio	18

2.6.5. Zinc	19
2.6.6. Cloro.....	19
2.6.7. Proteínas totales	20
2.6.8. Albúmina	20
2.6.9. Fosfolípidos	21
2.6.10. Fosfatasa ácida	22
2.6.11. Alfa glucosidasa	22
CAPÍTULO III	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Lugar de estudio	23
3.2. Materiales	23
3.2.1. Material Experimental.....	23
3.2.2. Materiales de laboratorio.....	23
3.2.3. Reactivos	24
3.2.4. Equipos	25
3.3. Metodología de estudio.....	25
3.3.1. Selección del material experimental.....	25
3.3.2. Toma de muestra	26
3.3.3. Adecuación del laboratorio y preparación del dilutor Tris para el lavado .	26
3.3.4. Análisis físico de las muestras	28
3.3.5. Análisis bioquímico del plasma seminal para muestras del útero y oviducto	30
3.4. Diseño estadístico para el análisis de los resultados.....	50
CAPÍTULO IV.....	52
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	52
4.1. Cambios físicos del espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra después de la cópula.....	52
4.1.1. Motilidad espermática	52
4.1.2. Concentración espermática	53
4.1.3. Vitalidad espermática	55
4.1.4. Morfología espermática	56

4.2. Cambios bioquímicos del plasma seminal en el tracto reproductivo de la hembra después de la cópula.....	60
4.2.1. Glucosa	60
4.2.2. Fructosa.....	61
4.2.3. Citrato	62
4.2.4. Calcio.....	63
4.2.5. Zinc.....	64
4.2.6. Cloro	65
4.2.7. Proteínas totales.....	66
4.2.8. Albúmina.....	67
4.2.9. Fosfolípidos	68
4.2.10. Fosfatasa ácida	69
4.2.11. Alfa glucosidasa	70
CAPITULO V.....	71
CONCLUSIONES	71
RECOMENDACIONES	72
CAPITULO VI.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	73
ANEXOS	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Grupos de hembras seleccionadas.....	26
Cuadro 2. Preparación de solución de lavado para 100 mL.....	27
Cuadro 3. Esquema de reacción para glucosa.....	32
Cuadro 4. Esquema de reacción para fructosa	34
Cuadro 5. Esquema de reacción para citrato	35
Cuadro 6. Soluciones para curva de calibración de proteína total.....	42
Cuadro 7. Dilución estándar para albumina.....	44
Cuadro 8. Mezclas de reacción para fosfolípidos	45
Cuadro 9. Esquema de reacción para fosfatasa ácida	47
Cuadro 10. Esquema de reacción para α - glucosidasa	49
Cuadro 11. Promedio de la motilidad espermática en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).....	52
Cuadro 12. Promedio de la concentración espermática en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (millones de espermatozoides/mL).....	53
Cuadro 13. Promedio de la vitalidad espermática en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).....	55
Cuadro 14. Promedio de espermatozoides normales en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).....	56
Cuadro 15. Promedio de espermatozoides con defectos en la cabeza a nivel del útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).....	57

Cuadro 16. Promedio de espermatozoides con gota citoplasmática, a nivel del útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).	58
Cuadro 17. Promedio de espermatozoides con defectos en la cola a nivel del útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).	59
Cuadro 18. Concentración promedio de glucosa en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (mg/mL).....	60
Cuadro 19. Concentración promedio de fructosa en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (mg/mL).....	61
Cuadro 20. Concentración promedio de citrato en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (mg/ μ L).....	62
Cuadro 21. Concentración promedio de calcio en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (mg/dL).....	63
Cuadro 22. Concentración promedio de zinc en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (Mm).....	64
Cuadro 23. Concentración promedio de cloro en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (nmol).....	65
Cuadro 24. Concentración promedio de proteínas totales en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (g/dL).....	66
Cuadro 25. Concentración promedio de albumina en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (g/dL).....	67
Cuadro 26. Concentración promedio de fosfolípidos en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (uM/dL).....	68

Cuadro 27. Concentración promedio de fosfatasa ácida en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (Units/mL).
..... 69

Cuadro 28. Concentración promedio de alfa glucosidasa en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (Units/L). . 70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Reporte del análisis de varianza de motilidad	80
Anexo 2. Reporte del análisis de varianza de concentración	80
Anexo 3. Reporte del análisis de varianza de espermatozoides vivos	81
Anexo 4. Reporte del análisis de varianza de espermatozoides normales.....	81
Anexo 5. Reporte del análisis de varianza de espermatozoides con defecto de cabeza	82
Anexo 6. Reporte del análisis de varianza de espermatozoides con gota citoplasmática	82
Anexo 7. Reporte del análisis de varianza de espermatozoides con defecto de cola	83
Anexo 8. Reporte del análisis bioquímico de glucosa	83
Anexo 9. Reporte del análisis bioquímico de fructosa	84
Anexo 10. Reporte del análisis químico de citrato.....	84
Anexo 11. Reporte del análisis bioquímico de calcio.....	85
Anexo 12. Reporte del análisis químico de zinc	85
Anexo 13. Reporte del análisis bioquímico de cloro	86
Anexo 14. Reporte del análisis bioquímico de proteínas totales	86
Anexo 15. Reporte del análisis bioquímico de albumina	87
Anexo 16. Reporte del análisis bioquímico de fosfolípidos.....	87
Anexo 17. Reporte del análisis bioquímico de fosfatasa acida.....	88
Anexo 18. Reporte del análisis bioquímico de alfa glucosidasa	88

Anexo 19. (A) Imagen de empadre de las alpacas hembras para su posterior beneficio a los diferentes tiempos después de la cópula; (B) Imagen de identificación y registro de la hora de empadre de las alpacas.	89
Anexo 20. (C) Imagen de lavado de las muestras de útero y oviductos con solución Tris a 37°C, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya; (D) Imagen de obtención de las muestras después del lavado. En el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya.	89
Anexo 21. (E) Imagen de conservación de muestras en baño maría seco, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya; (F) Imagen de evaluación de la motilidad espermática de las muestras. En el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya.	90
Anexo 22. (G) Imagen de teñido de las muestras con tinción Diff quick para morfología espermática, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya; (H) Imagen de evaluación de la morfología espermática. En el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya.	90
Anexo 23. (I) Imagen de teñido de las muestras con tinción eosina – nigrosina para la vitalidad espermática, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya; (J) Imagen de evaluación de la vitalidad espermática. En el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya	91
Anexo 24. (K) Imagen de descongelamiento de las muestras de plasma seminal para su análisis bioquímico, en el laboratorio de reproducción en el distrito de Marangani; (L) Imagen de análisis bioquímico del plasma seminal, en el laboratorio de reproducción en el distrito de Marangani	91

Anexo 25. (M) Imagen de análisis bioquímico de cloro del plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; (N) Imagen de reacción colorimétrica del cloro en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.....	92
Anexo 26. (O) Imagen de reacción colorimétrica del análisis bioquímico de la albumina en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; (P) Imagen de reacción colorimétrica del zinc en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.	92
Anexo 27. (Q) Imagen de reacción colorimétrica del análisis bioquímico de la fosfatasa ácida en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; (R) Imagen de reacción colorimétrica del calcio en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.	93
Anexo 28. (S) Imagen de reacción colorimétrica del alfa glucosidasa en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; (T) Imagen de reacción colorimétrica de la proteína total en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.	93
Anexo 29. (U) Imagen de reacción colorimétrica del análisis bioquímico de la fructosa en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; (V) Imagen de análisis de la reacción colorimétrica de la proteína total en el plasma seminal mediante el lector de placas, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.	94
Anexo 30. (W) Imagen de la reacción colorimétrica por espectrofotometría; (X) Imagen de resultados del análisis plasma seminal mediante el lector de placas, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.....	94

GLOSARIO

CICAS:	Centro de investigación en camélidos sudamericanos
NCSS:	Number Crunching Statistical System
SPZ:	Espermatozoides
CSA:	Camélidos Sudamericanos
INEI:	Instituto Nacional de Estadística e Informática
ADN:	Acido desoxirribonucleico
CASA:	Computer Assisted Sperm Analysis
ATP:	Adenosín trifosfato
G6P:	6 fosfo-gluconato
NAD:	Nicotinamida adenina dinucleótido
G6PDH:	Fosfato deshidrogenasa
PGI:	Fosfoglucosa isomerasa
TCA:	Acido tricarbóxico
VLDL:	Lipoproteínas de baja densidad

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La - Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, cuyo objetivo fue determinar los cambios físicos del espermatozoide (motilidad, concentración, vitalidad, y morfología espermática) y los cambios bioquímicos del plasma seminal (concentraciones de glucosa, fructosa, citrato, calcio, zinc, cloro, proteínas totales, albúmina, fosfolípidos, fosfatasa ácida, alfa-glucosidasa) colectados del tracto reproductivo de la alpaca hembra (útero y oviducto) después de la cópula. Se beneficiaron 4 alpacas por tiempo (0, 12, 24, 36 y 48 horas), los datos fueron analizados con un diseño factorial 5 x 3 y la comparación de medias a través de la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$) utilizando el programa estadístico NCSS. Se obtuvo los siguientes resultados, con respecto a la motilidad espermática ($P > 0.05$) no cambió en relación al tiempo transcurrido después de la cópula, siendo 70.7, 37.5, 31.9, 59.3 y 63.7% para 0, 12, 24, 36 y 48 horas, respectivamente. La concentración espermática cambió ($P < 0.05$) a las 0 horas en el útero y a las 48 en los oviductos, siendo 3.8 y 2 millones spz/mL respectivamente. La vitalidad espermática no cambió con respecto a la ubicación y el tiempo transcurrido después de la cópula ($P > 0.05$) siendo 96.5%. La morfología espermática cambió en los defectos de la cabeza y gota citoplasmática ($P < 0.05$) con respecto al tiempo y los defectos de la cola con respecto a la ubicación y el tiempo. Los componentes bioquímicos que no cambiaron significativamente de acuerdo al tiempo transcurrido después de la cópula fueron: fructosa, 0.2 mg/mL; citrato, 0.06 mg/ μ L; calcio, 0.5 mg/dL; albúmina, 0.34 g/dL; fosfolípidos, 0.6 μ M/dL; fosfatasa ácida, 0.06 unidades/mL; alfa glucosidasa, 0.9 unidades/mL. La glucosa, y proteína total si cambiaron ($P < 0.05$) en relación al tiempo transcurrido de la cópula, y la ubicación del tracto reproductivo, siendo 0.03, 0.02, 0.006, 0.02 y 0.03 mg/dL; 0.94959, 0.94958, 0.94971, 0.94955, 0.94974 g/dL respectivamente, sin embargo, el zinc cambió ($P < 0.05$) solo con respecto a la ubicación del tracto reproductivo y el cloro ($P < 0.05$) solo con respecto al tiempo. Concluimos que los cambios físicos del espermatozoide se dieron en la concentración espermática y morfología espermática, los cambios bioquímicos del plasma seminal se dieron en glucosa, proteínas totales, zinc, cloro en el tracto reproductivo de la hembra indicarían un período de acostumbamiento temporal de los espermatozoides y la adecuación al tracto reproductivo de la alpaca hembra, también se concluye que hubo un mayor uso de la fructosa por los espermatozoides.

Palabras clave: Alpaca, espermatozoides, bioquímica, plasma seminal, cópula.

INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos son una riqueza pecuaria y genética de las poblaciones andinas, la crianza de los CSA es una actividad de gran importancia socioeconómica en la ganadería alto andina debido a que suministran fibra y carne que son productos indispensables para la subsistencia de un amplio sector de la población alto andina, destacándose su eficiencia en el uso de la tierra en un ambiente adverso como lo son las frágiles praderas de los páramos (Fernandez- Baca, 2005). La población de alpacas en el Perú es de 3 000 685.5 superando así en un 50.2% a la encontrada en el censo agropecuario de 1994; la raza Huacaya concentra el 80.4%, seguida de la raza Suri con 12.2% y cruzados con 7.3% (INEI, 2012). Los camélidos sudamericanos son considerados generalmente estacionales en su actividad reproductiva en las zonas donde tradicionalmente se crían. En su hábitat natural, los nacimientos se producen agrupados en la época de mayor lluvia (diciembre a marzo) cuando el forraje es más abundante (Fernandez-Baca, 1993).

Las características seminales de CSA hacen que la colección, evaluación y posterior utilización sea dificultosa, obteniéndose una gran variedad de datos entre los diferentes investigadores (Pacheco, 2008). Las investigaciones sobre la composición bioquímica del plasma seminal, viscosidad del semen y el uso de dilutores se han realizado con semen fresco siendo esta una limitante en el manejo del semen (Bustinza, 2001). Muy a pesar de esa limitante existen muy pocos reportes en referencia a la actividad espermática en el tracto reproductivo de la hembra. Uno de los primeros reportes realizados por Apichela, (2008) indica la interacción del espermatozoide con células del oviducto. Por otro lado, las características físicas del

espermatozoide en el canal reproductivo de la hembra reportados por Bravo y col., (1996a) indican que la motilidad, vitalidad y concentracion espermatica son parecidos entre los cuernos uterinos y oviductos. Entonces es necesario determinar la actividad espermatica en un animal de ovulacion inducida como la alpaca.

Es por tal razón que el presente trabajo pretende estudiar y caracterizar los cambios físicos del espermatozoide y cambios bioquímicos del semen, una vez eyaculado y colectado del tracto reproductivo de la alpaca hembra después de la cópula teniendo en cuenta diferentes tiempos 0, 12, 24, 36 y 48 horas. A este respecto no existen reportes.

IDENTIFICACIÓN DE PROBLEMA OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN

Formulación del problema

Para el uso de las diferentes biotecnologías reproductivas en alpacas es muy importante conocer aún más el ámbito reproductivo de esta especie. Los diferentes trabajos de investigación siguen contribuyendo de una manera positiva para el progreso de la mejora genética de las alpacas. Como se conoce el aspecto fisiológico, del semen de la alpaca presenta características limitantes y muy particulares que ha hecho que no se desarrollen de una manera eficiente el uso de las diferentes biotecnologías reproductivas. Hasta el momento aún se desconocen los cambios físicos del espermatozoide y los cambios bioquímico del plasma seminal que ocurren dentro del tracto reproductivo de la alpaca hembra después de la copula hasta el momento de la fertilización, razón por la cual se realizó el presente trabajo.

a) Problema general

¿Cuáles serán los cambios físicos del espermatozoide y los cambios bioquímicos del plasma seminal obtenidos del tracto reproductivo de la alpaca hembra después de la copula?

b) Problemas específicos

¿Cuáles serán los cambios físicos (motilidad, concentración, vitalidad, morfología) a las 0, 12, 24, 36, 48 horas después de la cópula a nivel útero y oviductos?

¿Cuáles serán los cambios bioquímicos (glucosa, fructosa, citrato, calcio, zinc, cloro, proteínas totales, albumina, fosfolípidos, fosfatasa acida alfa glucosidasa) a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas después de la cópula a nivel de útero y oviductos?

CAPÍTULO I

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

1.1. Objetivo general

Evaluar los cambios físicos del espermatozoide y analizar los cambios bioquímicos del plasma seminal obtenidos del tracto reproductivo de la alpaca hembra, a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas después de la cópula.

1.2. Objetivos específicos

- Evaluar los cambios físicos del espermatozoide (motilidad, concentración, vitalidad, morfología) a las 0, 12, 24, 36, 48 horas después de la cópula a nivel útero y oviductos.
- Evaluar los cambios bioquímicos (glucosa, fructosa, citrato, calcio, zinc, cloro, proteínas totales, albumina, fosfolípidos, fosfatasa acida, alfa glucosidasa) a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas después de la cópula a nivel de útero y oviductos.

1.3. Justificación

La crianza de alpacas es una actividad de gran importancia socioeconómica en nuestra región alto andina y nuestro país es uno de los mayores productores de alpaca. Aun no hay un buen avance en la aplicación de las biotecnologías reproductivas en esta especie, para incrementar la tasa de preñez y avanzar en la mejora genética. Se encuentran pocas investigaciones en el ámbito reproductivo de la alpaca por lo tanto es importante seguir realizando estudios.

El conocimiento de los fenómenos de transporte y fecundación permitirán hacer el uso eficiente del semen de un eyaculado y la inseminación artificial, con el objetivo de incrementar la tasa de preñez en la alpaca. Después de la monta, los espermatozoides depositados en el útero se trasladan hasta el oviducto exactamente al ampulla para la fecundación (Apichela, 2008).

Un porcentaje muy importante de espermatozoides se perderá en el trayecto y solo unos cientos podrán realizar la capacitación y llegar al istmo, aún menos lograrán sobrevivir y estar presentes a tiempo para la fertilización. Entre los factores que determinan la supervivencia de los espermatozoides durante su tránsito por el tracto reproductor de la hembra, se encuentran el pH, el ambiente hormonal (Hunter, 1988) y la presencia de macrófagos que fagocitan un número considerable de espermatozoides (Suárez, 2002), de tal manera, que no todos los espermatozoides depositados en la vagina alcanzarán la ampulla ni tendrán capacidad fecundante (Overstreet, 1981).

Aun no se conoce los cambios físicos y bioquímicos que ocurre en el tracto reproductivo de la alpaca hembra, para hacer el uso eficiente de las biotecnologías reproductivas motivo por el cual se realiza el presente trabajo de investigación en el cual se evaluaron los cambios físicos del espermatozoide y se analizaron los cambios bioquímicos del plasma seminal en tracto reproductivo de la alpaca hembra a distintos tiempos 0, 12, 24, 36 y 48 horas después de la cópula, de esta manera seguir contribuyendo con conocimientos en el ámbito reproductivo de la alpaca.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características reproductivas y fisiológicas

2.1.1. Útero

Los camélidos poseen un útero en forma de Y (bicorneo) y se encuentra suspendido en la pared abdominal por el ligamento ancho. En general, el cuerno uterino izquierdo es más largo que el derecho (Bravo, 2002b). El cuerpo del útero es pequeño en diámetro y longitud. El cérvix o cuello del útero se caracteriza por poseer de 2 a 3 anillos formados por pliegues de la mucosa. (Johnson, 1989; Smith y col., 1994).

Tras el apareamiento, la contracción del miometrio es esencial para el transporte de los espermatozoides desde el sitio de la eyaculación hacia el de la fecundación. Las secreciones uterinas constituyen un ambiente óptimo para la supervivencia y capacitación de los espermatozoides (Simon y col., 2000). El líquido endometrial contiene principalmente proteínas séricas y pequeñas cantidades de proteínas específicas del útero. Las cantidades y proporciones de estas proteínas varían con el ciclo reproductivo (Llewellyn y col., 2008). Se han caracterizado proteínas específicas de origen uterino, embrionario o ambos, durante la preñez temprana, así como la glicoproteína de color púrpura que contiene hierro, llamada uteroferrina. Estas secreciones uterinas participan en el control del crecimiento embrionario y la implantación (Dragilva, 1999).

El endometrio metaboliza carbohidratos, lípidos y proteínas para satisfacer los requerimientos de nutrición celular, rápida proliferación del tejido uterino y desarrollo

del embrión. Estas reacciones dependen de cuatro fenómenos: las reacciones enzimáticas asociadas al metabolismo de la glucosa, el incremento de la circulación a través de las arteriolas espirales, los cambios morfológicos que ocurren en el endometrio y miometrio y la acción estimulante de las hormonas ováricas y otras (Llewellyn y col., 2008).

2.1.2. Oviductos

Los oviductos son dos conductos pequeños en diámetro que se encuentran suspendidos por el mesosalpinx, una rama del ligamento ancho. En su extremo craneal se encuentran las fimbrias, que en alpacas y llamas envuelven al ovario (Fowler y Bravo, 1998). Hacia caudal, el oviducto termina en el útero formando una papila, la cual tiene un esfínter que protruye dentro del cuerno uterino (Tibary y Memon, 1999).

Las células secretoras de la mucosa de los oviductos son no ciliadas y característicamente contienen gránulos secretorios, cuyo tamaño y número varían mucho con la especie y las fases del ciclo estrual (Derivaux, 1982). El líquido de los oviductos tiene varias funciones, incluida la capacitación e hiperactivación del espermatozoide, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano previo a la implantación. Está constituido por un trasudado selectivo de suero y productos de secreción de los gránulos de las células secretoras del epitelio oviductal (Hunter, 2011). Las secreciones del oviducto son reguladas por hormonas esteroideas. Varios componentes proteínicos del líquido oviductal también los tiene el suero. Sin embargo, las proporciones de algunos de ellos son diferentes en ambos líquidos corporales: por ejemplo, la cantidad de transferrina y prealbúmina respecto a albumina es mucho mayor en el líquido de los oviductos que en el suero. Muchas proteínas séricas carecen de

equivalentes en el líquido oviductal y a la inversa, varias proteínas son únicas de dicho líquido (Derivaux, 1982).

2.2. Fisiología reproductiva de la alpaca macho

2.2.1. Espermatogénesis

La producción de espermatozoides por parte del testículo constituye un extraordinario proceso de modificación de las células comunes desde el crecimiento del feto para depositarse en el epitelio germinal mucho antes de que se requiera su función generativa, y finalmente la transformación de células germinales en espermatozoides libres (Alba, 1985).

La espermatogénesis se produce durante todo el año en todos los camélidos, pero el efecto de la estación en la producción de semen es poco conocido. Las variaciones estacionales en la producción se basan en el origen geográfico, manejo de los animales, la extensión de la estructura social y domesticación en los camélidos (Novoa, 1970 y Elwishy, 1998).

Existe variación en las concentraciones de testosterona plasmática en alpacas machos debido a los cambios estacionales, obteniéndose el promedio más alto al final del verano y el más bajo en invierno (Urquieta y col., 1994). El tránsito del espermatozoide por el epidídimo está asociado con un cambio en la posición de la gota citoplasmática que se vuelve distal, pero sigue presente en más de 60% de los espermatozoides en el segmento terminal. La gota citoplasmática se pierde cuando un espermatozoide llega al conducto deferente (Lawzewitsch, 1987). Por lo tanto la presencia de dicha

gota citoplasmática en una cantidad importante de espermatozoides eyaculados es indicativa de inmadurez (Hafez, 2000).

2.2.2. Pubertad

La pubertad en los camélidos sudamericanos se presenta en forma diferenciada por su sexo y edad. En general las hembras son más precoces, comenzando su actividad reproductiva alrededor de un año de edad mientras los machos lo hacen cercano a los dos años de edad. En la alpaca, la hembra comienza a mostrar receptividad sexual hacia el año de edad, este evento está relacionado con la presencia de folículos ováricos de un diámetro de 5 - 7 mm (Sumar, 1986 ; Bravo, 1995).

Al momento del nacimiento los machos poseen un pene completamente adherido al prepucio por un tejido embrionario; al año de edad solo un 8 – 10% de alpacas se ha liberado de la adherencia pene-prepucial, mientras que a los 2 años el 70% ya está libre de adherencias pene prepuciales y a los 3 años, entre el 95 – 100% de machos obtienen un pene totalmente libre del prepucio (Novoa y Leyva 1996; Bustinza, 2001). El proceso del desprendimiento del prepucio normalmente empieza a los 12 o 13 meses de edad y coincide con el aumento de la concentración de testosterona plasmática (Bravo y Johnson, 1994). Cuando los machos llegan a la madurez sexual, los testículos crecen y los niveles de testosterona se incrementan más de 1000 pg/mL a una edad aproximada de 20 meses en la mayoría de alpacas (Bravo, 1995 ; Bravo y col., 2002a).

2.3. Características del semen de camélidos

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los gametos del macho (los espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor (Hafez, 2000). Las características físicas y biológicas del semen de los camélidos sudamericanos son muy variables dependiendo de las condiciones de la colección (por ejemplo, métodos de colección, temperatura del medio ambiente, fecundidad y libido de machos). En la alpaca, el plasma seminal constituye 88.5% del volumen del semen y espermatozoides 11.5%, sin diferencias significativas entre edades (Garnica y col., 1993; Bravo y col., 2018).

Para realizar el análisis del eyaculado de cualquier mamífero, los parámetros a evaluar son: volumen, color, aspecto, concentración de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales. Por lo tanto, el tiempo de copula en los camélidos es muy importante porque varía en la concentración, el volumen y el porcentaje de espermatozoides vivos, también es fundamental no interrumpir la cópula ya que la última fracción del eyaculado parece ser la que lleva la mayor concentración de espermatozoides vivos (Bravo y col., 2002a).

2.4. Características macroscópicas del semen

2.4.1. Volumen

El volumen varía con la metodología de colección y está influenciado por factores intrínsecos y medioambientales. El rango de volumen de eyaculado es bastante grande en alpacas, se tiene reportado desde 0.4 a 12.5 mL (Sumar, 2000 y Bravo y

col., 2002c) y el factor más importante en la variación del volumen del eyaculado en alpacas 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 (Bravo y col., 1997; Vaughan, 2006).

Este aspecto es discutible pues se encuentra en la literatura observaciones que indican que la frecuencia de colecciones no afectaría el volumen del eyaculado (Bravo y col., 1997). La edad tiene un efecto muy sutil en la producción espermática, ya que las características seminales mejoran ligeramente de acuerdo aumenta la edad, pero dicha diferencia no es significativa (Bravo y col., 2002a).

2.4.2. Color

El semen es usualmente descrito de un color blanco claro o lechoso (Garnica y col., 1993 y Bravo y col., 1997). Dependiendo de la concentración espermática y la proporción de la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Tibary, 1999). Es predominantemente blanco lechoso si es colectado por electro eyaculación (Fernandez Baca, 1996) o por vagina artificial, pero a veces puede ser blanco cremoso (Garnica y col., 1993). El eyaculado individual puede ser heterogéneo con un material translucido combinado con áreas oscuras. El semen colectado por aspiración vaginal pos copula contiene cantidades variables de sangre como resultado del trauma al tracto reproductivo de la hembra, esto se debe al daño que hace el proceso peneano del macho en el endometrio uterino (Vélez, 1997; Bravo y col., 1997). La presencia de glóbulos rojos no parece dañar la calidad del semen como en otras especies (Tibary, 2004).

2.4.3. Viscosidad y filancia

El eyaculado de los CSA es filante y muy viscoso, la filancia puede definirse como la capacidad de un fluido de extenderse hasta formar hilos. A su vez un fluido viscoso en el cual existen fuerzas de atracción entre porciones adyacentes del fluido (Giuliano, 2011). Una de las más importantes características del semen de camélidos es su alta viscosidad que hace muy difícil su manejo durante los procedimientos y combinaciones con los dilutores (Fernandez- Baca, 1996; Vaughan, 2006). La viscosidad del semen se atribuye a la presencia de mucopolisacaridos de las secreciones de la glándula bulbo uretral y de la próstata (Garnica y col., 1993).

El grado de viscosidad depende del macho individualmente en la proporción del fluido seminal gelatinoso y tiende a disminuir con el incremento del número de eyaculados en un día. Se observó que la viscosidad del semen de alpaca colectado por vagina artificial tiende a disminuir en el tercer eyaculado (Bravo y col., 1997). La licuefacción del semen se ha obtenido por exposición a varias enzimas hidrolíticas y proteolíticas (tripsina, colagenasa, fibrolisina, hialuronidasa). Todas estas enzimas son efectivas, pero pueden causar daño al espermatozoide si la incubación es prolongada o la concentración es muy alta. Una solución de tripsina de 1:250 parece ser más efectiva con efectos negativo mínimos en los espermatozoides (Bravo y col., 1999).

2.5. Características microscópicas del semen

2.5.1. Motilidad

La motilidad es una de las pruebas más utilizadas en la valoración de la calidad del semen. Una fuerte y progresiva motilidad es un índice importante de la viabilidad de la

población espermática. La motilidad se puede medir con la ayuda del microscopio, normalmente se hace de forma subjetiva, realizado por un técnico experimentado (Sorensen, 1991; Illera, 1994).

La alta viscosidad del plasma seminal, así como la baja concentración espermática determinan patrones de motilidad particulares para el semen de alpaca, en comparación con otras especies no existe motilidad masal y la motilidad individual es estacionaria u oscilante y no progresiva. Por lo tanto, los valores de motilidad cuentan con un promedio de 52.4 % y rango de 30.6 – 80.0 % (Sumar, 1981; Bravo y col., 2002a). La evaluación de la motilidad se realiza inmediatamente después de la colección de semen y sobre una platina templada, realizándose el conteo de los espermatozoides con movimiento en un campo y expresándolo en porcentaje (Bravo y col., 2002a). El porcentaje de motilidad no se ve afectado por el número de eyaculaciones entre un macho, pero si varía entre varios machos evaluados (Bravo y col., 1997).

2.5.2. Vitalidad

Para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se requiere de la utilización de coloraciones supra vitales, el colorante más utilizado es el colorante de Hancock (eosina/nigrosina) que permite visualizar los espermatozoides vivos de un color blanco brillante y los muertos de un color rosado (Bravo y col., 2002a; Aller, 2003).

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

(Lubos, 1983) . En 1987, Quispe clasificó vivos y muertos, indicando que una buena motilidad tiene más del 60% de espermatozoides vivos, motilidad regular cuando los espermatozoides vivos están entre un 40 a 60% y motilidad baja cuando el porcentaje de espermatozoides vivos es menor al 40% en semen colectado de alpacas. El porcentaje de espermatozoides vivos es constante a pesar de incrementar la frecuencia de colección, existe una ligera disminución de la vitalidad entre colecciones, pero no es significativa (Bravo y col., 1997).

2.5.3. Concentración

La concentración espermática es muy variable (82 – 250 millones de espermatozoides/mL) y se ve afectada por la edad, el método de colección y el rango de eyaculación. La interrupción de la cópula resulta en concentraciones reducidas del eyaculado (Bravo y col., 2002a).

La determinación de la concentración espermática en semen de alpaca se ve dificultada por la viscosidad del semen, pero una modificación a la técnica del hemocitómetro es realizada diluyendo previamente el semen en solución salina en 1:100, 1: 50 o 1: 200 y tomando 10 μ L para cargar la cámara de Neubauer, luego se realizan las lecturas de manera similar que el semen de otras especies, este método es usado por todos los investigadores de semen en alpacas por lo que los datos reportados en concentración espermática de alpacas fueron obtenidos con esta técnica (Bravo y col., 2002c). Últimamente la concentración espermática se determina usando programas computacionales que viene con sistemas de evaluación de semen, tal es el caso del sistema CASA.

La frecuencia de montas o de colecciones afecta de manera negativa a la concentración espermática en alpacas Bravo y col., 1997; Urquieta, 2005 reportaron que la concentración desciende de 72.2×10^6 a 51.9×10^6 al segundo eyaculado y a 45.4×10^6 al tercero, por lo que no se recomienda una sobre exigencia durante la época reproductiva a fin de no causar una caída en el porcentaje de fertilidad.

2.5.4. Morfología

La proporción de espermatozoides normales se encuentra entre el 60 y 90%, observándose alto porcentaje de espermatozoides anormales en relación a otras especies, siendo la más importante las anomalías en la cabeza, seguidas por las gotas citoplasmáticas y luego problemas de cola (Bravo y col., 2002c). 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 y col., 1997). Otros reportes hechos en semen de alpaca colectados por vagina artificial durante la época reproductiva indica que las anomalías se encuentran en un 49% y la anomalía más frecuente son los problemas de pieza intermedia, seguido por problemas en la cabeza y luego en la cola, se indica que las cabezas solas no se consideran como anomalías pues se deben a un manejo brusco del semen y no se cuentan como anomalías (Flores y col., 2002), mientras se indica que el día de copula no tendría efecto sobre los espermatozoides anormales, encontrándose un promedio de 47.7% de espermatozoides anormales en semen de alpaca (Urquieta, 2005).

Estudios sobre la morfología de espermatozoides de llama y guanaco indican una gran variabilidad entre individuos, similar a los reportes en alpacas, sugiriendo que

exista un polimorfismo natural en las cabezas espermáticas de camélidos sudamericanos, siendo esta una evidencia aun no concluyente que indica una mejora y un ajuste en la forma tradicional de evaluación de camélidos es urgente (Casaretto, 2009). Estos datos son variables por los diferentes autores y puede estar debido al método de colección y la época de colección de las muestras.

2.6. Bioquímica del plasma seminal

El plasma seminal consiste en una compleja mezcla de secreciones que se originan principalmente en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias del macho (Topfer-Petersen, 2005a). Este cumple un rol de protección de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra, modula la respuesta inflamatoria tras la monta en el cual se suprime la activación del sistema del complemento, la quimiotaxis de polimorfonucleares neutrófilos y la fagocitosis (Troedsson, 2005), sus proteínas protegen selectivamente a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los polimorfonucleares neutrófilos presentes en el útero y juega un rol importante en el transporte y eliminación de espermatozoides muertos (Loomis, 2006). Participa de manera importante en la maduración final del espermatozoide a través de cambios hormonales, enzimáticos y modificación de la superficie de membrana espermática; además de servir como vehículo para los espermatozoides eyaculados (Muiño y col., 2008).

La próstata secreta un líquido lechoso alcalino, que contiene ácido cítrico, calcio, fosfatasa ácida y otras sustancias. La característica alcalina de este líquido favorece la fertilización, ya que neutraliza la acidez de las secreciones vaginales y consigue que aumente la motilidad de los espermatozoides (Kareskoski, 2008). Las glándulas

bulbouretrales presentan células cilíndricas con un citoplasma acidófilo y el lumen de los acinos contiene material abundante en glicoproteínas (Bravo y col., 2002c).

2.6.1. Glucosa

Es el producto de la secreción prostática contiene hexosas de gran importancia energética para el metabolismo de los espermatozoides y lo utilizan mediante la vía glucolítica para obtener energía (Holy, 1983). En 1993 Garnica y col., obtuvieron la concentración de glucosa en plasma seminal de alpacas de 3 y 6 años resultando las concentraciones en alpacas de 3 años significativamente superior a las de alpacas de 6 años y estos resultados fueron 7.0 ± 0.4 y 5.3 ± 0.3 mg/dL, respectivamente. Otro estudio realizado por Díaz (2015), obtuvo las siguientes concentraciones de glucosa en plasma seminal fresco 8.2 ± 0.8 mg/dL y en plasma seminal congelado y descongelado 8.5 ± 1.2 mg/dL.

2.6.2. Fructosa

La fructosa, que es el azúcar principal del plasma seminal, se origina a partir de las vesículas seminales y es esencial para el metabolismo y motilidad espermática. Dentro de los constituyentes carbohidratos del plasma seminal se encuentra trazas de glucosa. La glucosa sanguínea es precursor de la fructosa seminal (Dukes, 1981).

La fructosa es el carbohidrato más importante que proporciona energía a los espermatozoides en el semen de diferentes especies (toro, carnero, cabrío). La tasa de fructólisis en el semen en general se relaciona con la concentración de los espermatozoides (Roberts, 1984). La concentración fructosa en plasma seminal de alpacas de 3 y 6 años obtenidos por Garnica y col., (1993) fueron 5.6 ± 1.1 mg/dL.

2.6.3. Citrato

La secreción del citrato es por la vesícula seminal y la próstata, se halla controlado por los niveles de testosterona, desapareciendo después de la castración y reapareciendo tras el tratamiento con testosterona. El ácido cítrico no tiene importancia como fuente de energía, pero si en la coagulación del esperma de algunas especies animales y también tiene importancia para la consistencia del plasma seminal (Derivaux, 1982), además fijado al calcio, mantiene el equilibrio osmótico junto con los iones de sodio y potasio, esto a la vez se aprovecha con éxito en la conservación del semen prolongándose así la vida de los espermatozoides (Lubos, 1983).

2.6.4. Calcio

El rol del calcio en la iniciación y regulación de la capacitación es un punto controversial. Se observa que no hay un cambio intracelular de calcio en los eventos de la maduración. En los espermatozoides de ratón se ha visto al calcio como un requerimiento en la capacitación, sin embargo, no se han medido la concentración intracelular de calcio. La acción del calcio en los niveles de enzimas efectores desarrolla en el espermatozoide una señal de transducción (Dragilva, 1999).

En diversos trabajos se han presentado algunos de los cambios fisiológicos producidos en el espermatozoide que se requieren para la reacción acrosomal. Por ejemplo, en la capacitación espermática en ausencia de calcio, la reacción acrosomal no se realiza de forma adecuada, si subsecuentemente se le adiciona calcio la reacción acrosomal se realiza de forma sincronizada (Frase, 1998).

En estudios realizados por Díaz (2015), obtuvo la concentración de calcio en plasma seminal fresco 11.8 ± 1.7 mg/dL y 11.4 ± 0.6 mg/dL en semen descongelado.

2.6.5. Zinc

El zinc en el semen desempeña un papel importante en la fisiología de los espermatozoides y es secretado por la próstata. La producción de espermatozoides pasa por muchas divisiones celulares y esto requiere grandes cantidades de zinc, ya que está involucrado en el metabolismo del ácido nucleico y de las proteínas, por lo que es esencial en la diferenciación y replicación celular (Underwood, 1981). En los túbulos seminíferos activa y mantiene el epitelio germinativo y ayuda a codificar los factores de transcripción involucrados en la espermatogénesis, en la motilidad espermática controla la utilización de la energía por el sistema del ATP (Wong, 2002). También se ha informado que el zinc es el principal factor responsable de la actividad antibacteriana del plasma seminal y es el encargado de proteger el ADN del espermatozoide de cualquier noxa externa (Underwood, 1981). Otros estudios han sugerido que el zinc puede tener un papel en la producción y viabilidad de los espermatozoides, y en la estabilización de la membrana del espermatozoide (Chia, 2014).

2.6.6. Cloro

El cloro es considerado como uno de los principales aniones presentes en el plasma seminal, cuyo origen se admite que sean producidas por las glándulas uretrales y la próstata (Salisbury, 1978). Tiene una función importante de ayudar a mantener la presión osmótica adecuada, para la sobrevivencia de los espermatozoides (Mann, 1954).

En el estudio realizado por Garnica y col., (1993) obtuvo las siguientes concentraciones de cloro 7.6 ± 23.7 mg/dL en alpacas 3 y 6 años.

2.6.7. Proteínas totales

Las proteínas y aminoácidos del plasma seminal ejercen acción protectora sobre los espermatozoides, neutralizando el efecto perjudicial de los metales pesados y previniendo la aglutinación de sus células. El semen de toro y carnero contiene niveles relativamente altos de proteínas y aminoácidos libres (Derivaux, 1982). La remoción y absorción de proteínas de la superficie espermática es generalmente reconocida como un prerrequisito para la capacitación. La unión de ciertas proteínas a la superficie se ha asociado con la maduración epididimal o a la eyaculación, y ocurre durante la capacitación. En el toro este componente está producido por la próstata (Salisbury, 1978).

En trabajos realizados por Garnica y col., (1993) en alpacas de 3 y 6 años se obtuvo la concentración de proteínas totales de 3.7 ± 0.2 g/dL. Otro trabajo realizado por Díaz (2015), obtuvo las siguientes concentraciones de proteínas totales en plasma seminal fresco 2.4 ± 0.2 g/dL y en plasma seminal descongelado 2.3 ± 0.2 g/dL.

2.6.8. Albúmina

Se cree que la función de las albúminas séricas durante la capacitación *in vitro* es la eliminación del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. Algunos experimentos han demostrado que el colesterol unido a otras proteínas de transferencia de lípidos que están presentes en el líquido folicular o los fluidos de las trompas de Falopio, pueden ser reemplazados por las albúminas en la fertilización *in*

vitro, estos resultados sugieren el desarrollo en la activación en el colesterol (Dragilva, 1999).

En estudios realizados por Diaz (2014), obtuvo los siguientes datos 1.0 ± 0.3 g/dL en plasma seminal fresco y 0.8 ± 0.1 g/dL en plasma seminal descongelado respectivamente.

2.6.9. Fosfolípidos

Los lípidos tienen la característica de promover el flujo de la membrana celular, la permeabilidad y la difusión. La presencia de altos niveles de colesterol en la membrana durante la capacitación, es probablemente requerida en la prevención de la capacitación prematura y para promover la reacción acrosomal en un tiempo apropiado (James, 1999). El paso de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra es acompañado por una pérdida de lípidos de la membrana del espermatozoide. Este proceso está involucrado en la capacitación espermática, la cual toma varias horas (Davis, 1976).

Sebastian (1987), demostró que la infertilidad esta mediada por la asociación con el metabolismo lipídico alterado en el plasma seminal. A pesar que diversos reportes han evaluado el efecto del hipercolesterolemia sobre el mecanismo de modulación de la capacidad funcional espermática.

En el estudio realizado por Garnica y col., (1993) la concentración de lípidos totales en semen de alpacas de 3 y 6 años fue 90.5 ± 7.1 mg/dL.

2.6.10. Fosfatasa ácida

En los seres humanos y en caninos, se ha descrito que los niveles de fosfatasa ácida, pueden ser indicadores de la función secretora de la próstata. En equinos, esta enzima se encuentra principalmente en el cuerpo y ductos del epidídimo y en las vías deferentes (Katila, 2006). La actividad de esta enzima, ha sido descrita en la cabeza del espermatozoide, pieza intermedia y fragmentos de la cola; se cree que participa en la regulación de la fosforilación de proteínas, mediante protein-quinasas dependientes de AMPc, necesaria para la movilidad espermática (Juyena, 2012).

2.6.11. Alfa glucosidasa

Los niveles de alfa glucosidasa varían entre las diferentes fracciones del eyaculado, encontrando concentraciones más altas en la primera fracción espermática (Kareskoski, 2008). Se cree que las glucosidasas juegan un papel importante durante la maduración espermática y la fertilización, y las diferencias en sus niveles pueden ser asociadas con defectos funcionales en los espermatozoides (Corrales, 2002). En toros, la disminución en los niveles de glucosidasas derivadas del epidídimo o de los espermatozoides, ha sido correlacionada con baja concentración espermática y morfología anormal del esperma (Katila, 2006).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de estudio

El presente trabajo de investigación se realizó durante los meses de enero – abril del año 2018 en el centro de investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) -La Raya propiedad de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Facultad de Ciencias Agrarias, ubicado en el distrito de Marangani, provincia de Canchis departamento de Cusco, con las siguientes coordenadas:

- | | |
|-------------------|---------------------------|
| ○ Ubicación UTM | 19 L0279482m E 8398851m S |
| ○ Latitud Sur. | 14° 28.448' |
| ○ Longitud Oeste. | 071° 02.753' |
| ○ Altitud. | 4 133 m.s.n.m. |

Fuente: GPS Garmin© Oregon 300

3.2. Materiales

3.2.1. Material Experimental

Para el presente trabajo de investigación se utilizaron 20 alpacas hembras adultas aparentemente sanas al examen externo o visual, receptivas y también 20 machos del plantel seleccionados al azar.

3.2.2. Materiales de laboratorio

- Tubos falcón de 15 mL

- Jeringas de tuberculina de 1 mL con aguja
- Jeringas de 3 y 5 mL.
- Guantes de látex o examinación
- Pinzas Kelly rectas y curvos
- Bandejas de tamaño mediano
- Probetas de 10, 20, 50 mL.
- Vasos precipitados de 20 mL.
- Viales de 2 mL.
- Laminas porta objeto
- Laminas cubre objeto
- Microplacas de 96 pocillos
- Cámaras de Neubauer
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Puntas amarillas de 10 y 1000 μ L.
- Pipetas de 10, 100 y 1000 μ L.
- Pipeta multicanal
- Espéculos vaginales
- Fuente de luz

3.2.3. Reactivos

- Eosina/nigrosina
- Solución de cloruro de sodio al 5%

- Tinción Diff quick
- Agua desionizada
- Agua ultra pura
- Dilutor Tris
- Kits bioquímicos (SIGMA - ALDRICH) de glucosa, fructosa, citrato, proteína total, albumina, zinc, cloro, calcio, alfa glucosidasa, fosfolípido, fosfatasa acida.

3.2.4. Equipos

- Microscopio con contraste de fases con platina térmica.
- Espectrofotómetro
- Lector de placas
- Estufa
- Congeladora a -20 °C
- Refrigeradora
- Agitador vortex
- Baño María seco
- Centrifuga

3.3. Metodología de estudio

3.3.1. Selección del material experimental

El material experimental constó de los órganos reproductivos completos de la hembra, esto incluye: vulva, vagina, cuello uterino, cuerpo uterino, cuernos uterinos, oviductos y ovarios. Estos órganos fueron colectados de hembras sacrificadas a diferentes

tiempos después de la copula. Para el beneficio de las alpacas hembras se seleccionaron dos alpacas por semana y para realizar la monta se utilizaron machos sanos, en actividad reproductiva y la selección se realizó al azar. Se procedió a realizar el examen clínico del tracto reproductivo de las hembras, por medio de la inspección de los genitales externos y utilizando un espéculo y la fuente de luz para el examen de la vagina y cérvix esto con la finalidad de no tener hembras con infecciones uterinas. Las hembras fueron agrupadas en grupos de cuatro de acuerdo al tiempo de sacrificio según **Cuadro N°1**. Para el empadre se tomó en cuenta que entre hembra y hembra un intervalo de 1 día, para realizar la toma y análisis de la muestra.

Cuadro 1. Grupos de hembras seleccionadas

GRUPOS	A	B	C	D	E
A las 0 horas	4 animales				
A las 12 horas		4 animales			
A las 24 horas			4 animales		
A las 36 horas				4 animales	
A las 48 horas					4 animales

3.3.2. Toma de muestra

La toma de muestras se realizó por cada semana durante los meses de diciembre a marzo, por lo tanto, se realizó el empadre y beneficio de 2 animales por semana de acuerdo a los diferentes tiempos como son 0,12, 24, 36 y 48 horas después de la cópula (cuatro animales por tiempo).

3.3.3. Adecuación del laboratorio y preparación del dilutor Tris para el lavado

Se adecuó el laboratorio a una temperatura de aproximadamente 20°C con la ayuda de un calefactor para evitar cambios bruscos de temperatura.

Previamente se preparó la solución dilutor Tris, el cual se colocó en una estufa para que se mantenga a una temperatura de 37°C.

Cuadro 2. Preparación de solución de lavado para 100 mL

Tris (hidroximetil amino metano)	3.63 g
Ácido cítrico monohidratado	1.99 g
Glucosa	0.5 g
Agua bidestilada	100 mL

(Maxwell, 1999)

Se procedió al beneficio de los animales según el esquema N°1

Esquema 1. Sistema de beneficio de alpacas



Se diseccionó todo el tracto reproductivo de la hembra incluyendo desde los genitales externos hasta los ovarios, se colocó en una bandeja y se llevó al laboratorio y se procedió con la obtención de muestra. El desuello y eviscerado se realizó después de la obtención de la muestra porque, primero necesitábamos sacar las muestras.

En el laboratorio se procedió a realizar un corte longitudinal desde la comisura superior de la vulva en dirección a la cérvix. Utilizando pinzas Kelly recta se realizó la hemostasia a nivel de los istmos de ambos cuernos uterinos, por el cuerpo del útero

se administra solución de dilutor de semen en una cantidad de 3 mL a cada cuerno, se realizó masajes en forma suave para lavar los espermatozoides que se encuentran en esta zona (cuerpo y cuernos uterinos), por medio de una jeringa de 3 mL se absorbió el lavado y se colocó en un tubo Falcon de 15 mL, las muestras fueron mantenidas a una temperatura de 37 °C en baño María seco.

Se diseccionó los cuernos uterinos hasta llegar a la unión útero tubal para colocar directamente el vial, y a través del infundíbulo se le administro 2 mL de solución dilutor con una jeringa de 1 mL para realizar el lavado, las muestras fueron mantenidas a una temperatura de 37 °C en baño María seco. Se siguió el mismo procedimiento en el otro oviducto.

3.3.4. Análisis físico de las muestras

3.3.4.1. Motilidad espermática

La evaluación de la motilidad espermática se realizó mediante la inspección visual subjetiva para el cual se colocó 10 µL de la muestra de semen que se obtuvo después del lavado del útero y de los oviductos en la lámina porta objetos y sobre él una lámina cubre objetos y dejamos en reposo 1 minuto sobre la platina térmica a 37 °C y se situó en el microscopio de contraste de fases, y se observó con el objetivo de 40X.

Para la valoración visual se observó por lo menos 5 campos diferentes de la misma muestra del cual se dio una valoración de la motilidad espermática que estuvo dentro de los rangos de 10% - 90%.

$$\text{Porcentaje de motilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides móviles}}{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides totales}} \times 100$$

3.3.4.2. Concentración espermática

La concentración espermática se determinó la cantidad de espermatozoides por mL.

Para el cual se siguió el siguiente procedimiento:

- Después de obtener las muestras de lavado tanto del útero y de los oviductos se colocó 10 µL de semen a un tubo de ensayo al cual se le añadió 990 µl de solución de cloruro de sodio al 5%.
- Seguidamente se colocó al vortex para su homogenización y se extrajo 10 µL de la muestra para poner en la cámara de Neubauer y se esperó 5 minutos.
- Luego se llevó la cámara de Neubauer al microscopio a 40X en el cual se ubicaron los campos que están cuadrículados, en un número de 25 cuadrados de los cuales se contaron los espermatozoides que se encuentran en cinco cuadrados (4 cuadrados de las esquinas y el cuadrado del medio). La concentración espermática se calculó de acuerdo a la siguiente formula:

$$\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides contados} \times 1\,000\,000 = \text{N}^\circ \text{ de espermatozoides} \times 10^6$$

3.3.4.3. Morfología espermática para muestras de útero y oviducto

La morfología de los espermatozoides de las muestras que se obtuvieron del lavado del útero y los oviductos, se realizaron frotices con 10 µL de estas muestras y se dejaron secar al ambiente.

Luego se realizó la tinción Diff Quick se introdujo durante un minuto en cada uno de estos componentes y se procedió a enjuagar láminas y se esperó a que secaran después de ser introducidos en cada uno de estos componentes.

Luego se procedió a observar en el microscopio a 40X en el cual se evaluó las diferentes anormalidades del espermatozoide como son los defectos en la cabeza, gotas citoplasmáticas y defectos en la cola. Para obtener el porcentaje se contó 100 espermatozoides dentro de los cuales se encontraban espermatozoides normales, defectos de cabeza, gotas citoplasmáticas y defectos de cola. De esta manera se obtuvo el porcentaje de espermatozoides normales y espermatozoides anormales.

3.3.4.4. Vitalidad espermática

La vitalidad espermática de las muestras que se obtuvieron del útero y de los oviductos realizó un frotis con 10 µL de la muestra y 10 µL de la tinción de eosina-nigrosina y se esperó que se secase. Después se realizó la evaluación en el microscopio a 40X en el cual se observó y se realizó el conteo de los espermatozoides vivos y muertos.

Los espermatozoides vivos no se tiñeron con este colorante (porque las membranas no estuvieron dañadas) en cambio los espermatozoides muertos si se tiñeron debido al daño de su membrana el cual dejó pasar el colorante. La vitalidad se expresó en porcentaje y se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Vitalidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides no coloreados}}{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides totales}} \times 100$$

3.3.5. Análisis bioquímico del plasma seminal para muestras del útero y oviducto

Para la evaluación bioquímica del plasma seminal se realizó la centrifugación de las muestras a 1000 rpm x 30 minutos y luego se separó el plasma seminal los cuales fueron colocados a viales de 2 mL cada una de ellas con la identificación

correspondiente e inmediatamente fueron llevadas a congelación (-20 °C), para su posterior análisis. Para evaluar los cambios bioquímicos del plasma seminal en el útero y los oviductos se utilizaron kits bioquímicos (SIGMA - ALDRICH). Para hallar los resultados del análisis bioquímico del plasma seminal pos cópula de la alpaca se tuvo que hacer mediante el lector de placas y el espectrofotómetro, de acuerdo al protocolo de cada componente.

3.3.5.1. Análisis de glucosa

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de glucosa de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

La glucosa se fosforila por trifosfato de adenosina (ATP) en la reacción catalizada a 6-fosfo-gluconato (G6P) y luego se oxida a 6-fosfo-gluconato en presencia de nicotinamida dinucleótido adenina (NAD) oxidada en una reacción catalizada por fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Durante esta oxidación, una cantidad equimolar de NAD se reduce a NADH. El consiguiente aumento de la absorción a 340 nm es directamente proporcional a la concentración de glucosa.

Reactivos

- Espectrofotómetro adecuado para medir la absorbancia a 340 nm
- Cubetas
- Pipetas de 10 µL a 1 mL.

Procedimiento

Preparación de la muestra:

Diluir la muestra con agua ultra pura a 0.05 - 5 mg de glucosa / mL

Determinación

Pipetear un volumen de la solución correspondiente a 0.5 - 50 µg de glucosa. Pipetear las siguientes soluciones en los tubos de ensayo debidamente marcados.

Cuadro 3. Esquema de reacción para glucosa

Tubo	Reactivo de ensayo de glucosa (mL)	Volumen de muestra (µL)	Volumen de agua desionizada (mL)
Muestra en blanco	---	Igual que para la prueba	1
Reactivo en blanco	1	---	Igual que el volumen de muestra para la prueba
Prueba	1	10 – 200	---

Mezclar los tubos e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 °C)

Medir la absorbancia a 340 nm versus el agua ultra pura

Cálculo:

$$A_{\text{total en blanco}} = A_{\text{muestra en blanco}} + A_{\text{reactivo en blanco}}$$

$$\text{mg glucosa / mL} = \frac{(\Delta A) \times (TV) \times (F) \times (0.029)}{(SV)}$$

$$\Delta A = \text{Total en blanco}$$

$$TV = \text{Volumen total de ensayo (ml)}$$

$$F = \text{Factor de dilución de la preparación de la muestra}$$

$$SV = \text{Volumen de muestra (mL)}$$

3.3.5.2. Análisis de fructosa

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de fructosa de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

La fructosa es fosforilada por trifosfato de adenosina (ATP) en la reacción catalizada por hexocinasa. Fructosa 6- fosfato por fosfoglucosa isomerasa (PGI). La glucosa 6- fosfato (G6P) luego se oxida a 6- fosfogluconato en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) en la reacción catalizada por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH).

Materiales

- Espectrofotómetro adecuado para medir la absorbancia a 340 nm.
- Cubetas.
- Pipetas de 100 μ L a 2mL.

Procedimiento

- Diluir la solución de la muestra hasta una concentración de fructosa aproximada de 100 – 1000 μ g/mL. repita el ensayo y varíe el volumen de la muestra si es necesario para obtener un valor entre 0.03 y 1.6.
- Pipetear la solución que se indica en el siguiente cuadro en los tubos de ensayo debidamente marcados.

Cuadro 4. Esquema de reacción para fructosa

Tubo	PGI (ml)	Volumen de la muestra	Agua desionizada (mL)	Reactivo de ensayo de glucosa
PGI blanco	0.02	----	0.1	2
Muestra en blanco	----	0.1	0.02	2
Reactivo de glucosa en blanco	----	----	0.12	2
Prueba	0.02	0.1	----	2

- Mezclar los tubos e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-35 ° C).
- Medir la absorbancia a 340 nm.

Cálculo:

$$A_{\text{total en blanco}} = (A_{\text{muestra en blanco}} - A_{\text{reactivo de glucosa en blanco}}) + A_{\text{PGI en blanco}}$$

$$\Delta A = A_{\text{prueba}} - A_{\text{total en blanco}}$$

$$\text{Fructosa mg} = \Delta A (F) \times (0.614)$$

F= factor de dilución de la preparación de la muestra

3.3.5.3. Análisis de citrato

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de citrato de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

El citrato es un intermediario clave del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) formado por la adición de oxalacetato al grupo acetilo de la acetil-CoA. El citrato se transporta fuera de las mitocondrias a través de la lanzadera de citrato-malato y se convierte de nuevo

en acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos. El citrato es un modulador alostérico tanto de la síntesis de ácidos grasos como de sus acciones sobre la acetil-CoA carboxilasa y del glucólisis a través de sus acciones sobre la fosfofructocinasa.

Materiales

- Placa de 96 pocillos de fondo plano.
- Lector de placas de múltiples pocillos fluorescentes o espectrofotométricos

Procedimiento

- Diluir 10 μL de la solución estándar de citrato 100 mM con 990 μL de agua para generar una solución estándar de 1 mM. Agregar 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μL del estándar de citrato 1 mM en una placa de 96 pocillos, generando 0 (blanco), 2, 4, 6, 8 y 10 nmol/pocillo. Agregue tampón de ensayo de citrato a cada pocillo para llevar el volumen a 50 μL .

Reacción de ensayo:

Configurar las mezclas de reacción según el esquema del **Cuadro 5**

Cuadro 5. Esquema de reacción para citrato

Reactivo	Muestra y estándar	Muestra en blanco
Tampón de ensayo de citrato	44 μL	46 μL
Mezcla de enzimas de citrato	2 μL	----
Desarrollador de citrato	2 μL	2 μL
Sonda de citrato	2 μL	2 μL

- Agregar 50 μL de la mezcla de reacción adecuada a cada uno de los pocillos de control estándar, de muestra y en blanco.
- Mezclar bien con un agitador horizontal o pipeta, e incube a temperatura ambiente durante 30 minutos protegido de la luz. Medir la absorbancia a 570 nm.

Cálculo:

$$S_a/S_v = C$$

S_a = Cantidad de citrato en simple desconocido (nmol) de la curva estándar

S_v = Volumen simple (μL) añadido a los pozos

C = Concentración de citrato en la muestra

Peso molecular del ácido cítrico: 191.12 g / mol

3.3.5.4. Análisis del calcio

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de calcio de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

El calcio, es un elemento intracelular crucial que es responsable de regular muchos procesos celulares. El calcio se encuentra en forma de iones libres o en enlaces complejos, por ejemplo, el fosfato de calcio y complejos de carbonato de calcio que forman el hueso. Numerosos procesos fisiológicos, incluyendo contracción muscular, adhesión celular. Liberación de neurotransmisores, metabolismo del glucógeno celular.

Reactivos

- Microplaca de fondo plano de 96 pocillos
- Lector espectrofotométrico de múltiples placas

Procedimiento

Diluir 10 mL de la solución estándar de calcio 500 mM con 990 mL de agua grado laboratorio para preparar un 5 mM (0.2 mg/mL) solución estándar de calcio. Mezclar bien mediante pipeteo. Añadir 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µL de la solución estándar 5 mM en una placa de 96 pocillos, generando 0 (ensayo en blanco), 0,4, Estándares de 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 mg / pozo. Llevar las muestras a un volumen final de 50 µL con agua.

Ensayo de reacción

- Se agrega 90 µL del reactivo cromogénico a cada uno de los estándares o controles. Mezclar suavemente.
- Agregar 60 µL de tampón de ensayo de calcio a cada pocillo y mezclar suavemente.
- Incubar la reacción durante 5-10 minutos a temperatura de ambiente. Se debe proteger la placa de la luz durante incubación.
- Medir la absorbancia a 575 nm.

Cálculo:

Concentración de Calcio

$$S_a / S_v = C$$

S_a = Cantidad de calcio en una muestra desconocida (mg) de curva estándar

S_v = volumen de muestra (mL) agregado a los pozos

C = Concentración de calcio en la muestra

Peso molecular de calcio: 40 mg / mmol

3.3.5.5. Análisis de zinc

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de zinc de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

El zinc, uno de los metales traza más abundantes en los organismos vivos, contribuye a una variedad de funciones biológicas que incluyen el desarrollo neurológico, el metabolismo de los ácidos nucleicos y la transducción de señales.

Materiales

- Microplaca de fondo plano de 96 pocillos
- Lector espectrofotométrico de placas múltiples

Procedimiento

Diluir 10 μL del estándar de zinc 50 mM con 990 μL de agua para preparar una solución estándar de 0,5. Agregue 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μL de la solución estándar de 0.5Mm en una placa de 96 pocillos, generando 0 (blanco), 1, 2, 3, 4 y estándares de 5 nm/pozo. Agregue agua a cada pozo para llevar el volumen a 50 μL . Medir la absorbancia a 560 nm.

Cálculo:

$$S_a/S_v = C \text{ (nmol}/\mu\text{L o mM)}$$

S_a = Cantidad de zinc en una muestra (nmol) desconocida de la curva estándar.

S_v = Volumen (μL) de muestra agregado al pozo de reacción.

C = concentración de zinc en la muestra.

3.3.5.6. Análisis del cloro

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de cloro de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

El cloruro es un anión esencial que se necesita para el correcto funcionamiento y ayuda a mantener el equilibrio ácido-base del cuerpo. En la fibrosis quística, las mutaciones en el gen regulador de la conductancia trans membrana.

La concentración de cloruro se determina mediante una reacción de competencia entre Hg^{2+} y Fe^{2+} para 2, 4, 6-tris 2-piridil) -s-triazina (TPTZ). El complejo de preferencia Hg -TPTZ no exhibe color. En presencia de cloruro, Hg^{2+} forma $HgCl_2$, que precipita, permitiendo que TPTZ forme complejos con Fe^{2+} . El complejo Fe -TPTZ da como resultado un producto colorimétrico (620 nm) proporcional al cloruro presente.

Materiales

- Microplaca de fondo plano de 96 pocillos
- Lector de placas.

Procedimiento

Estándares de cloro para la detección colorimétrica. Agregar 0, 2, 4, 6, 8 y 10 μ L de la solución estándar de 10 Mm en una placa de 96 pocillos, generando 0 (blanco), 20, 40, 60, 80 y 100 nmol/estándares de pozo. Agregar agua a cada pozo para llevar el volumen a 50 μ L.

Preparación de la muestra

Agregar 10 -50 μL de muestra a los pozos. Llevar las muestras a un volumen final de 50 μL .

Reacción de ensayo

Agregar 150 μL del reactivo de cloruro a cada uno de los pocillos. Mezclar bien con un agitador horizontal o mediante un pipeteado, e incubar la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente. Cubrir la placa y proteger de la luz durante la incubación. Medir la absorbancia a 620 nm.

Calculo:

$$S_a/S_v \times D = C \text{ (nmol}/\mu\text{l, } \mu\text{mol/ml o Mm)}$$

S_a = cantidad de cloruro en una muestra desconocida (nmol) de la curva estándar

S_v = volumen de muestra (μL) añadido al pozo de reacción

D = dilución de la muestra original

C = concentración de cloruro en la muestra peso atómico del cloruro: 35.5 g / mol

3.3.5.7. Análisis de proteína total

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de proteína total de SIGMA – ALDRICH.

3.3.5.8. Fundamento

Los procedimientos de Biuret y Lowry son métodos para la determinación de proteínas.

El primero es ampliamente utilizado para ensayos clínicos. Este último, aunque más

sensible, se usa para trabajos de investigación y está limitado por la escasa estabilidad de los reactivos combinados, la no reproducibilidad del color, especialmente a baja concentración de proteínas y respuesta cromogénica no lineal con la concentración de proteínas.

Materiales

- Espectrofotómetro
- Cubetas
- Pipetas
- Tubos de ensayo
- Frasco volumétrico de 50 mL
- Solución de cloruro de sodio al 0.85%

Procedimiento

- Diluir las muestras de prueba con una solución de cloruro de sodio al 0.85% para obtener un rango de concentración de proteína final de 150 – 1000 ug.
- Etiquetar un tubo de ensayo para el blanco y uno para cada muestra de ensayo (prueba 1 y prueba 2).
- En el tubo de ensayo etiquetado en blanco, agregue 0.2 mL de solución de cloruro de sodio al 0.85%.
- Agregar 0.2 mL de una solución de muestra de prueba diluida preparada en el paso 1 al tubo de prueba debidamente etiquetado.
- A cada tubo de ensayo, agregar 2.2 mL del reactivo de Biuret. Mezclar bien y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- Agregar 0.1 mL de folin y reactivo de fenol de ciocalto a cada tubo. Mezclar bien cada tubo inmediatamente después de la adición. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Transferir el contenido de los tubos de ensayo a cubetas apropiadas y lea la absorbancia utilizando el banco como referencia a la misma longitud de onda y en el mismo instrumento utilizado para preparar la curva de calibración.

Determinar la concentración de proteína ($\mu\text{g/mL}$) de cada muestra de prueba diluida a partir de la curva de calibración. Multiplicar por el factor de dilución (paso 1) para obtener la concentración de proteína en cada muestra de prueba.

Curva de calibración

- Pipetear 0.5 mL de la proteína estándar en un matraz volumétrico de 50 mL
- Diluir a 50 mL con una solución de cloruro de sodio al 0.85%
- Pipetear en 5 tubos de ensayo las soluciones indicadas en el **Cuadro 6**

Cuadro 6. Soluciones para curva de calibración de proteína total

Tubo de ensayo	Proteína diluida estándar (paso 1) (mL)	0.85% solución de cloruro de sodio (mL)	Proteína ($\mu\text{g/mL}$)
1	0	0.2	0
2	0.05	0.15	250
3	0.1	0.1	500
4	0.15	0.05	750
5	0.2	0	1000

- A cada tubo de ensayo, agregar 2.2 mL del reactivo de Biuret. Mezclar bien y dejar reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

- Agregar 0.1 mL de folin y reactivo de fenol de ciocalto a cada tubo. Mezclar bien cada tubo inmediatamente después de la adición. Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Transferir el contenido de los tubos de ensayo a cubetas apropiadas y lea la absorbancia a 550-750 nm (color máximo a 700-750 nm) utilizando el tubo de ensayo 1 como referencia.
- La curva de calibración se obtiene trazando el valor de absorbancia versus la concentración de proteína.

3.3.5.9. Análisis de albumina

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de albumina de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

La albúmina es la proteína plasmática más abundante en los humanos representa aproximadamente el 60% del suero total. La albúmina desempeña importantes funciones fisiológicas, incluyendo el mantenimiento de la presión osmótica coloidal y unión de sustancias clave como la grasa de cadena larga. Ácidos, ácidos biliares, bilirrubina, hematina, calcio y magnesio. Posee antioxidantes y anticoagulantes. Efectos, actúa como portador de factores nutricionales y medicamentos, y es un eficaz tampón de pH plasmático. El kit utiliza bromocresol verde, que forma un complejo coloreado específicamente con albúmina. La intensidad del color, medida a 620 nm, es directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.

Materiales

- Lector de placas

- Microplacas de 96 pocillos
- Pipeta multicanal

Procedimiento

- Usar agua ultra pura para diluciones. Llevar el reactivo a temperatura ambiente y agitar antes.
- Utilizar estándar de albúmina diluida (5g/dL) en agua ultra pura (ver cuadro 7).

Cuadro 7. Dilución estándar para albumina

Estándar	Albumina estándar	agua	[BSA]
1	100 µL	0 µL	5.0 g/dL
2	80 µL	20 µL	4.0 g/dL
3	60 µL	40 µL	3.0 g/dL
4	40 µL	60 µL	2.0 g/dL
5	30 µL	70 µL	1.5 g/dL
6	20 µL	80 µL	1.0 g/dL
7	10 µL	90 µL	0.5 g/dL
Blanco	0 µL	100 µL	0 g/dL

- Transferir 5 mL de estándares diluidos, en blanco y muestras diluidas a los pozos apropiados.
- Agregar 200 µL de reactivo y mezclar ligeramente para evitar burbujas.
- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y medir la absorbancia a 570 –670 nm (pico absorbancia a 620 nm).

Cálculo:

Usar la curva estándar para determinar la concentración de albúmina de la muestra

3.3.5.10. Análisis de fosfolípidos

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de fosfolípidos de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

Los fosfolípidos son una clase de lípidos, que constituyen un componente principal de las membranas celulares. Roles en la transducción de señales. La mayoría de los fosfolípidos contienen un diglicérido, un grupo fosfato y una colina.

El kit de ensayo de fosfolípidos proporciona un método simple, directo, y el ensayo de alto rendimiento para medir la colina, contención fosfolípidos en muestras biológicas.

Materiales

- Lector de placas
- Microplacas de 96 pocillos
- Pipeta multicanal

Procedimiento

- Configurar las mezclas de reacción de acuerdo con el esquema en el **Cuadro 8**

Cuadro 8. Mezclas de reacción para fosfolípidos

Reactivo	Muestra y estándar	Muestra en blanco
Tampón de ensayo	85 µL	86 µL
Mezcla de enzimas	1 µL	----
PLD enzima	1 µL	1 µL
Reactivo de tinte	1 µL	1 µL

- Agregar 80 mL de la mezcla de reacción apropiada a cada uno pozos mezclar bien usando un agitador horizontal o pipetear, e incubar la reacción 30 minutos a temperatura ambiente. Proteger la placa de la luz durante la incubación.

Cálculo:

Concentración de fosfolípidos

La concentración de fosfolípidos en la muestra puede ser calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\mu\text{M} = \frac{M_{\text{muestra}} - M_{\text{blanco}}}{\text{Pendiente}} \times n$$

M_{muestra} = Absorbancia o intensidad de fluorescencia medida en muestra desconocida

M_{blanco} = Medida de absorbancia o fluorescencia en blanco (0 estándar, o muestra en blanco si muestra contiene colina)

Pendiente = Determinado a partir de la curva estándar (μM^{-1})

n = factor de dilución

3.3.5.11. Análisis de fosfatasa ácida

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de fosfatasa ácida de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

La fosfatasa ácida es una de las hidrolasas ácidas que normalmente residen en los lisosomas. Es un marcador clásico para la identificación de lisosomas en fracciones sub celulares.

El kit de ensayo de fosfatasa ácida está diseñado para la detección de la actividad de la fosfatasa ácida en extractos de células y tejidos completos, fracciones de columna y preparaciones de enzimas purificadas.

Materiales

- Lector de placas
- Cubetas
- Microplacas de 96 pocillos

Procedimiento

- Equilibrar la solución de sustrato a 37°C
- Ajuste el lector de placas a 405 nm
- Agregar los componentes de reacción a la placa de 96 pocillos según el esquema del **Cuadro 9**.

Cuadro 9. Esquema de reacción para fosfatasa ácida

	Solución de sustrato	simple	Tampón de citrato	Solución estándar
Prueba	50 µL	50 µL de prueba simple	-	-
Blanco	50 µL	-	50 µL	-
Estándar	-	-	-	300 µL
Control positivo	50 µL	2 µL de enzima de control	48 µL	-

- Mezclar usando un agitador horizontal (o pipeteando) e incubar la placa durante 5-10 minutos a 37 °C. La solución coloreada formada después de la adición del NaOH 0.5 N es estable durante varias horas.

- Medir la absorbancia a 405 nm

Cálculo:

$$\text{Unidades/ml} = \frac{A_{405} [\text{muestra}] - A_{405} [\text{blanco}] \times 0.05 \times 0.3 \times \text{DF}}{A_{405} [\text{estándar}] \times \text{tiempo} \times \text{venz}}$$

A_{405} (muestra) = la absorbancia de la muestra

A_{405} (blanco) = la absorbancia del blanco

A_{405} (estándar) = la absorbancia del estándar

DF = factor de dilución de la muestra original

Tiempo = tiempo de incubación a 37 ° C en minutos

Venz = volumen de muestra de enzima agregada al ensayo en mL

0.05 = concentración ($\mu\text{mol} / \text{mL}$) de 4-nitrofenol en la solución estándar

0.3 = 0.3 mL, el volumen total de ensayo en una placa de 96 pocillos, incluida la solución de parada.

3.3.5.12. Análisis de alfa- glucosidasa

Se realizó de acuerdo al protocolo del kit de alfa glucosidasa de SIGMA – ALDRICH.

Fundamento

La alfa glucosidasa hidroliza los carbohidratos al actuar sobre los residuos de D-glucosa unidos a alfa (1-4) no reductores terminales con la liberación de D-glucosa. En este ensayo, la actividad de la α - glucosidasa se determina por una reacción en la que la alfa- glucosidasa hidroliza la p-nitrofenil-alfa-D-glucopiranosida que resulta en la

formación de un producto colorimétrico (405 nm). Proporcional a la actividad alfa-glucosidasa presente.

Materiales

- Lector de placas.
- Cubetas
- Microplacas de 96 pocillos
- Pipeta multicanal

Procedimiento

- Utilizar agua ultra pura para la preparación del calibrador.
- Transferir 20 μL de agua a dos pozos de una placa transparente de 96 pocillos. Agregar 200 μL de agua en uno de estos pozos y 200 μL de calibrador en el otro pozo.
- Preparar la mezcla de reacción maestra según el esquema del **cuadro 10**.

Cuadro 10. Esquema de reacción para α - glucosidasa

Reactivo	Volumen
Tampón de ensayo	200 μL
Sustrato alfa- NPG	8 μL

- Transferir 20 μL de cada muestra a pocillos separados de la placa. Transferir 200 μL de la mezcla de reacción maestra a cada uno de los pocillos de muestra.
- Incubar las muestras a temperatura ambiente a 37°C. Después de 20 minutos, tomar la medida final de absorbancia a 405 nm.

Cálculo:

$$\text{Actividad } \alpha\text{-glucosidasa (unid/L)} = \frac{(A_{405})_{\text{final}} - (A_{405})_{\text{inicial}}}{(A_{405})_{\text{calibrador}} - (A_{405})_{\text{agua}}} \times 250 \text{ und/L}$$

$(A_{405})_{\text{calibrador}}$ = Valor para calibrador a los 20 minutos

$(A_{405})_{\text{agua}}$ = valor para el agua a los 20 minutos

3.4. Diseño estadístico para el análisis de los resultados

El análisis de los cambios físicos del espermatozoide como son: motilidad, concentración, vitalidad, morfología a las 0, 12, 24, 36, 48 horas después de la cópula a nivel útero y oviductos y los cambios bioquímicos como la glucosa, fructosa, citrato, calcio, zinc, cloro, proteínas totales, albumina, fosfolípidos, fosfatasa acida, alfa glucosidasa a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas después de la cópula a nivel de útero y oviductos. Se realizaron mediante el programa estadístico NCSS (Number Crunching Statistical System) Layton, UT, USA. análisis de varianza modelo lineal general con diseño bloque completamente al azar con arreglo factorial 5 x 3 y la comparación de medias a través de la prueba de Duncan ($P \leq 0.05$).

En donde: $Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_{ij} + (T \times \beta)_{ij} + E_{ijk}$

Y_{ijk} = variable respuesta

μ = media población o constante común.

$T_i = (1-5)$ tiempo de colecta de la muestra (0, 12, 24, 36, 48) horas después de la cópula).

$\beta_{ij} = (1-3)$ lugares de colecta de la muestra (útero, oviducto derecho, oviducto izquierdo).

$T \times \beta$ = interacción de tiempo de colecta de la muestra y lugares de colecta de la muestra.

E_{ijk} = error experimental

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Todos estos cambios obtenidos en el aspecto físico y bioquímico estarían muy relacionados con el contenido uterino (carbohidratos, proteínas, lípidos, enzimas, etc.) y el líquido oviductal que se encuentran en el tracto reproductivo de la hembra que tiene como función la capacitación e hiperactivación de los espermatozoides (Hunter, 2011). Para el presente trabajo de investigación se recuperó el contenido uterino y oviductal después de la cópula y los resultados fueron los siguientes:

4.1. Cambios físicos del espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra después de la cópula

4.1.1. Motilidad espermática

La motilidad espermática (Cuadro 11), a los diferentes tiempos en el útero, oviducto izquierdo y derecho no fueron diferentes ($p > 0.05$).

Cuadro 11. Promedio de la motilidad espermática en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).

Tiempo /Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	84.0	68.0	60.0
12 horas	4	40.0	30.0	42.5
24 horas	4	21.3	38.3	36.0
36 horas	4	38.0	72.0	68.0
48 horas	4	53.3	75.0	62.5

Motilidad espermática ($P > 0.05$) por ubicación y tiempo

La motilidad espermática, muestra un diferente comportamiento en los órganos reproductivos de la hembra, pero estadísticamente no fueron significativos. En el

útero, la motilidad a tiempo cero es de 84 % similar a la del eyaculado, esta motilidad disminuye ligeramente a las 12 y 24 horas, sin embargo, vuelven a incrementar a las 36 y 48 horas. Estos cambios pueden significar un tiempo de adecuación del espermatozoide a su nuevo ambiente uterino. Porque en el macho, los espermatozoides no están en un ambiente extraño. En cambio, en el tracto reproductivo de la hembra, están en un ambiente completamente diferente y su función es la preparación para una fertilización. La motilidad espermática inicial en la alpaca es parecida a la coneja (Palma, 1986) y ratón (Suarez, 1983), pero, no se tienen más datos en estas dos especies por lo tanto los resultados de este trabajo son únicos y se reportan por primera vez en camélidos sudamericanos.

4.1.2. Concentración espermática

Los promedios de concentración espermática se muestran en el Cuadro 12.

Cuadro 12. Promedio de la concentración espermática en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (millones de espermatozoides/mL).

Tiempo /Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	3.8 ^b	0.8 ^a	0.6 ^a
12 horas	4	0.8 ^a	1.5 ^b	1.8 ^b
24 horas	4	1.0 ^b	1.8 ^b	2.0 ^b
36 horas	4	0.2 ^a	0.4 ^a	0.4 ^a
48 horas	4	0.7 ^a	2.3 ^b	3.1 ^b

Las letras distintas ^{a,b} en la misma fila indican diferencia significativa por ubicación del tracto reproductivo (P < 0.05) .

La concentración espermática a nivel del útero a las 0 horas es 3.8 millones de espermatozoides por mL de semen, pero a partir de las 12 horas después, esta

disminuye probablemente porque algunos espermatozoides son fagocitados por la presencia de macrófagos, que fagocitan un número considerable de espermatozoides (Palma, 1986). La otra explicación de la baja concentración que se obtuvo en el presente trabajo sería que no se colectó todos los espermatozoides debido a que se encuentran adheridos en el epitelio uterino y las criptas oviductales (Overstreet, 1981 ; Suarez, 1998 y Apichela, 2008), pero a las 48 horas se observó un ligero incremento de la concentración espermática a nivel de los oviductos, suponemos que esto se debe a que muchos de los espermatozoides se encuentran adheridos en las criptas oviductales y dejan las criptas oviductales para hacerse libres y que al momento de la ovulación que se da aproximadamente dentro de las 48 horas después de la copula estas se liberan para fecundar al ovulo (Apichela, 2008). Además el contenido del líquido oviductal está muy relacionado con la capacitación e hiperactivación espermática y está también podría ser la razón de que a este tiempo los espermatozoides ya estén preparados para fecundar (Hunter, 2011).

Comparando nuestros resultados con la coneja, que es otro animal de ovulación inducida. Se reportó una concentración espermática de $12 \pm 8 \times 10^6$ en el útero y $0.70 \pm 0.10 \times 10^6$ en el oviducto, a las 5 horas después de la cópula. (Toledano, 2011). En cambio, en la alpaca, al tiempo de 12 horas se encuentra 0.75×10^6 de espermatozoides en el útero y 1.63×10^6 en el oviducto. Aunque los tiempos son diferentes, pero se pueden usar para comparar lo que pasa en la coneja y en la alpaca. La principal diferencia es que en la coneja la deposición de semen es a nivel de la vagina y en la alpaca a nivel del útero. Entonces, la concentración espermática en la coneja es diferente que en la alpaca por el hecho de lugar de deposición de los espermatozoides al momento de la cópula.

4.1.3. Vitalidad espermática

Los promedios de vitalidad espermática se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Promedio de la vitalidad espermática en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).

Tiempo /Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	99.4	99.8	99.8
12 horas	4	95.0	96.0	100
24 horas	4	96.3	96.6	95.4
36 horas	4	80.0	98.2	99.0
48 horas	4	95.2	97.4	99.1

Vitalidad espermática ($P > 0.05$) por ubicación y tiempo

La vitalidad espermática no cambió en las diferentes partes del tracto reproductivo de la alpaca hembra ni de acuerdo al tiempo, por lo tanto, la vitalidad permanece constante, esto nos indica que el espermatozoide no siempre se encuentra en movimiento dentro del tracto reproductivo de la hembra. En el útero la vitalidad es mayor a 80 % y a nivel de los oviductos es mayor a 94.5 % llegando hasta un 100 %.

En estudios realizados por (Bravo y col .,1997 ; Aller y col., 2003) obtuvieron datos de la vitalidad espermática de semen obtenido por vagina artificial fueron (72.05 %, 68.5 % y 70.04 %) respectivamente. Bravo y col., 1997 indican que la vitalidad espermática se mantiene constante a pesar de la frecuencia de colección. Por lo tanto, en el presente trabajo tampoco hubo cambios en la vitalidad espermática obtenido de las diferentes partes del tracto reproductivo de la hembra ni a las diferentes horas de la obtención de la muestra.

4.1.4. Morfología espermática

Los promedios de la morfología espermática aparecen en los cuadros siguientes, espermatozoides normales (Cuadro 14), espermatozoides con anomalías en la cabeza (Cuadro 15). Espermatozoides con gota citoplasmática (Cuadro 16) y espermatozoides con defectos en la cola (Cuadro 17)

Cuadro 14. Promedio de espermatozoides normales en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	94.4	95.0	96.2
12 horas	4	98.5	99.0	99.8
24 horas	4	96.1	99.4	98.4
36 horas	4	99.0	99.4	98.8
48 horas	4	97.0	99.5	99.0

Espermatozoides normales ($P > 0.05$) por ubicación y tiempo

A nivel del útero los oviductos son similares, no existiendo diferencia significativa. A las 0 horas se observa que a nivel del útero y los oviductos se encontró de un 94 % – 96.2 %, pero después de este tiempo el porcentaje de espermatozoides normales son mayores al 98%. El cual nos puede indicar que una vez que el espermatozoide ingresa al tracto reproductivo de la hembra los espermatozoides anormales son fagocitados por los macrófagos (PMN) del útero, habiendo de esta manera una selección dentro del tracto reproductivo de la hembra (Palma, 2001). Otros estudios realizados por (Bravo y col., 1997; Mendoza, 2001) obtuvieron datos de 93.07 % y 90.1% espermatozoides normales, mediante vagina artificial e indican que este porcentaje se ve disminuido de acuerdo a la frecuencia de colección.

Cuadro 15. Promedio de espermatozoides con defectos en la cabeza a nivel del útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	1.4 ^b	0.4 ^a	0.2 ^a
12 horas	4	0.3 ^a	0.1 ^a	0.1 ^a
24 horas	4	0.8 ^a	0.2 ^a	0.4 ^a
36 horas	4	0.2 ^a	0.2 ^a	0.2 ^a
48 horas	4	1.0 ^b	0.6 ^a	0.6 ^a

Las letras distintas ^{a,b} en la misma columna indican diferencia significativa en la ubicación del tracto reproductivo ($P < 0.05$).

Los defectos de cabeza del espermatozoide son diferentes según la ubicación en el tracto reproductivo, pero no son diferentes de acuerdo al tiempo. A nivel del útero los defectos de cabeza están en un porcentaje de 0.2 a 1.4 %, en cambio a nivel de los oviductos es ligeramente bajo siendo de 0.1 – 0.6 %. Por lo tanto este resultado nos indica que los espermatozoide con defectos a nivel de la cabeza no están presentes en los oviductos (Kably, 2008). En estudios realizados por Bravo y col (2002c) clasifico los defectos de cabeza como uno de los mas frecuentes que se presenta en una eyaculacion pero para Flores y col (2002) los defectos de la cabeza no se presentan con mucha frecuencia.

Por lo tanto, se puede indicar que hay una selección natural dentro del tracto reproductivo le la hembra razón por la cual en el presente trabajo se encontró un mínimo de espermatozoide con defectos en la cabeza (Palma, 2001).

Cuadro 16. Promedio de espermatozoides con gota citoplasmática, a nivel del útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.6 ^b	0.2 ^b	0.1 ^a
12 horas	4	0.2 ^b	0.1 ^a	0.1 ^a
24 horas	4	0.1 ^a	0.1 ^a	0.1 ^a
36 horas	4	0.1 ^a	0.2 ^b	0.1 ^a
48 horas	4	0.1 ^a	0.1 ^a	0.1 ^a

Las letras distintas ^{a,b} en la misma fila indican diferencia significativa por la ubicación del tracto reproductivo ($P < 0.05$).

La presencia de gota citoplasmática cambio ($P < 0.05$), con respecto a la ubicación del tracto reproductivo, siendo así un 0.6% a nivel del útero y un 0.2%, 0.1% en el oviducto izquierdo y derecho respectivamente. El mayor porcentaje de espermatozoides con este defecto se presentó a nivel del útero y esto puede ser debido a que después de la copula los espermatozoides normales o con defectos se encuentran en mayor cantidad en el útero y cuando se movilizan hacia los oviductos, muchos de ellos mueren en el camino o son fagocitados, por esta razón podemos suponer que solo los espermatozoide normales llegan al oviducto para fecundar, porque en este trabajo se observó que la cantidad de espermatozoides con gota citoplasmática a nivel de los oviductos son mínimas. Además la presencia de gotas citoplasmáticas en un eyaculado nos indica la falta de maduración de los espermatozoides (Smith, 1999). Es por esta razón que las gotas citoplasmáticas juntamente con otras anomalías espermáticas incrementan con la frecuencia de la colecta de semen (Bravo y col., 1997).

Cuadro 17. Promedio de espermatozoides con defectos en la cola a nivel del útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (%).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	3.6 ^b	4.4 ^b	3.6 ^b
12 horas	4	1.3 ^b	1.0 ^b	0.3
24 horas	4	3.0 ^b	0.7 ^a	1.2 ^b
36 horas	4	0.8 ^a	0.2 ^a	0.8 ^a
48 horas	4	2.0 ^b	0.5 ^a	0.4 ^a

Las letras distintas ^{a,b} en la misma columna y fila indican diferencia significativa en la ubicación del tracto reproductivo de la hembra y el tiempo ($P < 0.05$).

La presencia de espermatozoides con defectos en la cola cambió con respecto al tiempo y a la ubicación del tracto reproductivo siendo un 3.6% en el útero y en los oviductos un 4% al tiempo 0, estos porcentajes a este tiempo fueron significativos y puede ser debido a que el pene de la alpaca llega hasta los cuernos uterinos facilitando que los espermatozoides lleguen al oviducto. Pero a las 48 horas se observa que el porcentaje de espermatozoide a nivel del útero es de 2% y en los oviductos disminuye a un 0.4 % quizá esto estaría relacionado al tiempo que el espermatozoide tiene que esperar para fecundar y que los macrófagos uterinos fagocitan a los espermatozoides anormales.

Esto nos indicaría también que los espermatozoides que presentan defectos en la cola no pueden movilizarse, por lo tanto, se quedan a nivel del útero (Palma, 2001). El porcentaje de los espermatozoides con defectos a nivel de la cola son muy bajos (Flores y col., 2002).

4.2. Cambios bioquímicos del plasma seminal en el tracto reproductivo de la hembra después de la cópula

4.2.1. Glucosa

Los promedios de concentración de glucosa se muestran en el Cuadro 18.

Cuadro 18. Concentración promedio de glucosa en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (mg/mL).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.034 ^b	0.014 ^a	0.034 ^b
12 horas	4	0.014 ^a	0.025 ^b	0.034 ^b
24 horas	4	0.005 ^a	0.003 ^a	0.010 ^a
36 horas	4	0.034 ^b	0.034 ^b	0.005 ^a
48 horas	4	0.021 ^b	0.042 ^b	0.034 ^b

Las letras distintas ^{a,b} en la misma columna y fila indican diferencia significativa en la ubicación del tracto reproductivo de la hembra y el tiempo ($P < 0.05$).

La concentración de glucosa en las diferentes partes del tracto reproductivo y en relación al tiempo después de la cópula fueron significativamente diferentes. Se observó que a las 24 horas esta concentración disminuye en el útero y los oviductos, esto podría indicar que a este tiempo los espermatozoides no están utilizando glucosa; esto estaría relacionado con la motilidad espermática, la cual también disminuye a este tiempo. Pero esta concentración de glucosa se incrementa a partir de las 36 horas, esto puede ser porque probablemente los espermatozoides dejan las criptas oviductales para el encuentro con el ovocito y posterior fertilización.

En el presente trabajo se recuperó el contenido uterino y oviductal a distintos tiempos después de la copula y se puede inferir que la concentración de glucosa es mucho

menor a lo reportado por Garnica y col., (1993) quien trabajo con muestras de eyaculado en alpacas de 3 y 6 años, otro trabajo reportado por Diaz (2015), quien obtuvo datos del plasma seminal fresco y congelado, los cuales también son mayores a los datos obtenidos en el presente trabajo.

4.2.2. Fructosa

Los promedios de concentración de fructosa se muestran en el Cuadro 19.

Cuadro 19. Concentración promedio de fructosa en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (mg/mL).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.109	0.246	0.270
12 horas	4	0.098	0.270	0.300
24 horas	4	0.220	0.095	0.270
36 horas	4	0.140	0.163	0.144
48 horas	4	0.255	0.334	0.179

Concentración de fructosa ($P > 0.05$) por ubicación y tiempo

No se encontró diferencia significativa en la concentración de fructosa obtenidos de las diferentes partes del tracto reproductivo de la hembra y a distintos tiempos después de la cópula. La fructosa es el carbohidrato más abundante en el plasma seminal, provee más de la mitad de los carbohidratos consumidos por los espermatozoides (Suominen, 2001) puede ser que por esta razón se encontró mayor concentración de fructosa en el tracto reproductivo de la hembra en comparación con la glucosa. La fructosa también es esencial para la motilidad espermática y proporcionan energía a los espermatozoides (Suominen, 2001), los resultados del presente estudio indican un mayor uso de fructosa 10 veces mayor en relación a la glucosa (figuras 8 y 9). Esta

podría ser la razón para que el uso de la fructosa se diera de manera similar en todo el tracto reproductivo y en el transcurso del tiempo después de la copula.

En el trabajo de Garnica y col., (1993) obtuvo una concentración de 5.61 ± 1.11 mg/mL de fructosa en plasma seminal de eyaculado en alpacas de 3 y 6 años respectivamente. Por lo tanto, los datos que se obtuvieron en el presente trabajo fueron de 0.098 – 0.3 mg/mL en las diferentes partes del tracto reproductivo de la hembra y diferentes tiempos, estos datos son muy diferentes a los datos antes mencionados. Puede ser debido a que en este trabajo se recuperó el contenido uterino después de la cópula.

4.2.3. Citrato

Los promedios de concentración de citrato se muestran en el Cuadro 20.

Cuadro 20. Concentración promedio de citrato en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (mg/ μ L).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.066	0.057	0.058
12 horas	4	0.064	0.06	0.059
24 horas	4	0.065	0.063	0.066
36 horas	4	0.068	0.064	0.065
48 horas	4	0.069	0.067	0.064

Concentración de citrato ($P > 0.05$) por ubicación y tiempo.

Los resultados del análisis del citrato en las diferentes partes tracto reproductivo y a distintos tiempos indican que no hay diferencias significativas. El citrato es necesario para la síntesis de ácidos grasos y la glucólisis (Suominen, 2001) por esta razón podemos inferir que la actividad del citrato será muy necesario en todo el trato

reproductivo y esto puede ser la razón del porque las concentraciones del citrato se encuentran homogéneas; pero en concentraciones mínimas.

4.2.4. Calcio

Los promedios de concentración de calcio se muestran en el Cuadro 21.

Cuadro 21. Concentración promedio de calcio en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (mg/dL).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.547	0.519	0.293
12 horas	4	0.332	0.337	0.286
24 horas	4	0.496	0.215	0.333
36 horas	4	0.643	0.281	0.395
48 horas	4	0.643	0.281	0.396

Concentración de calcio ($P > 0.05$) por ubicación y tiempo

No hay diferencias significativas en la concentración de calcio de acuerdo a la ubicación, ni con respecto al tiempo. Pero se observa un ligero incremento a nivel del útero en los diferentes tiempos, esto puede ser debido a que a este nivel se utiliza mayor cantidad de calcio en relación a los oviductos, sin embargo, en el útero especialmente a partir de las 24 horas hay mayor concentración de calcio lo que indica que quizá existen otros procesos que necesiten mayor cantidad de calcio en este órgano como podría ser la fagocitosis en el tracto reproductivo de la hembra (Palma, 2001; Troedsson y col., 2005).

En estudios realizados por (Delgado, 2002; Diaz, 2015) quienes analizaron plasma seminal del eyaculado en llamas y alpacas respectivamente, obtuvieron datos muy diferentes a los obtenidos en el presente trabajo. Esto puede ser porque en el presente trabajo las muestras fueron obtenidas del contenido uterino después de la copula.

4.2.5. Zinc

Los promedios de concentración de zinc se muestran en el Cuadro 22.

Cuadro 22. Concentración promedio de zinc en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (Mm).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.361 ^b	0.330 ^a	0.326 ^a
12 horas	4	0.343 ^b	0.331 ^a	0.328 ^a
24 horas	4	0.364 ^b	0.321 ^a	0.322 ^a
36 horas	4	0.364 ^b	0.323 ^a	0.329 ^a
48 horas	4	0.364 ^b	0.323 ^a	0.329 ^a

Las letras distintas ^{a,b} en la misma columna indican diferencia significativa por la ubicación del tracto reproductivo de la hembra ($P < 0.05$).

Las concentraciones de zinc fueron significativas con respecto a la ubicación del tracto reproductivo. Podemos indicar que en el útero hay mayor concentración de zinc, al igual que sucede en los oviductos, por lo tanto, se puede inferir que a este nivel el espermatozoide utiliza zinc porque hay mayor presencia de células polimorfonucleares (Underwood, 1981), por el daño que ocurre en el endometrio uterino, que produce el pene del macho, en cambio a nivel de los oviductos la concentración de zinc es homogénea y ligeramente baja en comparación con el útero.

No se encontraron reportes, por lo tanto, el presente trabajo sería primero en reportar niveles de zinc recuperados del tracto reproductivo de la hembra después de la cópula.

4.2.6. Cloro

Los promedios de concentración de cloro se muestran en el Cuadro 23.

Cuadro 23. Concentración promedio de cloro en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (nmol).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.088 ^b	0.105 ^b	0.077 ^a
12 horas	4	0.020 ^a	0.001 ^a	0.027 ^a
24 horas	4	0.041 ^a	0.005 ^a	0.067 ^a
36 horas	4	0.047 ^a	0.005 ^a	0.114 ^b
48 horas	4	0.047 ^a	0.005 ^a	0.119 ^b

Las letras distintas ^{a,b} en la misma fila indican diferencia significativa por el tiempo de la obtención de la muestra ($P < 0.05$).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que el cloro a las 0 horas a nivel del útero y oviductos se encuentran en mayor concentración, pero a partir de las 12 horas los niveles de cloro disminuyen en el útero y en los oviductos, pero a las 24 horas la concentración vuelve a incrementar en el útero y aún más en el oviducto derecho; por lo tanto, podemos indicar que a estos dos niveles el cloro no es muy utilizado por los espermatozoides. Pero en el oviducto izquierdo se observa que la concentración de cloro disminuye bastante llegando así hasta concentraciones basales, esto puede indicar que el cloro está siendo más utilizado a este nivel del tracto reproductivo. Como el cloro está encargado de regular el pH y de mantener la presión osmótica para que los espermatozoides sobrevivan (Mann, 1954), entonces podemos deducir que a nivel del oviducto izquierdo el ambiente se prepara de mejor manera para la fecundación. Los datos obtenidos por Garnica y col., (1993) de plasma seminal de eyaculado son totalmente diferentes a los obtenidos en el presente trabajo, porque

las muestras en el presente trabajo fueron obtenidas del tracto reproductivo de la hembra después de la cópula.

4.2.7. Proteínas totales

Los promedios de concentración de proteínas totales se muestran en el Cuadro 24.

Cuadro 24. Concentración promedio de proteínas totales en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (g/dL).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.949830 ^b	0.949419 ^a	0.949532 ^a
12 horas	4	0.949643 ^a	0.949547 ^a	0.949551 ^a
24 horas	4	0.949639 ^a	0.949507 ^a	0.949984 ^b
36 horas	4	0.949659 ^a	0.949341 ^a	0.949638 ^a
48 horas	4	0.949825 ^b	0.949764 ^b	0.949649 ^a

Las letras distintas ^{a,b} en la misma fila y columna indican diferencia significativa por la ubicación del tracto reproductivo y el tiempo de la obtención de la muestra (P < 0.05).

Las concentraciones de proteínas totales fueron significativas en las diferentes partes de tracto reproductivo de la hembra y a diferentes tiempos. Como las proteínas totales son las encargadas de proteger a los espermatozoides de los metales pesados y previene la aglutinación de las células (Derivaux, 1982). En el presente trabajo se encontraron concentraciones de proteínas totales ligeramente altas a nivel del útero, esto podría estar relacionado con la alta viscosidad del semen de alpaca que hace que los espermatozoides estén aglutinados después de la cópula. Pero a nivel de los oviductos se observó que son ligeramente altas por lo tanto podemos deducir que las proteínas totales se están utilizando en concentraciones mínimas.

En el presente trabajo las muestras fueron obtenidos del lavado del contenido uterino de la hembra después de la cópula por lo tanto estos valores son muy diferentes a los obtenidos por Garnica y col., (1993); Delgado (2002) y Díaz (2015), quienes obtuvieron valores de 2.29 ± 3.74 g/dL en plasma seminal de eyaculado.

4.2.8. Albúmina

Los promedios de concentración de albumina se muestran en el Cuadro 25.

Cuadro 25. Concentración promedio de albumina en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (g/dL).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.341	0.343	0.338
12 horas	4	0.339	0.339	0.361
24 horas	4	0.343	0.339	0.339
36 horas	4	0.374	0.340	0.353
48 horas	4	0.339	0.339	0.341

Concentración de Albumina ($P > 0.05$) por ubicación y tiempo

Los resultados obtenidos de la albumina no son diferentes de acuerdo a la ubicación ni el tiempo, y están en los valores de 0.33 a 0.37 g/L por lo tanto la concentración de albumina es similar en todo el tracto reproductivo de la hembra. Estos datos pueden indicar que el espermatozoide utiliza la albumina en cantidades mínimas en el tracto reproductivo de la hembra. Estudios realizados por Díaz (2015), obtuvo los siguientes datos $0.97 - 0.81$ g/dL de plasma seminal fresco y descongelado respectivamente. Estos datos no son tan diferentes a los datos obtenidos en el presente trabajo a pesar de la forma de obtención de la muestra. En cambio, en otro estudio realizado por Delgado (2002), que obtuvo datos muy diferentes que son de 2.158 ± 0.46 g/dL, pero

esto fue obtenido de llamas de diferentes edades y quizá sea esta la razón por la diferencia en los datos.

4.2.9. Fosfolípidos

Los promedios de concentración de fosfolípidos se muestran en el Cuadro 26.

Cuadro 26. Concentración promedio de fosfolípidos en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (uM/dL).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.055428	0.055381	0.055322
12 horas	4	0.055465	0.055307	0.055257
24 horas	4	0.055357	0.055329	0.055302
36 horas	4	0.055369	0.055317	0.055313
48 horas	4	0.055353	0.055315	0.055378

Concentración de fosfolípido ($P > 0.05$) por ubicación y tiempo

No se encontró diferencias significativas según la ubicación del tracto reproductivo ni con relación al tiempo. Los fosfolípidos tiene una gran importancia, porque constituyen el componente principal de las membranas celulares (Davis, 1976) y provocan la capacitación de los espermatozoides (James, 1999). En el presente trabajo este componente se observó que la concentración de los fosfolípidos es ligeramente menor en los oviductos, esto nos indica que a este nivel los espermatozoides están utilizando fosfolípidos en mínimas cantidades, pero no es significativo. Esto puede ser debido a que el espermatozoide está en constante capacitación y adaptación al nuevo medio que es el tracto reproductivo de la hembra. No se encontró ningún reporte del análisis de los valores de este componente bioquímico del plasma seminal. Por lo tanto, el presente trabajo sería el primero en reportar los valores de fosfolípido recuperados del contenido uterino y oviductal después de la cópula.

4.2.10. Fosfatasa ácida

Los promedios de concentración de fosfatasa ácida se muestran en el Cuadro 27.

Cuadro 27. Concentración promedio de fosfatasa ácida en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (Units/mL).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.223	0.075	0.071
12 horas	4	0.081	0.065	0.070
24 horas	4	0.066	0.056	0.061
36 horas	4	0.082	0.050	0.051
48 horas	4	0.089	0.060	0.058

Concentración de fosfatasa acida ($P > 0.05$) por Ubicación y tiempo

La actividad de la fosfatasa acida en las diferentes partes del tracto reproductivo de la hembra con relaciona los diferentes tiempos después de la cópula no fueron significativos. Por lo tanto, la concentración en el útero a las 0 horas es mayor por la presencia de inflamación y hemorragia en el útero. Se puede inferir que hay uso mínimo de la fosfatasa acida, en todo el tracto reproductivo de la hembra. No se encontró reportes de trabajos sobre este componente bioquímico recuperados del contenido uterino y oviductal después de la cópula.

4.2.11. Alfa glucosidasa

Los promedios de concentración de alfa glucosidasa se muestran en el Cuadro 28.

Cuadro 28. Concentración promedio de alfa glucosidasa en el útero, oviducto izquierdo y oviducto derecho a diferentes tiempos después de la cópula (Units/L).

Tiempo/Ubicación	N	Útero	Oviducto Izquierdo	Oviducto Derecho
0 horas	4	0.685	0.754	2.055
12 horas	4	1.713	0.685	0.685
24 horas	4	0.343	1.713	1.026
36 horas	4	1.028	0.343	1.028
48 horas	4	1.370	1.370	0.343

Concentración de alfa glucosidasa ($P > 0.05$) por ubicación y tiempo

No se encontró diferencias significativas en la actividad del alfa glucosidasa en las diferentes partes del tracto reproductivo de la hembra ni a diferentes tiempos después de la cópula. El alfa glucosidasa está relacionado a la baja concentración espermática en toros (Katila, 2006) lo mismo puede estar sucediendo en la alpaca. Tampoco se encontró reportes de este componente bioquímico del plasma seminal.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

1. En el análisis físico de los espermatozoides no se presentaron cambios en la motilidad y vitalidad espermática. Sin embargo, hubo cambios en la concentración espermática, siendo mayor en el útero a las 0 horas y en los oviductos a las 48 horas después de la copula, también hubo cambios en la morfología espermática, los defectos a nivel de la cabeza y la presencia de gota citoplasmática del espermatozoide cambiaron con respecto al tiempo. Los defectos de cola también cambiaron con respecto a la ubicación y el tiempo.
2. En el análisis bioquímico no se encontraron cambios en la fructosa, citrato, calcio, albumina, fosfolípido, fosfatasa acida, alfa glucosidasa. Sin embargo, se encontró cambios en la glucosa y la proteína total con respecto a la ubicación del tracto reproductivo y con respecto al tiempo de la obtención de la muestra. En cambio, el zinc cambio solo con respecto a la ubicación y el cloro presento cambio solo con respecto al tiempo. También podemos concluir que los espermatozoides tienen un mayor uso de fructosa en relación a la glucosa, esta podría ser la razón para que el uso de la fructosa se diera de manera similar en todo el tracto reproductivo después de la cópula.

Es muy importante resaltar que todos estos cambios físicos y bioquímicos estarían muy relacionados con el contenido uterino y oviductal. Por lo tanto, podemos inferir que los cambios que se presentaron en los análisis pueden estar relacionados al tiempo transcurrido en el ambiente uterino después de la cópula hasta la fertilización.

RECOMENDACIONES

1. Los datos obtenidos en el presente trabajo fueron obtenidos *in vivo* por lo tanto sería bueno también realizar trabajos *in vitro*, para obtener más información en cuanto a los avances en la reproducción de los camélidos sudamericanos.
2. Para el uso de las biotecnologías reproductivas en esta especie, se recomienda utilizar los resultados obtenidos en el presente trabajo, porque nos dan información de lo que ocurre dentro del tracto reproductivo de la alpaca hembra después de la cópula.
3. En el uso de azúcares como fuente de energía para los espermatozoides se recomienda el uso de la fructosa, para la aplicación de las biotecnologías reproductivas.
4. Realizar trabajos con respecto a los componentes bioquímicos del tracto reproductivo de la alpaca hembra, las mismas que afectarían a los cambios físicos del espermatozoide y bioquímicos del plasma seminal obtenido del tracto reproductivo de la alpaca hembra después de la cópula.

CAPITULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Adams, G., Ratto, M. (2001). *Reproductive biotechnology in South American camelids.* Revista Invest. Vet. Peru. 1: 134–141.

Alba, J. (1985). Reproducción Animal. 1ra ed. México: Editorial Copilco S.A. 437 p.

Aller, J., Rebuffi, G., Cancino, A., Alberio, R. (2003). *Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (Lama glama).* Arch Zootec 52: 15-23

Apichela, S. (2008). *Estudio morfo- funcional de espermatozoides de camelidos sudamericanos. Interacciones con el oviducto.* San Miguel de Tucuman: Reprod. Domest Anim. ; 44: 943-51. Tesis doctoral

Bravo, W., Moscoso, R., Alarcón, V., Ordoñez, C. (2002a). *Ejaculatory process and related semen characteristics.* J. of Androl, Vol 48: 65-72.

Bravo, W., Flores, U., Garnica, J., Ordoñez, C. (1996a). *Collection on semen and artificial insemination of alpacas.* Theriogenology 47, 619–626

Bravo, W., Moscoso, J., Ordoñez, C., Alarcon, V. (1996B). *Transport of spermatozoa and ova in female alpaca.* Anim Reprod sci 43: 173-179.

Bravo, W., Stabenfeldt, G., Lasley, B., Fowler, M. (1991). *The effect of ovarian follicle size on pituitary and ovarian responses to copulation in domesticated South American camelids.* Biol Reprod. 45: 553-559.

Bravo, W., Flores, U. y Ordoñez, C. (1997). *Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas.* Biol.Reprod.57:520-524.

Bravo, W. (1995). *Physiology of reproduction and fertility evaluation in the female alpaca. Departaments of reproduction and medicine.* Australia: Rev. camelids Nro. 7 ;Ed. Pos Graduate Foundation in Veterinary Science, Sidney- Australia.

Bravo, W. (2002b). *Female reproduction. En: The Reproductive Process of South American Camelids.* Bravo Publishing. 49-64.

Bravo, W., Pacheco, C., Quispe, G., Vilcapaza, Ll., Ordoñez, C. (1999). *Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome.* Arch. Androl 43: 239-246

Bravo, W., Johnson, J. (1994). *Reproductive physiology of the male camelid.* En: Llama medicine. Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice. 10: 259 - 264.

Bravo, W., Garnica, J., Charaja, W. (2018). *Physical characteristics and selected biochemical components of male alpaca accessory sex glands.* JSM in vitro fertil 2: 1019 - 1024.

Bustinza, V. (2001). *La alpaca, conocimiento de gran potencial andino.* Libro 1. Oficina de Recursos de Aprendizaje, Univ. Nacional del Altiplano. Puno. 496 p.

Casaretto, C. (2009). *Morfometría de la cabeza espermática de Llamas y Guanacos.* Ecuador: Resúmenes del V Congreso Mundial sobre Camelidos.

Chia, S. (2014). *Comparison of zinc concentrations in boob and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile man.* J Androl. 21: 53- 7.

Corrales, J. (2002). *Abnormal expression of acid glycosidases in seminal plasma and spermatozoa from infertile men with varicocele.* Reproduction; 123: 411- 417.

Cross, N. (1998). *Role of cholesterol in sperm capacitation.* . Rev Biol Reprod 59: 7 - 11.

Davis, B. (1976). *Effect of modified membrane vesicles from seminal plasma on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa.* Biochem Biophys Res. Commun 69: 1004-1010.

Delgado, C. (2002). *Biochemical components of seminal plasma of llamas (Lama glama) at three ages.* Bolivia: Tesis de la Universidad Católica Boliviana.

Derivaux, J. (1982). *Reproducción de los animales domésticos.* España: Editorial Acribia. 2da ed. 464 p.

Diaz, H. (2015). *Características bioquímicas del plasma seminal fresco y congelado/descongelado de la Alpaca.* Perú: Rev Inv Vet Perú ; 26: 43-48.

Dragilva, E. (1999). *Intracellular Ca, Mg, ATPase regulates calcium influx and acrosome exocytosis in bull and ram spermatozoa.* Biol reprod; 61: 12-26.

Dukes, H. (1981). *Fisiología de los animales domésticos.* Mexico: Edit. Aguilar S.A.

Elwishy, A. (1998). *Reproduction in the male dromedary (camelus dromedaries): A review.* Anim Reprod Sci. 17: 217 - 241.

Ergün, A. (2007). *Correlation of seminal parameters.* Rev Ach Androl 53: 21-23.

Fernandez-Baca, S. (1993). *Manipulation of reproductive functions in male and female*. New World Camelids. Anim. Reprod. 33: 307- 323.

Fernandez-Baca, S. (1996). *Métodos de colección de semen de la alpaca*. Lima: Rev. Fac. Med. Vet. U.N.M.S. Marcos. Vol 18:13-16.

Fernandez-Baca, S. (2005). *Situación actual de los Camélidos Sudamericanos*. Perú: Oficial de Salud Animal FAO/RLC.

Flores, P., Urquieta, B., Muñoz, C., Bustos-Obregon, E.(2002). *Alpaca semen characteristics previous to a mating period*. Anim Reprod. Sci. 72 : 259-266.

Fowler, M., Bravo, W. (1998). *Reproduction*. In: *Fowler, M.E. (Ed.), Medicine and Surgery of South American Camelids*, second ed. Iowa State University Press, Ames, USA. 381–429.

Frase, L. (1998). *Sperm capacitation and acrosome reaction*. Hum Reprod; 13 Suppl. 1:9-12.

Garnica, J., Achata, R., Bravo, W. (1993). *Physical and biochemical characteristic of alpaca semen*. Peru: Reprod. Sci. 32: 85-90.

Giuliano, S., Casaretto, C. (2011). *Uso de colagenasa mejora las características seminales de Llama (Lama glama)*. SPERMOVA 1: 64-65

Hafez, E. (2000). *Reproduccion e Inseminacion Artificial en Animales*. Mexico: Sexta edicion, Editorial Interamericana - Mc Graw - Hill.

Holgado, V. (1987). *Lluvia y temperatura en los Andes del Sur del Perú*. Cusco- Perú: Vol. Extraord. IVITA- La Raya.

Holy, L. (1983). *Bases biologicas de la reproducción bovina*. Mexico: Edit. Diana.

Hunter, R. (1988). *Low incidence of fertilization in superovulated cows: a physiological explanation*. . España: Vet Rec.123: 443-449.

Hunter, R., Coy, P., Gadea, J. y Rath, D. (2011). *Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation*. ASSIST REPROD GENET 28, 191 -197.

Illera, M. (1994). *Reproduccion de los animales domesticos*. Barcelona: Editorial AEDOS. p 390.

INEI. (2012). *Instituto Nacional de Estadistica e Informatica*. CENAGRO,IV Censo Nacional Agropecuario.

- James, P. (1999).** *Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved.* Hum Reprod 14: 27- 32.
- Johnson, L. (1989).** *Llama reproduction.* Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 5, 159–182
- Juyena, N. (2012).** *Seminal plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa.* Journal of Andrology ; 33: 536-551.
- Kareskoski, M. (2008).** *Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity.* Anim. Reprod. Sci. 107:249-256.
- Katila, T. (2006).** *Components of stallion seminal plasma and their influence on spermatozoa.* Pferdeheilkund. 22: 193- 200.
- Kably, A., Carballo, E., Estevez, S. (2008).** *Impacto d las anormalidades de la cabeza del espermatozoide como factor pronostico en la infertilidad de causa no determinada.* Mexico: Artículo original Ginecol Obstet Mex. 76: 5-151.
- Lawzewitsch, D. (1987).** *Reproduction in the male llama (lama glama), a south American Camelid. Spermatogenesis and organization of the intertubular space of the mature.* Acta anatomica. 129: 59- 66.
- Llewelly, J., Forbes, W., Olcott, B. M., Sanders, D. E., Godke, R. A., and Gentry, G. T. (2010).** *Effect of GnRH on fixed-timed artificial insemination pregnancy rates of white-tailed deer.* Reprod. Fertil. Dev. 22, 170.
- Loomis, P. (2006).** *Advanced methods for handling and preparation of stallion semen.* Vet Clin North am equine prect 22:663-676.
- Lubos, H. (1983).** *Bases de la reproduccion bovina.* Mexico: Primera edición, Editorial Diana.Pag.354
- Mendoza, O. (2001).** *Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (Lama pacos) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores.* (Tesis para optar el título de médico veterinario y zootecnista). FMVZ. UNA – PUNO.
- Mann, T. (1954).** *The biochemistry of semen.* . New York: INC. FIRAT Published. U.S.A.
- Muiño-Blanco, T., Perez, R., Cebrian, J. (2008).** *Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress.* Reprod Domes Anim 43.
- Novoa, C., Leyva, V. (1996).** *Reproduction en alpacas y llamas.* Lima: Publicacion cientifica. IVITA 26: 3-18.
- Novoa, C. (1970).** *Reproduction in the camelidae.* J. Reprod. Fert. 22 : 3 - 20.

Overstreet, H. (1981). *The interaction of human spermatozoa with cervical mucus in vivo.* EE.UU: Am J Ginecol.12:123 -134.

Palma, G. (1986). *Tieraerztliche Hochschule Hannover.* Tesis doctoral PhD. *Reprod. Red Vet.* 58: 169 – 195.

Palma, G. (2001). *Interacción funcional entre los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra.* Libro de transferencia de embriones pag. 93 -99.

Pacheco, J. (2008). *Metodos de coleccion de semen en camelidos sudamericanos.* Perú: REDVET. 9: 1 - 17

Quispe, F. (1987). *Evaluacion de las características físicas del semen de alpaca durante la época de empadre.* Puno- Perú: Tesis de la FMVZ - UNA.

Roberts, V. (1984). *Obstetricia veterinaria y patologia de la reproducción.* Buenos Aires: Edit. Hemisferio Sur.

Salisbury, G. (1978). *Fisiologia de la reproducción e inseminación artificial de los bovinos.* España: Edit. Acribia. Zarasoga.

Sebastian, S. (1987). *Pattern of neutral phospholipids in the semen of normospermic, oligospermic and azoospermic man.* *Reprod. Fertil.* 79: 373-378.

Simon, W. T., Neuendorff, D. A., Lewis, A. W., and Randel, R. D. (2000). *A comparison of transvaginal artificial insemination procedures for use in commercially-farmed deer.* *Small Rumin. Res.* 44, 135–140.

Smith, B. (1999). *Overview of reproduction in the male llama and alpaca.* *Proceedings of the Society for Theriogenology.* p 191- 196.

Smith CL, Peter AT, Pugh DG (1994). *Reproduction in llamas and alpacas: a review.* *Theriogenology.* 41, 573–592.

Sorensen, A. (1991). *Evaluacion de la aptitud reproductiva.* En: Sorensen A, Ed. *Reproduccion animal, principios basicos y practicas.* 1ra Ed. Mc Graw - Hill. p 124-143.

Suominen, J. (2001). *Seminal fructose and glucose in asthenozoospermia.* *Int J Androl* 24:253-254.

Suárez, S. (2002). *Gamete transport.* In *Fertilization.* San Diego: ed. Hardy, D.M.: Academic Press. 65: 324-328.

Suarez, S. (1983). *Transporte de esperma y la motilidad en el raton, el oviducto: observaciones in situ.* *Lab. de Reproduccion* 36: 203- 210.

- Suarez, S. (1998).** *The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanisms of formation.* Biol. Reprod. 58: 1105 -1105.
- Sumar, J. (1986).** *Fisiologia de reproduccion de la alpaca.* Nuclear and Related Techniques in Animal Production and Health. Proc. Symp. Vienna. IAEA. 149-177.
- Sumar, J. (1981).** *Coleccion de semen mediante vagina artificial en alpacas.* Chile - Punta Areas: En: Res. IV Conveccion Internacional sobre Camelidos Sudamericanos. p 7.
- Sumar, J. (1983).** *Studies on reproductive pathology in alpacas.* MS Thesis, Department of Obstetrics and Gynaecology, College of Veterinary Medicine, Swedish University of Agriculture and Science, Uppsala. 9–103
- Sumar, J. (2000).** *Reproduction in Farm Animals.* USA.: Ed. by Hafez; ESE 7th Edition. p 218-228.
- Tibary, A. (1999a).** *Reproduction in the male South American Camelidae.* Journal of Camel Practice and Research 6: 235- 248.
- Tibary, A., Memon, M. (1999b).** *Reproductive physiology in the female South American camelidae.* 6, 217–233.
- Tibary, A. (2004).** *Male Infertility in Camelids.* USA: En: Proceedings of the North American Veterinary Coference. p 292-296.
- Töpfer-Petersen, E. (2005).** *Sructure and function of secretory proteins of the male genital tract.* Andrology 37:202-204.
- Troedsson, M. (2005).** *Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination.* Ani Reprod Sci 89:171-186.
- Underwood, E. (1981).** *Studies of zinc nutrlltion in sheep: the relation of zinc to growth, testicular development, and spermatogenesis in young rams.* Australia: Journal of Agricultural Research 20: 889- 897.
- Urquieta, B., Cepeda, R., Caceres, J., Raggi, L., Rojas, J. (1994).** *Season and variation in some reproductive parameters of male vicuña in the high Andes of northern.* Chile: Environ. 26: 79- 87.
- Urquieta, B. (2005).** *Alpaca semen characterictics Ander free and directed mounts during a mating period.* Anim Reprod Sci. 90: 329- 339.
- Vaughan, J., Galloway, D., Hopkins, D. (2003).** *The development of artificial insemination technology in alpacas (Lama pacos).* A report of the Rural Inducstries Research and Development Corporation, RIRDC Publication. Pág. 03-104.

Vaughan, J., Tibary A. (2006). *Reproduction in female South American camelids: A review and clinical observations.* Small Rumin Res 61: 259–281

Vélez, C. (1997). *El efecto de la cópula del macho en el endometrio uterino de la hembra, aspectos histológicos y ecográficos.* Arequipa: Tesis de Médico Veterinario (Universidad Católica Santa María) 68p.

Wong, W. (2002). *Effect of folic acid and zinc sulphate on male factor sub fertility, a double blind, randomized placebo controlled trial.* Fertility and sterility; 77: 491- 498.

ANEXOS

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS CAMBIOS FÍSICOS DEL ESPERMATOZOIDE DESPUÉS DE LA CÓPULA

Anexo 1. Reporte del análisis de varianza de motilidad

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad (alfa=0.05)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	4236.258	1059.065	1.37	0.255032
B: Órgano	3	1674.171	558.0569	0.72	0.543607
AB	12	7132.282	594.3568	0.77	0.681681
Error	67	51939.17	775.2144	-	-
Total	86	81765.52	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V=52.9%

R² =67.8%

Anexo 2. Reporte del análisis de varianza de Concentración

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad (alfa=0.05)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	144.8136	36.20339	0.93	0.452478
B: Órgano	3	606.6521	202.2174	5.19	0.002772*
AB	12	257.8458	21.48715	0.55	0.872446
Error	67	2610.842	38.96778	-	-
Total	86	6043.931	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V=444.5%

R² =43.2%

Anexo 3. Reporte del análisis de varianza de espermatozoides vivos

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad (alfa=0.05)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	61.79461	15.44865	0.20	0.935519
B: Órgano	3	421.1715	140.3905	1.85	0.146417
AB	12	804.1129	67.00941	0.88	0.567456
Error	67	5082.517	75.85846	-	-
Total	86	6670.621	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 9.0%

R² = 76.19%

Anexo 4. Reporte del análisis de varianza de Espermatozoides normales

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad (alfa=0.05)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	115.0819	28.77048	0.24	0.915590
B: Órgano	3	580.262	193.4207	1.60	0.196967
AB	12	1275.83	106.3192	0.88	0.569424
Error	66	7961.525	120.6292	-	-
Total	85	12601.49	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 11.2%

R² = 63.2 %

Anexo 5. Reporte del análisis de varianza de Espermatozoides con defecto de cabeza

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad (alfa=0.05)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	1.25817	0.3145425	0.76	0.555509
B: Órgano	3	6.47754	2.15918	5.21	0.002702*
AB	12	8.51544	0.7096201	1.71	0.083522
Error	67	27.75833	0.4143035	-	-
Total	86	69.67816	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 144.3%

$R^2 = 39.8\%$

Anexo 6. Reporte del análisis de varianza de Espermatozoides con gota citoplasmática

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad (alfa=0.05)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	1.274837	0.3187092	1.32	0.271498
B: Órgano	3	2.608798	0.8695993	3.60	0.017802*
AB	12	2.958276	0.246523	1.02	0.440242
Error	67	16.175	0.2414179	-	-
Total	86	47.67816	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 321.1%

$R^2 = 33.9\%$

Anexo 7. Reporte del análisis de varianza de espermatozoides con defecto de cola

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad (alfa=0.05)	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	87.30768	21.82692	9.11	0.000006*
B: Órgano	3	461.496	153.832	64.21	0.000000*
AB	12	34.85165	2.904305	1.21	0.293372
Error	67	160.5083	2.395647	-	-
Total	86	2612.621	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 97.6%

R² = 6.1%

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LOS CAMBIOS BIOQUÍMICOS DEL PLASMA SEMINAL DESPUÉS DE LA CÓPULA

Anexo 8. Reporte del análisis bioquímico de Glucosa

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	0.02921544	0.007303861	44.49	0.005283*
B: Órgano	2	0.01427226	0.00713613	43.47	0.006092*
AB	8	0.05705956	0.007132445	43.45	0.005115*
error	3	0.0004925	0.0001641667	-	-
Total	17	0.09773828	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 55.7%

R² = 0.5%

Anexo 9. Reporte del análisis bioquímico de fructosa

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	0.01845907	0.004614767	0.44	0.183421
B: Órgano	2	0.0134068	0.0067034	0.63	0.203675
AB	8	0.05401053	0.006751317	0.10	0.456238
Error	3	0.03186587	0.0106219567		
Total	17	0.0858764			

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 49.9%

R² = 12.4%

Anexo 10. Reporte del análisis bioquímico de Citrato

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	3	0.00018730 21	6.243404E-05	1.49	0.238607
B: Órgano	2	0.00013885 45	6.942723E-05	1.65	0.208789
AB	6	0.00010915 19	1.819198E-05	0.43	0.850451
Error	29	0.00121715 7	4.197095E-05		
Total	40	0.00168522 2			

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 10.3%

R² = 72.2%

Anexo 11. Reporte del análisis bioquímico de calcio

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	3	0.1369819	0.04566063	0.92	0.444669
B: Órgano	2	0.2381314	0.1190657	2.39	0.109212
AB	6	0.232642	0.03877367	0.78	0.593013
Error	29	1.443214	0.04976599	-	-
Total	40	2.043729	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 54.5%

R² = 70.6%

Anexo 12. Reporte del análisis Químico de zinc

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	3	0.0001670245	5.567482E-05	0.12	0.947997
B: Órgano	2	0.008131688	0.004065844	8.72	0.001086*
AB	6	0.001410739	0.0002351231	0.50	0.800127
Error	29	0.01352839	0.0004664961	-	-
Total	40	0.02389174	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 6.4%

R² = 56.6%

Anexo 13. Reporte del análisis bioquímico de Cloro

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	3	0.04489816	0.01496605	5.04	0.006205*
B: Órgano	2	0.0047106	0.0023553	0.79	0.461771
AB	6	0.01379844	0.002299741	0.77	0.596075
Error	29	0.08606321	0.002967697	-	-
Total	40	0.1462857	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 102.8%

R² = 58.8%

Anexo 14. Reporte del análisis bioquímico de Proteínas totales

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	1.831029E-07	4.577574E-08	4.11	0.019192*
B: Órgano	2	2.265405E-07	1.132702E-07	10.16	0.001623*
AB	8	3.678286E-07	4.597858E-08	4.12	0.008795*
Error	15	1.672208E-07	1.114805E-08	-	-
Total	29	9.446928E-07	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 0.01%

R² = 17.7%

Anexo 15. Reporte del análisis bioquímico de Albumina

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	0.001015676	0.0002539189	0.86	0.518716
B: Organo	2	0.00025591	0.000127955	0.43	0.659780
AB	8	0.001416884	0.0001771105	0.60	0.762172
Error	11	0.003258314	0.0002962104	-	-
Total	25	0.006108802	-	-	-

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V=4.9%

R² = 53.3%

Anexo 16. Reporte del análisis bioquímico de Fosfolípidos

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	4.757987E-09	1.189497E-09	0.59	0.685777
B: Órgano	2	1.311907E-08	6.559535E-09	3.25	0.124685
AB	8	1.439408E-08	1.79926E-09	0.89	0.579664
Error	5	1.009382E-08	2.018764E-09		
Total	19	4.545825E-08			

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 0.1%

R² = 22.2%

Anexo 17. Reporte del análisis bioquímico de fosfatasa acida

Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	3	0.0287777	0.009592566	0.89	0.456210
B: Órgano	2	0.0208145	0.01040725	0.97	0.391229
AB	6	0.03579896	0.005966493	0.56	0.761478
Error	29	0.311306	0.01073469		
Total	40	0.4022557			

* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 131.9%

$R^2 = 77.4$

Anexo 18. Reporte del análisis bioquímico de alfa glucosidasa

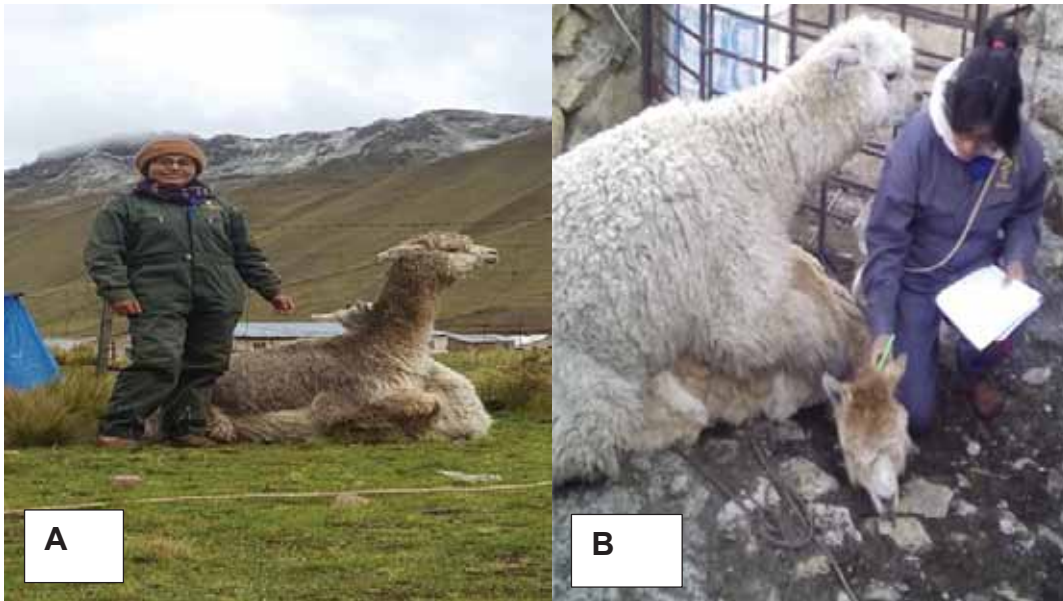
Tabla de análisis de varianza

Término fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Frecuencia calculada	Nivel de probabilidad
A: Tiempo	4	0.2433019	0.06082546	0.06	0.991249
B: Órgano	2	0.2346125	0.1173062	0.12	0.883631
AB	8	7.36857	0.9210713	0.98	0.493860
Error	12	11.2614	0.93845	-	-
Total	26	19.0123	-	-	-

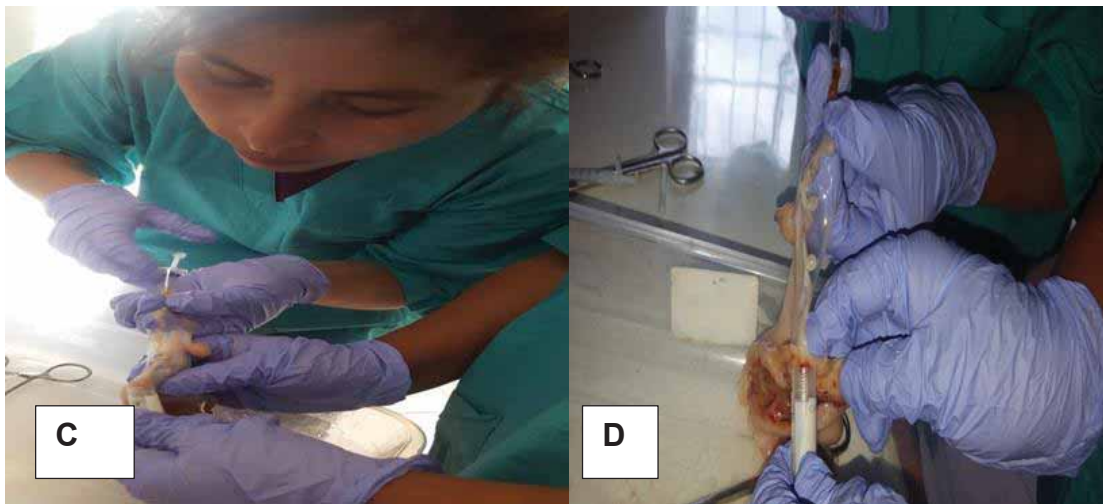
* Término significativo en Alfa = 0.05

C.V= 94.3%

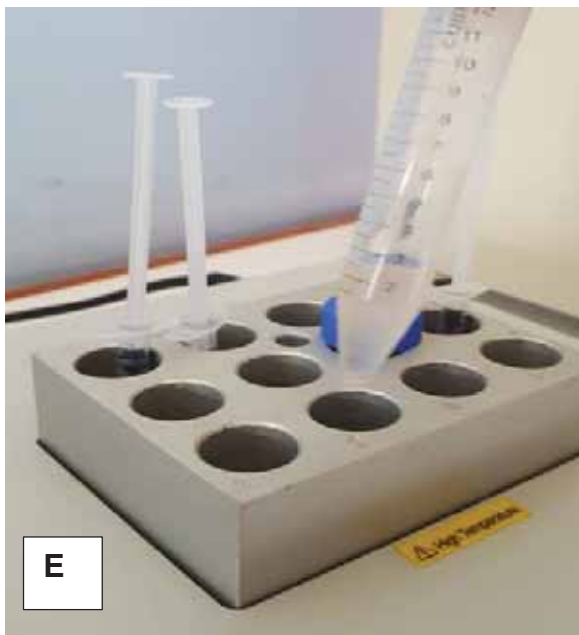
$R^2 = 59.2\%$



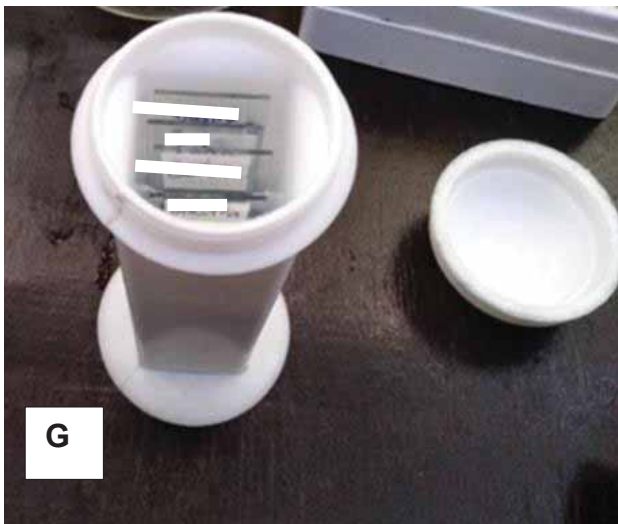
Anexo 19. (A) Imagen de empadre de las alpacas hembras para su posterior beneficio a los diferentes tiempos después de la cópula; **(B)** Imagen de identificación y registro de la hora de del empadre de las alpacas.



Anexo 20. (C) Imagen de lavado de las muestras de útero y oviductos con solución Tris a 37°C, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya; **(D)** Imagen de obtención de las muestras después del lavado, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya.



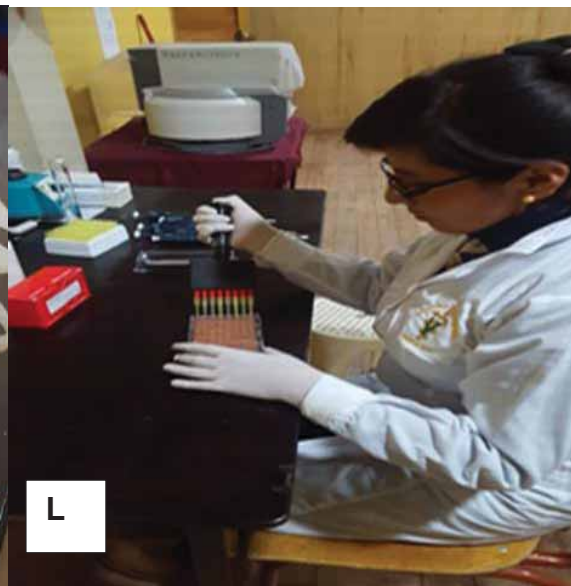
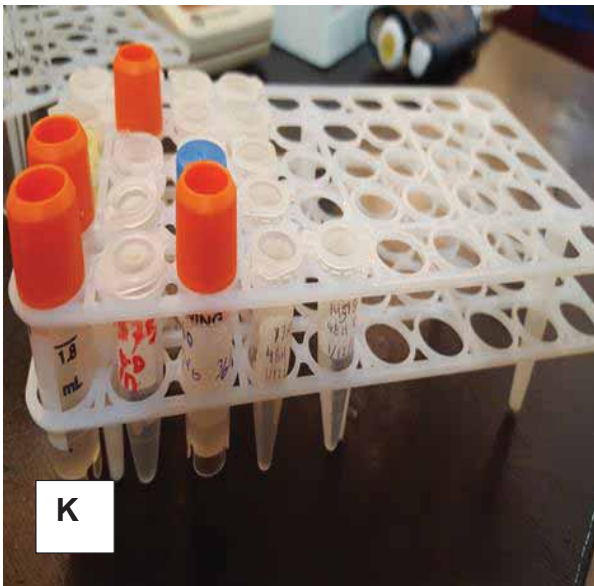
Anexo 21. (E) Imagen de conservación de muestras en baño maría seco, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya; (F) Imagen de evaluación de la motilidad espermática de las muestras, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya.



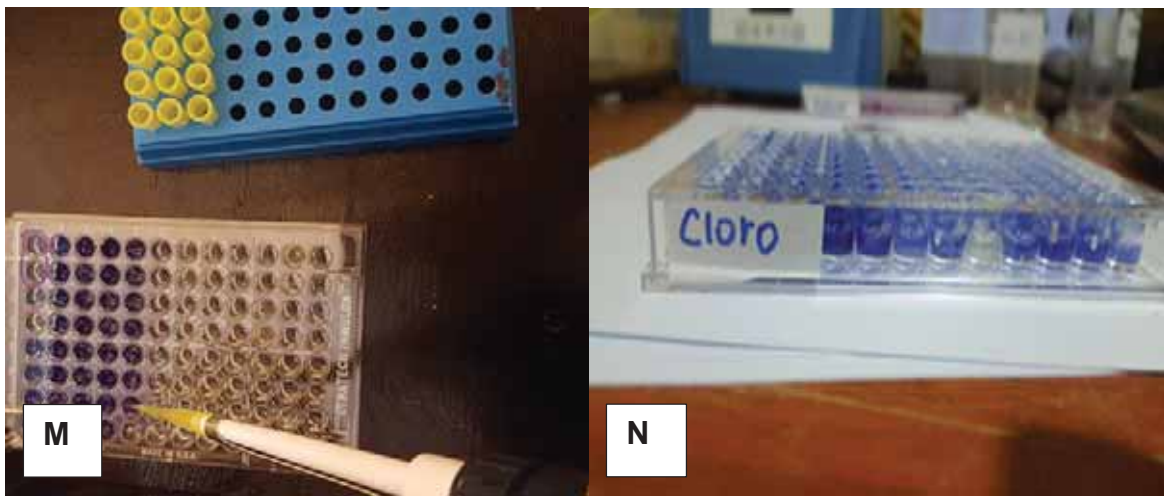
Anexo 22. (G) Imagen de teñido de las muestras con tinción Diff quick para morfología espermática, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya; (H) Imagen de evaluación de la morfología espermática, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya.



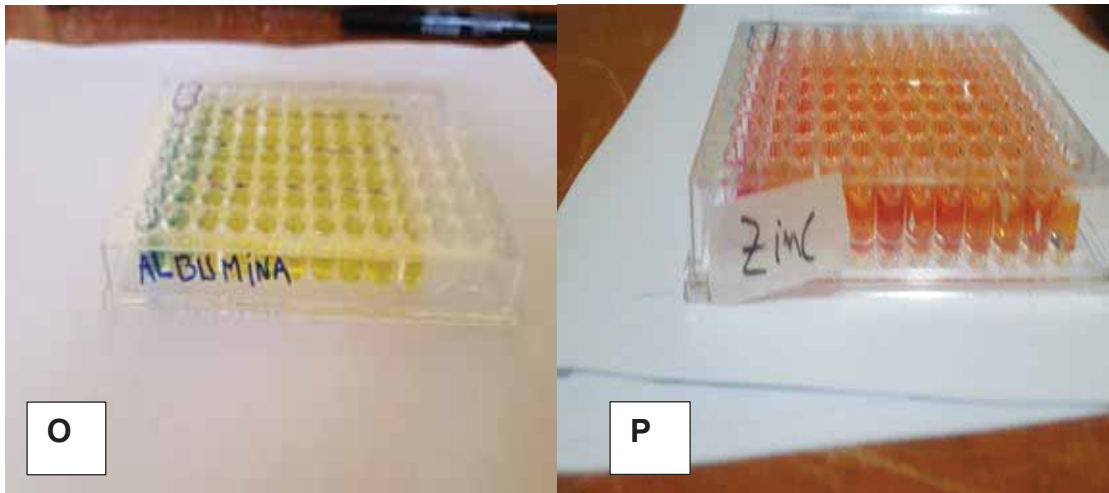
Anexo 23. (I) Imagen de teñido de las muestras con tinción eosina – nigrosina para la vitalidad espermática, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya; (J) Imagen de evaluación de la vitalidad espermática, en el laboratorio de reproducción del CICAS – La Raya



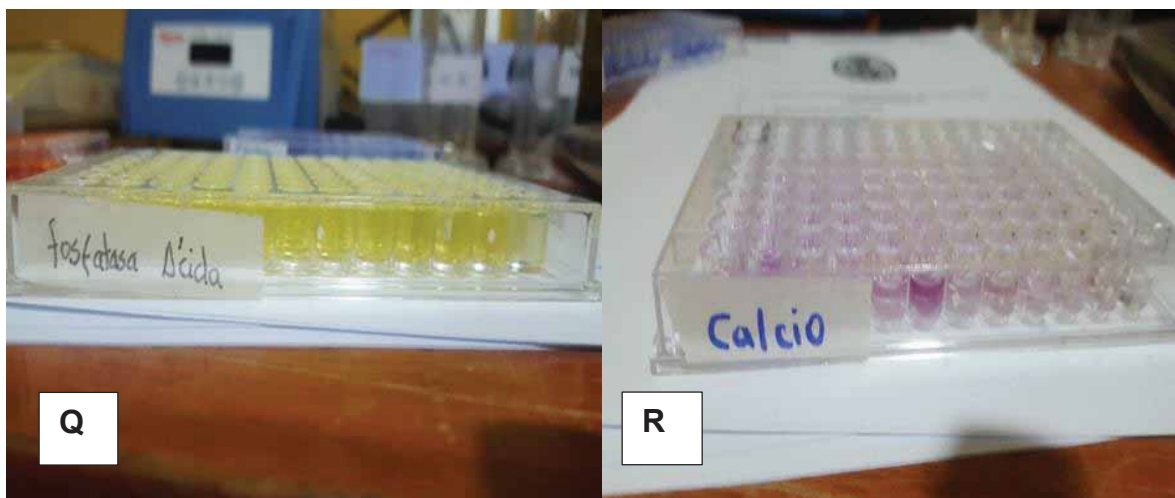
Anexo 24. (K) Imagen de descongelamiento de las muestras de plasma seminal para su análisis bioquímico, en el laboratorio de reproducción en el distrito de Marangani; (L) Imagen de análisis bioquímico del plasma seminal, en el laboratorio de reproducción en el distrito de Marangani



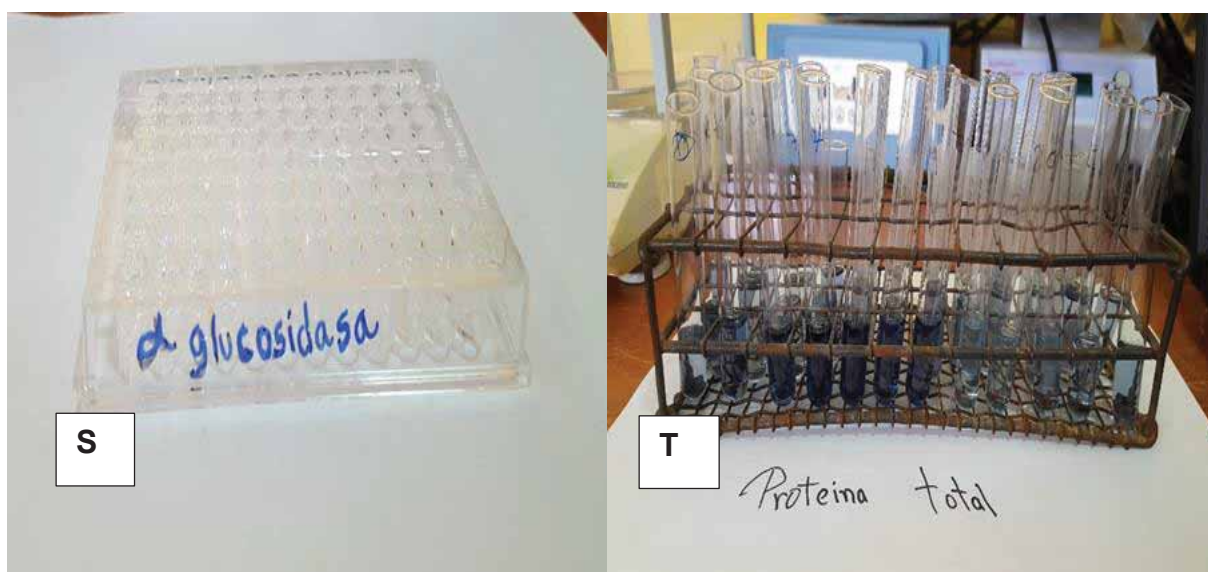
Anexo 25. (M) Imagen de análisis bioquímico de cloro del plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; (N) Imagen de reacción colorimétrica del cloro en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.



Anexo 26. (O) Imagen de reacción colorimétrica del análisis bioquímico de la albumina en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; (P) Imagen de reacción colorimétrica del zinc en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.



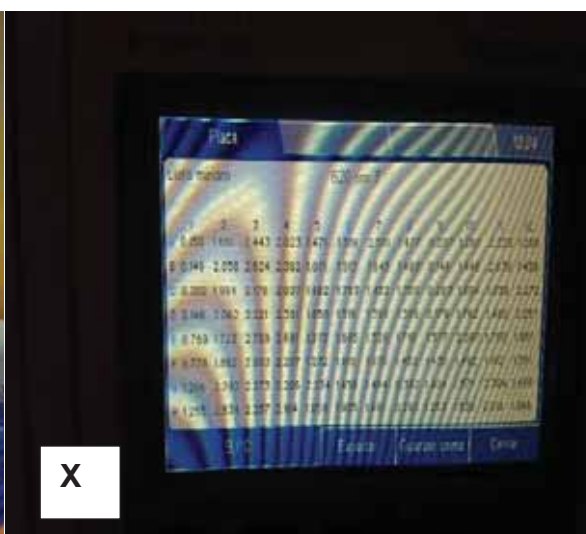
Anexo 27. (Q) Imagen de reacción colorimétrica del análisis bioquímico de la fosfatasa ácida en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; **(R)** Imagen de reacción colorimétrica del calcio en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.



Anexo 28. (S) Imagen de reacción colorimétrica del análisis bioquímico del alfa glucosidasa en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; **(T)** Imagen de reacción colorimétrica de la proteína total en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.



Anexo 29. (U) Imagen de reacción colorimétrica del análisis bioquímico de la fructosa en el plasma seminal, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; **(V)** Imagen de análisis de la reacción colorimétrica de la proteína total en el plasma seminal mediante el lector de placas, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.



Anexo 30. (W) Imagen de análisis de la reacción colorimétrica del análisis bioquímico espectrofotométría, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani; **(X)** Imagen de resultados del análisis plasma seminal mediante el lector de placas, en el laboratorio de reproducción del distrito de Marangani.