



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS**  
**NATURALES**  
**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA**  
**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**Título:**

---

**“EXTRACCIÓN Y CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE  
ALPACAS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL ACADÉMICO  
SALACHE DEL CANTÓN LATACUNGA”**

---

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de  
Médicos Veterinarios

**Autores:**

Molina Panchi Jorge Alcides  
Segovia Villacis Joel Alejandro

**Tutor:**

Garzón Jarrin Rafael Alfonso

**LATACUNGA - ECUADOR**

**Agosto 2023**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Molina Panchi Jorge Alcides, con cedula de ciudadanía 0503823858 y Segovia Villacis Joel Alejandro, con cedula de ciudadanía 0503505901, declaramos ser autores del presente proyecto de investigación: “Extracción y crioconservación de semen de alpacas en el centro experimental académico Salache del cantón Latacunga”, siendo el Doctor Ph.D. Rafael Alfonso Garzón Jarrin, Tutor del presente trabajo; y, eximimos expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certificamos que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de nuestra exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 16 de agosto de 2023



Jorge Alcides Molina Panchi  
Estudiante  
CC:0503823858



Joel Alejandro Segovia Villacis  
Estudiante  
CC:0503505901



Dr. Rafael Alfonso Garzón Jarrin, Ph.D.  
Docente Tutor  
CC:0501097224

## CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DEL AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **JORGE ALCIDES MOLINA PANCHI** identificado con cédula de ciudadanía **0503823858**, de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Extracción y crioconservación de semen de alpacas en el centro experimental académico Salache del cantón Latacunga”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad, según las características que a continuación se detallan:

### **Historial Académico**

**Fecha de inicio de la carrera:** octubre 2018 – marzo 2019

**Fecha de Finalización:** abril 2023 – agosto 2023

**Aprobación en Consejo Directivo:** 30 de noviembre de 2022

**Tutor:** Doctor Ph.D. Rafael Alfonso Garzón Jarrin

**Tema:** “Extracción y crioconservación de semen de alpacas en el centro experimental académico Salache del cantón Latacunga”

**CLÁUSULA SEGUNDA. -LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA. -** Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligado a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusulas cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, 16 de agosto del 2023.



Jorge Alcides Molina Panchi  
**EL CEDENTE**

Dra. Idalia Pacheco Tigselema  
**LA CESIONARIA**

## CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DEL AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **JOEL ALEJANDRO SEGOVIA VILLACÍS** identificado con cédula de ciudadanía **0503505901**, de estado civil soltero, a quien en lo sucesivo se denominará **EL CEDENTE**; y, de otra parte, la Doctora Idalia Eleonora Pacheco Tigselema, en calidad de Rectora y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

**ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - EL CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria, titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Extracción y crioconservación de semen de alpacas en el centro experimental académico Salache del cantón Latacunga”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad, según las características que a continuación se detallan:

### **Historial Académico**

**Fecha de inicio de la carrera:** octubre 2017 – marzo 2018

**Fecha de Finalización:** abril 2023 – agosto 2023

**Aprobación en Consejo Directivo:** 30 de noviembre de 2022

**Tutor:** Doctor Ph.D. Rafael Alfonso Garzón Jarrin

**Tema:** “Extracción y crioconservación de semen de alpacas en el centro experimental académico Salache del cantón Latacunga”

**CLÁUSULA SEGUNDA. -LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

**CLÁUSULA TERCERA. -** Por el presente contrato, **EL CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

**CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO:** Por el presente contrato **EL CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

- a) La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
- b) La publicación del trabajo de grado.
- c) La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.

d) La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.

f) Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

**CLÁUSULA QUINTA.** - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligado a reconocer pago alguno en igual sentido **EL CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

**CLÁUSULA SEXTA.** - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

**CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD.** - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **EL CEDENTE** podrá utilizarla.

**CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS.** **LA CESIONARIA** podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **EL CEDENTE** en forma escrita.

**CLÁUSULA NOVENA.** - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en las cláusulas cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

**CLÁUSULA DÉCIMA.** - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

**CLÁUSULA UNDÉCIMA.** - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, 16 de agosto del 2023.

Joel Alejandro Segovia Villacis  
**EL CEDENTE**

Dra. Idalia Pacheco Tigselema  
**LA CESIONARIA**

## **AVAL DE LA TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

"EXTRACCIÓN Y CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACAS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL ACADÉMICO SALACHE DEL CANTÓN LATACUNGA", de Molina Panchi Jorge Alcides y Segovia Villacis Joel Alejandro, de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también han incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 16 de agosto de 2023



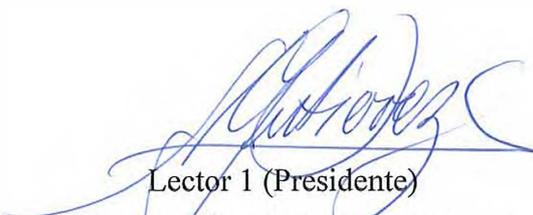
Dr. Rafael Alfonso Garzón Jarrin, PhD  
**DOCENTE TUTOR**  
C.C.: 0501097224

## **AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, los postulantes: Molina Panchi Jorge Alcides y Segovia Villacis Joel Alejandro, con el título de Proyecto de Investigación: "EXTRACCIÓN Y CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACAS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL ACADÉMICO SALACHE DEL CANTÓN LATACUNGA", han considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúnen los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 16 de agosto de 2023



Lector 1 (Presidente)

Dr. Miguel Ángel Gutiérrez Reinoso  
CC: 050223662-3



Lector 2

Dr. Luis Alonso Chicaiza Sánchez. Mg.  
CC: 050130831-6



Lector 3

Dr. Xavier Cristóbal Quishpe Mendoza. Mg.  
CC: 050188013-2

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por siempre saberme guiarme.

A mis padres y mi familia por darme las fuerzas y ganas para seguir adelante con mis sueños.

A la vida que me ha dado la inspiración, fuerza, sabiduría y paciencia para poder seguir firme.

A mis queridos docentes que me han inculcado sus conocimientos con paciencia para poder llegar a donde estoy hoy.

Finalmente, a la Universidad Técnica de Cotopaxi por haberme inculcado una excelente formación académica, a mi tutor Dr. Rafael Garzón Jarrin por prestarme su tiempo e interés en el proyecto, también agradecer a mis lectores: Dr. Miguel Gutiérrez Reinoso, Dr. Xavier Quishpe Mendoza y Dr. Alonso Chicaiza Sánchez quienes aportaron con ideas y sugerencias para tener un trabajo de investigación de calidad.

**JORGE ALCIDES MOLINA PANCHI**

## **AGRADECIMIENTO**

A mis padres que son mi motor e impulsan mis sueños, fueron mis primeros maestros.

A mis compañeros a pesar de todas adversidades fueron parte de esta aventura durante esta etapa de mi vida que jamás será olvidada.

A mi familia que supo animarme en los peores momentos y salir adelante siempre.

Sobre todo, a cada uno de mis docentes de la gran familia utecina a mi tutor Dr. Rafael Garzón Jarrin que nos supo guiar a lo largo del proyecto con sus conocimientos a mis lectores: Dr. Miguel Gutiérrez Reinoso, Dr. Xavier Quishpe Mendoza y Dr. Alonso Chicaiza Sánchez, que con su conocimiento y experiencia nos supieron guiar en este proyecto final, y también lo largo de la carrera.

Finalmente quiero agradecerme a mí por creer en mí y no rendirme en el camino que fue de muchas experiencias y enseñanzas.

**JOEL ALEJANDRO SEGOVIA VILLACIS**

## **DEDICATORIA**

A mi padre y madre que me han brindado su apoyo, inspiración y respeto para poder llegar a cumplir mi sueño de ser Médico Veterinario.

A mi hermano que de igual forma compartimos la pasión por los animales y ha sido incondicional.

A mi querida Cynthia Araque por brindarme todos sus conocimientos y paciencia.

A toda mi familia que siempre me aconseja y me apoya para poder salir de cualquier dificultad.

**JORGE ALCIDES MOLINA PANCHI**

## **DEDICATORIA**

Dedico este resultado de trabajo a mi familia sobre todo a mis padres, hermanos y sobrinos, de cada uno me enseñó algo diferente y me apoyaron en cada etapa de mi formación académica.

A mi madre que ha sido mi mundo desde mi primer segundo en la Tierra que supo amarme, educarme, cuidar de mí y siempre estar en todo momento.

A mi abuelita Eugénita y mi tío Estuardo por sus conocimientos, por su bondad y corazón, por siempre enseñarme valores.

Agradezco a mis mascotas Lana y Vale, sin su compañía, amor, lealtad, y locuras no habría podido lidiar con el estrés de la vida cotidiana,

**JOEL ALEJANDRO SEGOVIA VILLACIS**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

### CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**TÍTULO:** “EXTRACCIÓN Y CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACAS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL ACADÉMICO SALACHE DEL CANTÓN LATACUNGA”

**AUTORES:** Jorge Alcides Molina Panchi

Joel Alejandro Segovia Villacis

### RESUMEN

La crianza de camélidos aún tiene dificultades en su reproducción dadas a las características reproductivas, anatómicas y fisiológicas, por esta razón se realizó la siguiente investigación que tuvo como objetivo la extracción de muestras de semen de alpaca a partir de tres métodos de colección y posteriormente valorar la calidad de semen fresco y post descongelación con el uso del crioprotector “Triladyl CSS One Step”.

Esta investigación se realizó en centro experimental Académico Salache del cantón Latacunga, donde se estimó el uso de 3 alpacas machos previamente evaluados; estos ejemplares fueron aislados y entrenados para posteriormente ponerlos a prueba con los diferentes métodos de colección. En los tres métodos solo un ejemplar mantuvo un alto libido e interés; en el método con maniquí completo más vagina artificial no se obtuvo buenos resultados al momento de la colecta debido a la forma del maniquí, en el método de maniquí con grupa más hembra receptiva no se pudo adaptar a la forma de la grupa y a los movimientos de la hembra, mientras que en el método de desviación de pene y hembra receptiva se obtuvo grandes resultados obteniendo una muestra de 1 ml a 1.5 ml.

La muestra obtenida de semen fresco y semen con diluyente post descongelación fue evaluada de acuerdo a parámetros espermáticos macroscópicos y microscópicos. Demostrando que el semen fresco es el más óptimo para la inseminación artificial, presentando una tasa de 60% de viabilidad, mientras que la muestra con diluyente post descongelación presentó una mortalidad del 25% en comparación con el 14% del semen fresco.

**Palabras clave:** Alpacas macho-métodos de colección seminal-crioconservación

# **TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI**

## **FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES**

### **VETERINARY MEDICINE CAREER**

**THEME:** " EXTRACTION AND CRYOPRESERVATION OF ALPACA SEMEN AT THE SALACHE ACADEMIC EXPERIMENTAL CENTER IN THE LATACUNGA CANTON"

**AUTHORS:** Jorge Alcides Molina Panchi

Joel Alejandro Segovia Villacis

#### **ABSTRACT**

The breeding of camelids still has difficulties in their reproduction due to reproductive, anatomical, and physiological characteristics, for this reason, the following research was conducted with the objective of extracting alpaca semen samples from three methods of collection and subsequently assessing the quality of fresh semen and post thawing with the use of cryoprotectant "Triladyl CSS One Step".

This research was carried out in the Salache Academic Experimental Center in the Latacunga canton, where the use of 3 previously evaluated male alpacas was estimated; these specimens were isolated and trained to later test them with different collection methods. In the three methods, only one specimen maintained a high libido and interest; in the method with a complete dummy plus an artificial vagina, good results were not obtained at the time of collection due to the shape of the dummy, in the method of dummy with rump plus receptive female, it was not possible to adapt to the shape of the rump and the movements of the female, while in the method of deviation of penis and receptive female, great results were obtained obtaining a sample of 1 ml to 1.5 ml.

The sample obtained from fresh semen and semen with post-thawing diluent was evaluated according to macroscopic and microscopic sperm parameters. It showed that fresh semen is the most optimal for artificial insemination, presenting a 60% viability rate, while the sample with a post-thawing extender presented a mortality rate of 25% compared to 14% for fresh semen.

**Keywords:** Male alpacas - seminal collection methods - Cryopreservation.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	ii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DEL AUTOR.....	iii
CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DEL AUTOR.....	v
AVAL DEL TUTOR DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....	vii
AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN .....	viii
AGRADECIMIENTO.....	ix
AGRADECIMIENTO.....	x
DEDICATORIA .....	xi
DEDICATORIA .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xiv
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xx
ÍNDICE DE TABLAS .....	xxi
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xxii
1. INFORMACIÓN GENERAL .....	1
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....	2
3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO .....	2
Beneficiarios Directos: .....	2
Beneficiarios Indirectos: .....	2
4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	3
5. OBJETIVOS .....	3

<b>Objetivo General .....</b>	<b>3</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>3</b>
<b>6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA .....</b>	<b>4</b>
6.1. Anatomía del aparato reproductor masculino.....	4
6.1.1. Testículos.....	4
6.1.2. Epidídimo y el conducto deferente .....	4
6.1.3. Glándulas anexas .....	4
6.1.4. Pene .....	4
6.2. Fisiología reproductiva .....	4
6.2.1. Funciones del macho en el proceso reproductivo.....	4
6.2.2. Regulación hormonal .....	5
6.3. Características del semen.....	7
6.3.1. Plasma seminal.....	7
6.3.2. Espermatozoides.....	7
6.3.3. Espermatogénesis .....	7
6.3.4. Morfología y estructura espermática .....	8
6.3.4.1. Morfología normal.....	9
6.3.4.2. Morfología anormal.....	9
6.3.5. Evaluación del semen .....	11
6.3.5.1. Características Macroscópicas.....	11
6.3.5.2. Características microscópicas.....	11
6.4. Pubertad .....	12
6.4.1. Signos observables de la pubertad.....	12
6.4.2. Factores que influyen en la aparición de la pubertad.....	13
6.4.3. Características de la conducta sexual del macho .....	14
6.4.3.1. Competencia y agresividad.....	14
6.5. Descripción de la monta o cópula .....	15
6.5.1. Factores de influencia durante la cúpula.....	17

6.5.2. <i>La eyaculación</i> .....	17
6.6. Métodos de colección del semen .....	17
6.6.1. <i>Fundas vaginales</i> .....	18
6.6.2. <i>Esponjas vaginales</i> .....	18
6.6.3. <i>Electroeyaculación</i> .....	18
6.6.4. <i>Fístula uretral</i> .....	18
6.6.5. <i>Aspiración vaginal postcoital</i> .....	19
6.6.6. <i>Vagina artificial</i> .....	19
6.6.7. <i>Desviación de los Conductos Deferentes</i> .....	19
6.6.8. <i>Bulbourectomía</i> .....	19
6.7. Factores relacionados con la colección y calidad de semen .....	19
6.7.1. <i>Frecuencia de colección</i> .....	19
6.7.2. <i>Duración de la copula</i> .....	20
6.7.3. <i>Época y edad</i> .....	20
6.7.4. <i>Luz</i> .....	20
6.7.5. <i>Presión osmótica</i> .....	20
6.7.6. <i>Temperatura</i> .....	21
6.8. Métodos de conservación del semen .....	21
6.8.1. <i>Crioconservación</i> .....	21
6.8.1.1. <i>Diluyentes de semen</i> .....	21
6.8.1.2. <i>Crioprotectores</i> .....	22
6.8.1.3. <i>Licuefacción del semen</i> .....	22
6.8.2. <i>Semen fresco</i> .....	23
6.8.3. <i>Semen refrigerado</i> .....	23
6.8.4. <i>Semen congelado</i> .....	24
6.9. Factores críticos en el proceso de criopreservación .....	24
<b>7. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS: .....</b>	<b>25</b>

<b>8. METODOLOGÍA.....</b>	<b>25</b>
8.1. Área de investigación .....	25
8.2. Unidad Experimental.....	25
8.2.1. <i>Registro de animales</i> .....	25
8.3. Materiales .....	26
8.4. Manejo del Ensayo .....	27
8.4.1. <i>Evaluación del estado de la salud animal y la valoración del sistema reproductor de los machos.</i> .....	27
8.4.2. <i>Entrenamiento de la alpaca macho para la monta</i> .....	27
8.4.3. <i>Identificación del método de extracción del semen</i> .....	29
8.4.3.1. Protocolo con maniquí completo.....	29
8.4.3.2. Protocolo con maniquí de grupa.....	30
8.4.3.3. Protocolo con hembra receptiva con desviación de pene .....	30
8.4.4. <i>Extracción de semen</i> .....	30
8.4.5. <i>Elección del diluyente</i> .....	31
8.4.6. <i>Preparación del diluyente</i> .....	31
8.4.7. <i>Dilución de semen</i> .....	31
8.4.8. <i>Congelación de semen con diluyente</i> .....	31
8.4.9. <i>Post descongelación del semen con diluyente</i> .....	31
8.4.10. <i>VARIABLES ANALIZADAS REFERENTE A LA CALIDAD MACROSCÓPICA DEL SEMEN FRESCO.</i> 32	
8.4.11. <i>VARIABLES ANALIZADAS REFERENTE A LA CALIDAD MICROSCÓPICA DEL SEMEN FRESCO.</i> 32	
8.4.12. <i>Medición y valoración de las variables microscópica de semen con el diluyente Triladyl</i> .....	33
8.4.13. <i>Análisis de Morfo-anomalías en el semen de camélidos</i> .....	33
<b>9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
9.1. Comparación de los tres métodos de colección de semen.....	34

9.2. Análisis de las variables de la calidad del semen .....	36
<b>10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>11. IMPACTO .....</b>	<b>39</b>
<b>12. CONCLUSIONES .....</b>	<b>40</b>
<b>13. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>40</b>
<b>14. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>41</b>
<b>15. ANEXOS .....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico N<sup>o</sup>1:</b> Diagrama resumido de la regulación hormonal en el macho. ....	<b>5</b>
<b>Gráfico N<sup>o</sup>2:</b> Esquema de las etapas de la espermatogénesis. ....	<b>8</b>
<b>Gráfico N<sup>o</sup>3:</b> Esquema de la morfología normal de un espermatozoide. ....	<b>9</b>
<b>Gráfico N<sup>o</sup>4:</b> Anormalidades morfológicas del espermatozoide que se pueden presentar en cabeza.....	<b>10</b>
<b>Gráfico N<sup>o</sup>5:</b> Anormalidades morfológicas en el espermatozoide que se puede presentar en flagelo .....	<b>10</b>
<b>Gráfico N<sup>o</sup>6:</b> Anormalidades morfológicas en el espermatozoide que se pueden presentar en pieza media .....	<b>10</b>
<b>Gráfico N<sup>o</sup>7:</b> Diagrama de la adhesión prepucial en los camélidos sudamericanos, a) adhesión prepucial, b) prepucio y c) pene. ....	<b>13</b>
<b>Gráfico N<sup>o</sup>8:</b> Posición esternal normal al momento del servicio.....	<b>16</b>
<b>Gráfico N<sup>o</sup>9:</b> Posición esternal sobre uno de sus lados en la etapa final del servicio..	<b>16</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla Nº 1:</b> Regulación hormonal en el macho.....	<b>6</b>
<b>Tabla Nº 2:</b> Determinación de las edades de los machos mediante técnica de boqueo.	<b>25</b>
<b>Tabla Nº 3:</b> Planificación del entrenamiento de alpacas machos. ....	<b>28</b>
<b>Tabla Nº 4:</b> Escala de evaluación del libido y aceptación de los métodos de colecta...	<b>34</b>
<b>Tabla No 5:</b> Método con maniquí completo más vagina artificial y uso de feromonas (orina). ....	<b>35</b>
<b>Tabla Nº 8:</b> Aceptación de los diferentes métodos de colecta en escala de 0-3. ....	<b>36</b>
<b>Tabla Nº 9:</b> Medición y valoración de las variables macroscópica de semen fresco. ...	<b>37</b>
<b>Tabla Nº 10:</b> Medición y valoración de las variables microscópica de semen fresco...	<b>37</b>
<b>Tabla Nº 11:</b> Medición y valoración de las variables microscópica de semen con diluyente post descongelación. ....	<b>37</b>
<b>Tabla Nº 12:</b> Morfo anomalías del semen en camélidos .....	<b>38</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXOS 1. Aval de traducción .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO 2. Hoja de vida docente tutor .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO 3. Hoja de vida del estudiante I.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO 4. Hoja de vida del estudiante II .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS 5. Evaluación de aparato reproductor del Macho .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 6. Separación de las alpacas machos .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 7. Entrenamiento de los Alpacos.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO 8. Ensamblaje de vagina artificial .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 9. Método de maniquí .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 10. Presentación de maniquí a la alpaca macho .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO 11. Método de maniquí de grupa más hembra receptiva .....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO 12. Muestra extraída con grupa. (Se tuvo el inconveniente que terminaba a los alrededores).....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO 13. Método de desviación del pene.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO 14. Obtención de muestra con método de desviamiento de pene.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO 15. Evaluación espermática con semen fresco .....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO 16. Observación macroscópica con lente 40X.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO 17. Observación de espermatozoides con eosina .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO 18. Mezcla 1:1 de diluyente y semen fresco .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO 19. Crioconservación y elaboración de pajuelas .....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO 20. Evaluación post descongelamiento se semen con diluyente.....</b>	<b>60</b>

## **1. INFORMACIÓN GENERAL**

**Título del Proyecto:** Extracción y crioconservación de semen de alpacas en el centro experimental académico Salache del cantón Latacunga.

**Fecha de inicio:** abril 2023

**Fecha de finalización:** agosto 2023

**Lugar de ejecución:** CEASA

**Facultad que auspicia:** Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

**Carrera que auspicia:** Medicina Veterinaria

**Proyecto de investigación vinculado:**

Proyecto de Mejoramiento Genético en Alpacas

**Equipo de Trabajo:**

Estudiante: Molina Panchi Alcides Jorge (Anexo 1)

Estudiante: Segovia Villacis Joel Alejandro (Anexo 2)

Tutor: Dr. Mg. Garzón Jarrin Rafael Alfonso/ grado de cuarto nivel (Anexo 3)

**Área de Conocimiento:**

Ciencias: 42 Ciencias agrarias ciencias veterinarias y genéticas.

**Línea de investigación:**

Análisis conservación y aprovechamiento de la biodiversidad local.

**Sub líneas de investigación de la Carrera:**

Mejora y conservación de recursos zoogenéticos.

## **2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

La alpaca (*Vicugna pacos*) es una especie ganadera que constituye un recurso biológico y genético estratégico de gran efecto social, económica, cultural y ecológica en la vida del poblador altoandino; principalmente en las comunidades donde la producción se realiza en sistemas tradicionales, donde existen muchas carencias que repercuten en una baja productividad y altos niveles de morbilidad y mortalidad.

En los últimos años a nivel nacional en Ecuador se han realizado pocas investigaciones en alpacas enfocados en la evaluación de la Calidad Seminal y crioconservación, desde esta perspectiva se propone realizar el presente proyecto con el fin de obtener mejores resultados en la reproducción asistida de alpacas, ya que en camélidos se limita la utilización de semen fresco con una tasa máxima de preñez del 77% (1).

Es conocido que el proceso de criopreservación involucra daños funcionales en los espermatozoides, dado los diversos tipos de estrés a los que son sometidos desde la refrigeración hasta el descongelado. Esta investigación está enfocada en evaluar la calidad seminal de alpacas que se obtendrá mediante tres métodos de extracción para posteriormente aplicar las técnicas de criopreservación con el uso del diluyente Triladyl.; por aquello este estudio busca reducir todos los daños en los espermatozoides con el fin de optimizar el proceso de criopreservación de semen en esta especie y de esta manera se pretende desarrollar técnicas reproductivas que permitan mejorar, mantener y difundir la genética del hato mediante el uso de la inseminación artificial (IA).

## **3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO**

### **Beneficiarios Directos:**

Docentes y estudiantes del Campus Salache. El investigador principal del proyecto, requisito previo a la obtención del Título en Medicina Veterinaria.

### **Beneficiarios Indirectos:**

Productores de alpacas de la provincia de Cotopaxi. Estudiantes de la Carrera de Medicina Veterinaria.

#### **4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

La crianza de camélidos aún tiene dificultades en su reproducción asistida (IA), para ello es necesario utilizar biotecnologías reproductivas, que incluyan colección, evaluación y conservación del semen; dadas las características reproductivas, anatómicas y fisiológicas de estas especies, la criopreservación de semen en alpaca es una biotecnología reproductiva en desarrollo, debido a la baja supervivencia de los espermatozoides tras el congelamiento. La fisiología reproductiva presenta una serie de desafíos en la recolección de semen de camélidos sudamericanos, incluidos el apareamiento, postura, duración y eyaculación durante la cópula.

Existen diferentes métodos para la extracción del semen siendo el electro eyaculador el método más fácil y adecuado para recolectar eyaculados en machos no entrenados; tomando en cuenta que por este método variaría la calidad espermática, composición seminal y la concentración de espermatozoides en comparación con otros métodos.

Es escasa la información sobre el uso de la vagina artificial con respecto a la calidad seminal de alpacas, esta técnica tiene el inconveniente de que los machos requieren ser entrenados debido a su temperamento y en algunas ocasiones no aceptan fácilmente el maniquí. En ocasiones se requiere coleccionar semen de machos que viven en lugares distantes a los centros de investigación tomando en cuenta que para ello también es importante desarrollar diferentes técnicas para conservar, diluir, y congelar estas células espermáticas.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **Objetivo General**

Extraer y crioconservar el semen de alpacas en el Centro experimental académico Salache.

##### **Objetivos Específicos**

- Obtener muestras de semen de alpacas mediante tres métodos de extracción.
- Analizar la calidad de semen fresco y de semen post descongelación mediante el uso del crioprotector Triladyl.

## **6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA**

### **6.1. Anatomía del aparato reproductor masculino**

#### **6.1.1. Testículos**

La mayor parte de veces, los dos testículos están presentes desde el nacimiento; a los 6 meses de edad descienden a un escroto no pendular, situado bajo el año; son pequeños y elípticos, ubicados de manera que el diámetro principal es oblicuo con una orientación dorsal y caudal; en condiciones normales, ambos testículos son del mismo tamaño, firmes y con un movimiento libre (2).

#### **6.1.2. Epidídimo y el conducto deferente**

El epidídimo resulta difícil de palpar en el animal sano ya que se encuentra entre el testículo y el cuerpo y es aplanado en sentido caudo-cranial(3). Las funciones del epidídimo son fundamentalmente de almacenamiento de espermatozoides y el aporte de una sustancia llamada "factor de descapacitación" que contribuye a facilitar la viabilidad del espermatozoide almacenado, también se destaca la ausencia de la vesícula seminal en esta especie animal (4), en la eyaculación el esperma pasa del epidídimo al conducto deferente, de ahí pasa a la uretra y final al exterior (5).

#### **6.1.3. Glándulas anexas**

Las glándulas accesorias (próstata y bulbo-uretrales) están localizadas en la pelvis y por encima del resto del tracto genital masculino. Estas glándulas segregan fluidos que dan volumen, nutrientes y estabilidad al semen (6).

#### **6.1.4. Pene**

El pene es de tipo fibroelástico y presenta una inflexión sigmoidea en posición preescrotal. (2). Tiene en su punto una estructura cartilaginosa dirigida hacia atrás (7). Cuando no se encuentra erecto posee una longitud de 35 a 45 cm en llamas y alpacas, durante la erección, el pene no aumenta significativamente su tamaño, pero se vuelve firme y elongado (8).

### **6.2. Fisiología reproductiva**

#### **6.2.1. Funciones del macho en el proceso reproductivo**

El camello macho es descrito con actividad reproductiva estacional con un incremento en la actividad sexual durante la temporada de apareamiento (9). En general es aceptado que el macho es inactivo durante el resto del año, pero es capaz de aparearse y fertilizar a una hembra en estro en cualquier momento. De manera similar, la hembra, aun cuando tiene

una tendencia estacional marcada, puede estar en cualquier momento del año al ser poliestricas (10).

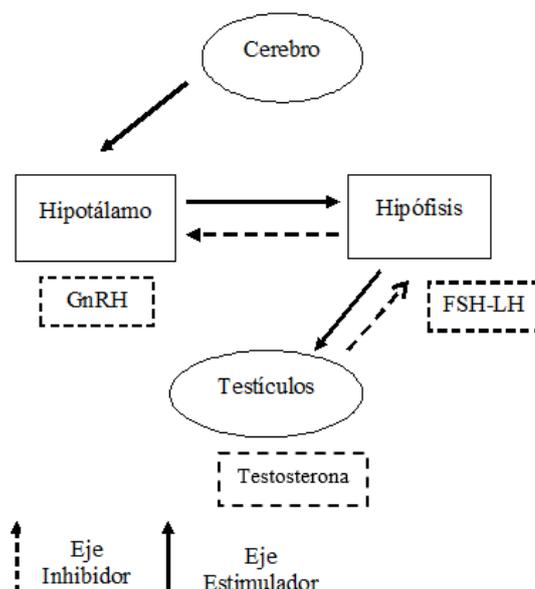
El macho influye en la fertilidad general del rebaño. Un macho reproductor es usado para muchas hembras (entre 20 a 30) y, por tanto, su influencia en la calidad general del rebaño es más pronunciada que la hembra (11).

### 6.2.2. Regulación hormonal

El sistema endocrino rige todas las funciones del organismo y en consecuencia el mecanismo sexual actuando directa e indirectamente sobre el aparato genital (12). Por el tipo de acción que ejercen las hormonas de la reproducción, se dividen en hormonas primarias y secundarias.

Las primarias forman parte directa de la reproducción como la espermatogénesis, ovulación, comportamiento sexual, fecundación, implantación, mantenimiento de la gestación, parto, lactación y el comportamiento materno; mientras que, las segundas son necesarias para el bienestar general, influye en el crecimiento, desarrollo, metabolismo y permiten la acción de la reproducción (13). “En la regulación hormonal del proceso reproductivo masculino, intervienen tres órganos fundamentales: el hipotálamo que está localizado en el cerebro, la hipófisis o pituitaria y las gónadas que en este caso son los testículos” (4).

**Gráfico N<sup>o</sup>1:** Diagrama resumido de la regulación hormonal en el macho.



**Fuente:** Curso de Manejo Reproductivo de Camélidos Sudamericanos Domésticos (4).

La LH, FSH y la testosterona son las hormonas clave para la regulación de la espermatogénesis en los mamíferos y funcionan sinérgicamente para producir el desarrollo de las células germinales (14).

La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es sintetizada en el hipotálamo y actúa estimulando la elevación de la producción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) a nivel de la hipófisis, las cuales también tienen un efecto directo sobre la secreción de testosterona y sobre la espermatogénesis (4). La LH es la hormona que estimula la producción de testosterona por las células de Leydig en el estroma testicular” (15)

La producción de testosterona viene relacionada con el inicio de la pubertad en machos, la secreción de testosterona se realiza de forma pulsátil al estar controlada por la secreción de gonadotropinas hipofisarias LH. Sin embargo, estos valores hormonales varían de acuerdo a las estaciones del año y dentro de los hemisferios norte y sur (16).

**Tabla Nº 1:** Regulación hormonal en el macho.

<b>Edad (meses)</b>	<b>Testosterona pg/ml</b>
6	67
12	213
18	1156
24	2163
30	2835
36	5385
36 <	5247

**Fuente:** Manual de inseminación artificial en alpacas (16).

Por otra parte, la LH también estimula en el macho la producción de una proteína de enlace en las células de Sertoli en los túbulos seminíferos. Las células de Sertoli también producen la inhibina cuya función sería la de regular la secreción de FSH, en igual forma a la de la testosterona sobre la LH. La testosterona y la inhibina en conjunto probablemente regulen la secreción de gonadotrofinas actuando sobre el sistema nervioso central y sobre el hipotálamo a través de un circuito de retroalimentación negativo (4).

### **6.3. Características del semen**

Es un líquido viscoso y blanquecino constituido por las secreciones de las glándulas bulbouretrales, uretrales, de las vesículas seminales y la próstata combinado como los espermatozoides de todos los animales (17). El semen de alpaca por la ausencia de la vesícula seminal tiende a ser muy viscoso y se compone de espermatozoides 11,5% y 88,5% en volumen líquido seminal (18).

#### **6.3.1. 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 (19). Este cumple un rol de protección de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra, dando protección a los a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los polimorfonucleares neutrófilos presentes en el útero y asimismo, transportan y eliminan espermatozoides muertos (20).

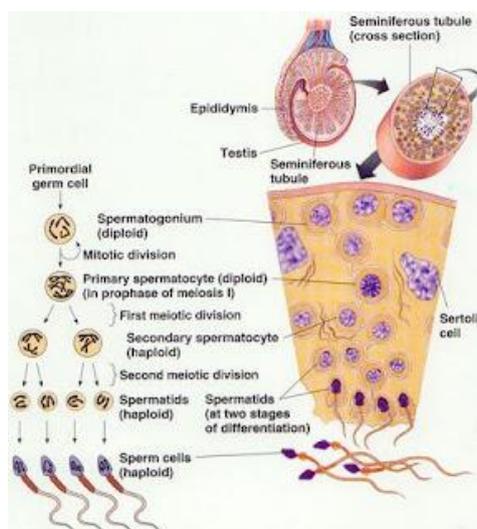
#### **6.3.2. Espermatozoides**

Es considerada la célula más especializada, la particularidad de tener una cabeza la cual contiene la información genómica, una pieza media con mitocondrias que da movilidad al flagelo, son características que dan una diversidad morfológica entre las especies, no todos los espermatozoides son iguales y no todos llevan procesos de capacitación y reacción acrosomal dentro del aparato reproductor de la hembra (21).

#### **6.3.3. Espermatogénesis**

Es el proceso por el cual se generan los espermatozoides en los tubos seminíferos que se encuentran en el parénquima o tejido noble del testículo, este proceso se inicia a partir de las células germinales o células primitivas, las espermatogonias, que en sucesivas divisiones se transforman en espermatoцитos primarios (22). Estos, al llegar a la edad de la pubertad empiezan a sufrir divisiones meióticas o sea a reducir su número cromosómico y terminan en las espermátidas. Las espermátidas luego sufren la transformación que las lleva a la forma y a la función característica del espermatozoide (4).

**Gráfico N<sup>o</sup>2:** Esquema de las etapas de la espermatogénesis.



**Fuente:** Testículos y espermatozoides (23).

Es bien sabido que la alpaca tiene reproducción estacional, donde no se ha estudiado si existen cambios histológicos estacionales en el testículo de la alpaca (24). Sin embargo, se ha determinado que la época de verano induciría un incremento en el porcentaje de anomalías a nivel de la cola del espermatozoide y una disminución de la concentración espermática comparado a los resultados obtenidos en invierno (25).

En general existe variación de la calidad espermática dependiendo la edad o por distintos niveles de variación en la espermatogénesis en esta especie; Cavalcanti, 2013 también menciona que pueden existir varios factores que alteren la espermatogénesis “La espermatogénesis ocurre todo el año en todos los camélidos, sin embargo las variaciones estacionales en la producción de espermatozoides se basan en el origen geográfico por lo tanto en la nutrición, el clima y otros factores medio ambientales” (14).

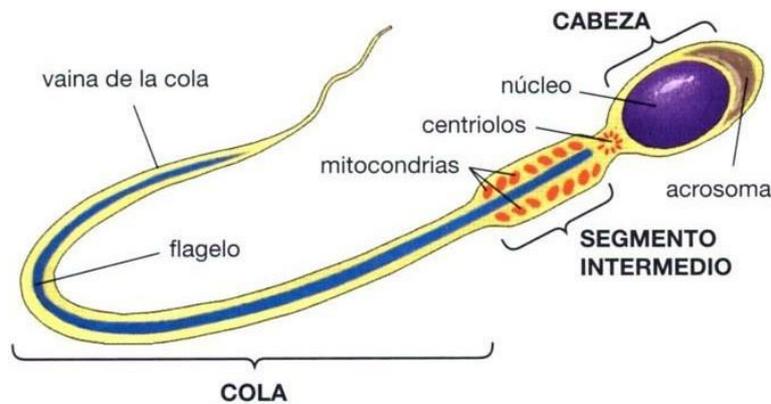
#### **6.3.4. Morfología y estructura espermática**

La morfología espermática es esencial en la evaluación de la calidad seminal e importante para la predicción de la fertilidad de machos reproductores; como menciona Evangelista (2015) “La morfología espermática es una característica útil para predecir la capacidad fecundante, basándose en las formas y medidas de las estructuras corporales espermáticas para poder clasificarlas, permitiendo detectar anomalías en la cabeza, pieza intermedia y cola, defectos acrosomales específicos o variaciones del tamaño de la cabeza” (26).

### 6.3.4.1. Morfología normal

Los espermatozoides de la alpaca y llama es muy similar a la mayoría de los animales de granja. El espermatozoide normal está compuesto por cabeza, cuello y una cola, dividida en tres piezas, una principal, intermedia y una terminal [...] La cabeza y la cola se separan en este punto durante la fertilización, una de las características de la cola es el filamento axial, que es un pequeño haz de delgadas fibrillas cuyas contracciones provocan el latigqueo de la cola, lo cual impulsa hacia delante al espermatozoide (18).

**Gráfico N<sup>o</sup>3:** Esquema de la morfología normal de un espermatozoide.



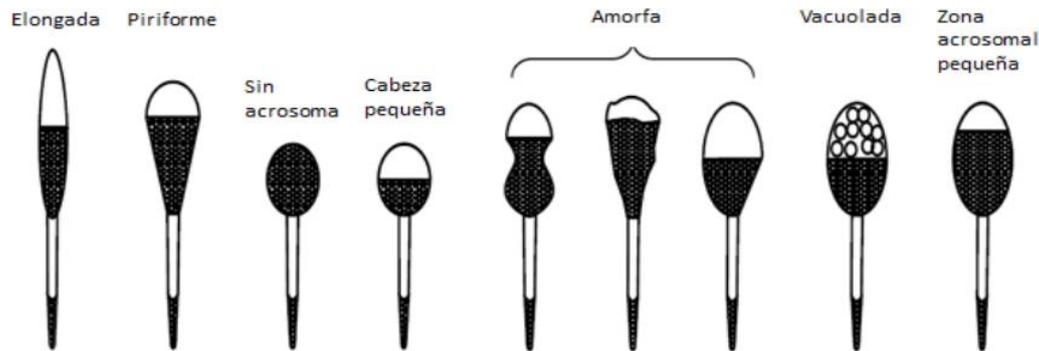
**Fuente:** El espermatozoide: una célula muy particular (27).

### 6.3.4.2. Morfología anormal

El semen de alpacas presenta un 41,23 % de formas anormales de espermatozoides, siendo las más frecuentes: cabezas solas, colas torcidas, micro cabezas, pieza intermedia engrosada, colas rotas, cabezas alargadas y macro cabezas [...] alto porcentaje de anomalías por alteraciones secundarias, podrían deberse a la forma de colección del semen (18). Los espermatozoides anormales se pueden clasificar como cabeza anormal, gota citoplasmática y cola anormal. En las colas anormales se incluye las alargadas, rotas dobladas, filiformes, truncadas y piezas intermedias dobles además de enroscadas y dobles colas (28). Vella clasifica las anomalías de los espermatozoides en dos grupos:

- **Anormalidades primarias:** que provienen de disturbios testiculares.
- **Anormalidades secundarias:** que provienen de problemas de los conductos, especialmente del epidídimo o a la mala manipulación del semen en frotis o exposición al frío. Membrana plasmática del espermatozoide.

**Gráfico N<sup>o</sup>4:** Anormalidades morfológicas del espermatozoide que se pueden presentar en cabeza



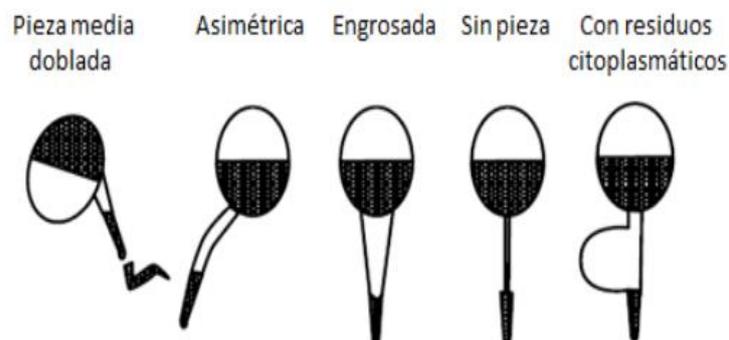
**Fuente:** Evaluación de la teratozoospermia en hombres jóvenes en relación con el proceso de fertilidad y las aberraciones cromosómicas (29).

**Gráfico N<sup>o</sup>5:** Anormalidades morfológicas en el espermatozoide que se puede presentar en flagelo



**Fuente:** Evaluación de la teratozoospermia en hombres jóvenes en relación con el proceso de fertilidad y las aberraciones cromosómicas (29).

**Gráfico N<sup>o</sup>6:** Anormalidades morfológicas en el espermatozoide que se pueden presentar en pieza media



**Fuente:** Evaluación de la teratozoospermia en hombres jóvenes en relación con el proceso de fertilidad y las aberraciones cromosómicas (29).

### **6.3.5. Evaluación del semen**

#### **6.3.5.1. Características Macroscópicas**

Los eyaculados de los camélidos están caracterizados por un reducido volumen y baja concentración de espermatozoides comparando con otros animales de producción, los parámetros son altamente variables entre machos y entre eyaculados colectados del mismo macho. Las variables macroscópicas se indican a continuación (30).

**Color:** El color del semen de las alpacas ha sido descrito como blanco lechoso a blanco cristalino. Aunque el color del semen de alpacas y llamas podría depender de la concentración espermática y la proporción de la secreción de las glándulas sexuales accesorias (28).

**Viscosidad:** El semen en alpacas es de gran viscosidad, la que dificulta su manejo durante los procedimientos en el laboratorio, dificulta determinar parámetros como concentración espermática y motilidad y su mezcla con dilutores. El grado de viscosidad varía entre machos y disminuye con el incremento de número de eyaculados en cualquier día (31).

**Volumen:** El promedio de cada eyaculado en alpacas varía entre 1 a 2 ml y el rango varía desde menos de 1 ml hasta 7 ml, aproximadamente. Por lo general, el volumen es menor cuando se colecta por electroeyaculación que usando la vagina artificial (28).

**pH:** Los valores de pH según varios autores se acercan mucho a la neutralidad, con cierta tendencia a alcalinidad ligera. Los valores de pH promedio varían de 7,2 a 7,5 (32).

#### **6.3.5.2. Características microscópicas**

Método más preciso para evaluar el semen, permite analizar con gran precisión la calidad del eyaculado o la fertilidad del semental; consta de las siguientes pruebas (33):

**Concentración espermática:** La concentración espermática varía de 30 000 hasta 150 millones de espermatozoides por ml, aproximadamente en alpacas. Las grandes variaciones son atribuidas a los diferentes animales, tipos de colección de semen y números de eyaculados (34).

**Motilidad espermática:** Es una de las pruebas más utilizadas en la valoración de la calidad del semen, se realiza mediante la estimación visual microscópica para valorar el movimiento masivo de los espermatozoides o el carácter y tipo de movimiento individual, con la finalidad de establecer el porcentaje de espermatozoides vivos (31).

**Examen morfológico de los espermatozoides:** Se realiza para determinar el porcentaje de anomalías espermáticas y si éstas no pasan del 5 al 10%, pueden considerarse como desperdicio fisiológico, pero cuando pasan del 15 al 30% aumenta la subfertilidad en correlación con el porcentaje de las anomalías primarias(35) .

En el semen de las alpacas, las proporciones de espermatozoides vivos y morfológicamente normales varían desde 58 – 83% y 71 – 84%, es así que, en los espermatozoides de alpacas se pueden encontrar anomalías como colas con curvaturas y colas dobles (9 – 15%), cabezas libres y cabezas dobles (3 -13%) y la presencia de gota citoplasmática (1 – 7%) (32). Algunos autores mencionan que en un 11.65% de espermatozoides tienen formas anormales, siendo las más frecuentes en orden decreciente, las siguientes: cabezas solas, colas torcidas, colas enrolladas, colas quebradas, cabezas alargadas y microcabezas pero recalando que esto también dependerá del método por el cual hayan sido obtenidas (35).

#### **6.4. Pubertad**

La pubertad en los camélidos sudamericanos ha sido definida como el momento cuando, por primera vez, el macho es capaz de servir a una hembra y producir una preñez. Sin embargo, la edad de la pubertad no ha sido claramente definida (8). Cabe recalcar que “en alpacas y llamas este criterio puede resultar difícil de aplicar puesto que no exhiben periodos de celo como en otras especies pecuarias y su comportamiento también es diferente. Una hembra pequeña y sumisa puede permitir que un macho agresivo la monte, aún sin haber alcanzado la pubertad” (6).

##### **6.4.1. Signos observables de la pubertad**

La pubertad se alcanza a una edad o peso corporal determinado; otra forma de medir la pubertad es observando la liberación pene-prepucial que a su vez nos indica la producción de la hormona testosterona por el testículo (36).

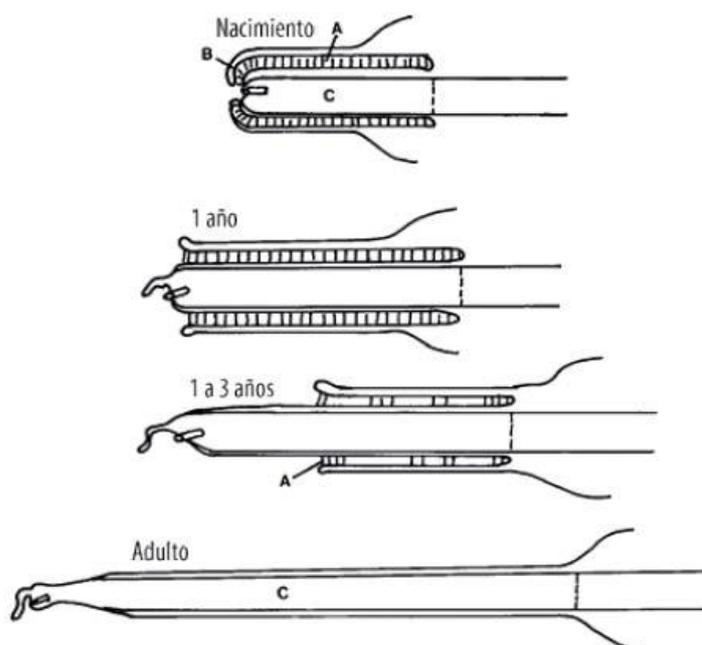
Resulta de importancia conocer el momento de iniciación de la pubertad. Esto se puede dividir en dos fases: la primera cuando se inicia el cortejo y puede ser seguido de intentos de cópula con hembras en celo, pero sin intromisión y la segunda es ya cuando el macho está en condiciones de realizar una cópula completa (4).

En la alpaca la pubertad comienza alrededor de los 10 a 12 meses, siendo habitual a los dos años en adelante, el crecimiento testicular se desacelera alcanzando un máximo a los tres años de edad, sin embargo, se pueden encontrar machos fértiles desde seis meses de

edad cuando estos presentan tamaño testicular de 4 a 5 cm de largo y de 2.5 a 3 cm de ancho (37). Así mismo, Vilca, 2019 menciona que “el tamaño testicular podría ser usado como un indicador de producción espermática y, por lo tanto, de la fertilidad” (38).

Sin embargo, en la totalidad de los machos camélidos existe la presencia de adherencias pene-prepuciales (fenómeno normal en el macho inmaduro) que impiden una cópula eficiente. Bonacic, 1991 recalca que “apenas el 8% de los machos alpaca de un año de edad se han liberado de estas adherencias, a los dos años el porcentaje alcanza al 70%, llegando al 100% a los 3 años. Al alcanzar el macho un 70% del peso adulto se produciría un incremento en los niveles de testosterona y se liberarían las adherencias pene prepuciales” (39).

**Gráfico N<sup>o</sup>7:** Diagrama de la adhesión prepucial en los camélidos sudamericanos, a) adhesión prepucial, b) prepucio y c) pene.



**Fuente:** Principios de reproducción de los pequeños camélidos sudamericanos (2).

#### 6.4.2. Factores que influyen en la aparición de la pubertad

Los camélidos sudamericanos en zonas donde tradicionalmente se crían son considerados estacionales en su actividad reproductiva. En su habitat natural, los nacimientos se producen en la época de mayor lluvia, en forma agrupada, cuando el forraje es más abundante. Sin embargo si el estado corporal de las hembras es el adecuado y los machos son separados de las tropas, la actividad ovárica se presenta durante todo el año (13). Cuando se mantienen separados y se juntan ocasionalmente, el apetito sexual despierta

con mayor fuerza, apareando y reproduciéndose eficientemente. Este manejo es habitual en Estados Unidos dando como consecuencia una mayor tasa de natalidad (40).

En animales ubicados en regiones templadas, se ha observado que existe una influencia de las condiciones climáticas sobre la calidad espermática. Así, la concentración espermática es menor en verano que en invierno, lo cual podría estar relacionado con una alteración en la espermatogénesis producto de las altas temperaturas ambientales (8).

### **6.4.3. Características de la conducta sexual del macho**

Durante la copula se debe observar la conducta sexual de macho y hembra; los cambios en el comportamiento sexual son más evidentes en el macho que en la hembra, el macho que copula generalmente no abandona la posición de copula por más que alguien se acerque a verificar la acción, lo cual indica que el reflejo copulatorio no se interrumpe fácilmente una vez iniciado (4). Una vez que el macho termina la copula, las hembras serán marcadas con pintura a nivel de la cruz y el macho a nivel de la nariz para evitar una nueva monta el mismo día (4,41).

Según Sumar, 1986 “Los estudios y observaciones de campo revelan un comportamiento sexual muy típico y especial. Cuando se unen machos y hembras, los machos comienzan el cortejo corriendo detrás de la primera hembra que encuentran, si la hembra está en celo, permitirá que el macho la monte y luego tomará la posición de sentada. La cópula puede durar de 5 a 50 min (42)”

Algunas veces, hembras receptivas se acercan a una pareja que está copulando y se sientan junto a ellas. Así, también, es común ver a algunas hembras receptivas montar a hembras del rebaño; si la hembra del rebaño no está receptiva, escapará del macho, escupiéndole. Durante la fase corta de persecución y durante la monta, los machos emiten sonidos fuertes de tipo nasal (ronquidos), hinchando los carrillos (43).

#### **6.4.3.1. Competencia y agresividad**

Cuando forman tropas de machos no muestran demasiada agresividad ni signos de organización social, cuando a estos se le incluyen en grupos de hembras se establece una competencia que suele llevar generalmente, dependiendo de la agresividad de cada uno, a una territorialidad. Según Frank 2017 “La territorialidad es un carácter heredado de sus antepasados silvestres (Guanaco), la edad, siendo los machos más viejos más agresivos hacia los jóvenes. Esta agresividad puede llegar a una violencia franca manifestada con lesiones considerables en orejas, garrones, testículos, etc.”(4).

### 6.5. Descripción de la monta o cópula

Según Rodríguez, 2019 “La cópula en los camélidos tiene dos fases, la fase de cortejo y la cópula propia” (44). La fase de cortejo es relativamente corta, el macho persigue a la hembra y trata de montarla. Con una hembra receptiva esta fase dura solo unos pocos minutos o menos; mientras que en la cópula propia la hembra permite que el macho el monte parado, y luego adopta la posición echada sobre su vientre. En esta posición se efectúa la cópula, que dura entre 10 y 50 minutos dependiendo de la presencia o la ausencia de otros animales; Algunas hembras después de un cierto tiempo en posición esternal se recuestan sobre uno de sus lados durante la etapa final del servicio (6).

Mientras que, para Frank, 2017 “La monta o cópula en los Camélidos presenta características particulares y consiste en varias fases” (4):

- **Fase 1: Galanteo:** consiste en la detección del celo por parte del Alpaco y el proceso puede ir desde la persecución de la hembra, hasta que ésta se eche o simplemente la hembra se echa ante el acercamiento del macho y éste la monta directamente.
- **Fase 2: Acercamiento o "punteo":** el macho se acuesta sobre la hembra y vagina reiteradamente el pene y con la cresta cartilaginosa del glande busca la entrada a la vagina, se acerca y acomoda de acuerdo a las distancias y al tamaño de la hembra. Esta fase finaliza cuando la hembra levanta la cola y el macho inicia la intromisión del pene.
- **Fase 3: Intromisión o monta propiamente dicha:** inmediatamente de realizada ésta se inicia la eyaculación que es lenta y con bajo volumen de semen eyaculado. El momento de la intromisión y eyaculación se verifica externamente por la curvatura del dorso y de la grupa del macho y por el inicio de movimientos pélvicos, rítmicos y acompasados.

**Gráfico N<sup>o</sup>8:** Posición esternal normal al momento del servicio



**Fuente:** Evaluación clínica de la función reproductiva de los camélidos del nuevo mundo (44)

**Gráfico N<sup>o</sup>9:** Posición esternal sobre uno de sus lados en la etapa final del servicio.



**Fuente:** Evaluación clínica de la función reproductiva de los camélidos del nuevo mundo (44)

### **6.5.1. Factores de influencia durante la cópula**

Al iniciarse la estación de monta, y cuando se unen machos y hembras por primera vez, se observa una gran actividad sexual en el rebaño, llegando los machos a copular hasta 18 veces al día; posteriormente su actividad sexual disminuye. Esto parece deberse a los siguientes factores (42):

1. Establecimiento de un status social con la formación de una jerarquía donde existen machos dominantes y machos dominados.
2. Cansancio físico o agotamiento sexual. Sucede entonces que, ya sea por el establecimiento de una jerarquía o el cansancio físico, o una combinación de ambos.
3. Cópulas infrecuentes en el rebaño después de unos días de iniciado el empadre, a pesar de haber hembras en celo, y como consecuencia la fertilidad es baja.
4. No hay cambios de los machos, por lo tanto, no se renovará la actividad sexual en el rebaño, sin cubrir aquellas que muestran celo bajando notablemente la fertilidad del rebaño.

### **6.5.2. La eyaculación**

La eyaculación del semen es un proceso continuo, sin fracciones y con una calidad de semen uniforme desde el inicio al final de la cópula; además, es importante anotar que, debido a la alta viscosidad del plasma seminal, el movimiento de los espermatozoides es muy lento, si lo comparamos con el de otras especies domésticas. Por último, se ha encontrado experimentalmente, que la deposición del semen es intrauterina y que el plasma seminal tiene un efecto inductor de la ovulación en la hembra (36,42).

No hay aspectos identificados de comportamiento que indiquen el momento en que se efectúa la eyaculación. Una vez finalizada la cópula el macho se pone de pie. Puede emprender actividad sexual inmediatamente con otra hembra cercana o con la misma que recién copuló, durante la eyaculación el esperma pasa del epidídimo al conducto deferente. De allí pasará a la uretra y finalmente al exterior (6).

### **6.6. Métodos de colección del semen**

Se ha utilizado un gran número de métodos para la colecta de semen en camélidos, con resultados variables. El semen de la alpaca es altamente viscoso, siendo muy difícil separar los espermatozoides del plasma seminal por centrifugación, así como estimar la concentración espermática por medios convencionales, frotis y coloraciones [...] La colección de semen en alpacas es complicada por el tiempo que dura la copula y también

por la posición que adoptan para copular; además son de temperamento nervioso, lo que dificulta su manejo (42).

Durante varias décadas se ha investigado técnicas óptimas para la extracción de semen en alpacas, técnicas que permitan un adecuado manejo de los espermatozoides sin que estos pierdan su capacidad fecundante. A continuación, un resumen de varios métodos de colección de semen en alpacas (45).

#### **6.6.1. Fundas vaginales**

Se utiliza una funda de jebe colocada intravaginalmente antes de la copula; después de la monta se retira la funda que sirve de recipiente de semen; algunos inconvenientes, son la interferencia con la copula normal y alargaba el tiempo de monta, más allá de los valores normales; con frecuencia provocaban lesiones que inhabilitaban a la hembra para su uso posterior (35).

#### **6.6.2. Esponjas vaginales**

Se utiliza esponjas introducidas en la parte anterior de la vagina que absorbe el semen y otros fluidos vaginales, este método es la obtención de semen muy contaminado y mezclado con los fluidos del tracto genital femenino, diluyendo y contaminando el semen con bacterias, dificultando así su evaluación, por lo que no se recomienda su uso para fines de inseminación artificial (28).

#### **6.6.3. Electroeyaculación**

Es la manipulación un aparato con electrodos introducido por el recto hasta la próstata, que desata estimulaciones eléctricas progresivas por algunos minutos. Es necesario que el animal se encuentre anestesiado, usando generalmente xilaxina y ketamina como anestésicos (34).

#### **6.6.4. Fístula uretral**

Se realiza una fístula quirúrgica en la uretra peniana entre el ano y el escroto; el semen es colectado durante la copula natural, utilizando anestesia epidural y anestesia local para colocar un catéter plástico en la uretra desde el pene hasta la vejiga, el cual nos permite guiar la cirugía y ayuda a identificar la uretra; la incisión se realiza en la piel, el músculo bulbocavernoso aislado y se separa la uretra del cuerpo cavernoso; este método no interfiere en la copula y las secuelas post operatorias parecen no afectar al animal (45).

### **6.6.5. Aspiración vaginal postcoital**

Técnica en el que las muestras de semen son extraídas del fondo de la vagina por aspiración después del coito. Se puede utilizar este semen para realizar la evaluación de espermatozoides como motilidad, vitalidad, morfología; la técnica es introducir un espejuelo por la vulva previamente desinfectada y con la ayuda de una fuente de luz se ubica el cérvix, inmediatamente se aspira con una pipeta adosada a una jeringa (32).

### **6.6.6. Vagina artificial**

La utilización de VA en colaboración con una hembra receptiva es la técnica óptima para obtener semen de buena calidad, usado con fines de IA, teniendo en cuenta de usar una fuente de calor continuo (35).

### **6.6.7. Desviación de los Conductos Deferentes**

Los espermatozoides se colectan directamente de su reservorio (la cola del epidídimo), desviando quirúrgicamente a los conductos deferentes hacia la cara interna del muslo, formando un punto de colección permanente en la piel, desde donde se puedan colectar continuamente sin la necesidad de tener hembra receptiva (46)

### **6.6.8. Bulbourectomía**

Sirve para posibilitar la colección de semen de llamas con escaso nivel de viscosidad, se realiza una incisión en la piel perianal hasta visualizar la uretra pélvica y las glándulas bulbouretrales, las cuales son extirpadas, esta técnica dura en promedio 3 horas con una recuperación completa del animal en 17 días, las características del semen obtenido se asemejan e incluso son superiores a las características del semen entero obtenido por vagina artificial, pero se indica una gran dificultad en la técnica quirúrgica por la ubicación del órgano (45).

## **6.7. Factores relacionados con la colección y calidad de semen**

### **6.7.1. Frecuencia de colección**

En época reproductiva podría ser una causa de baja fertilidad por agotamiento de las reservas espermáticas en los machos. Pacheco, 2008 realizó un estudio para evaluar el efecto de la repetición de colección de semen usando el método de la vagina artificial, realizando hasta tres colecciones diarias por un periodo de 12 días seguidos, los resultados obtenidos indican que las características más afectadas por la frecuencia de colección fueron la concentración de espermatozoides, la cual desciende significativamente en la tercera colección, así mismo el porcentaje de anomalías en la cola se incrementa pero la motilidad, porcentaje de vitalidad y el porcentaje de espermatozoides normales no fue

afectada, se vio la diferencia significativa en todas las características al hacer las comparaciones entre individuos; pero a partir del día 10 de colección, casi todos los machos tuvieron un descenso en todas las características seminales e incluso algunos solo eyacularon plasma seminal, especialmente en la tercera colección diaria (45).

### **6.7.2. Duración de la copula**

Hilasaca et al.,2021 “la duración de la cópula es muy variable entre machos, resultando en un promedio de  $8 \pm 5,4$  min a diferencia del promedio de  $17,5 \pm 12,1$  min en un empadre controlado” (47) aunque la duración de la cópula no produce cambios considerables de volumen del eyaculado, pero si en la concentración y el porcentaje de espermatozoides. Las características del semen se relacionan con la duración de la cópula, esto ha sido descrito desde dos puntos de vista: Primero el cambio del tubo colector cada 5 minutos y segundo: La interrupción de la cópula a 5, 10, 15 y 20 minutos, en general no existen cambios considerables de volumen del eyaculado pero si existen cambios substanciales en la concentración y el porcentaje de espermatozoides vivos, por lo que no se recomienda interrumpir la cópula ya que la última fracción del eyaculado parece ser la que lleva la mayor concentración de espermatozoides vivos (30).

### **6.7.3. Época y edad**

Como la estación del año, edad de los animales, raza, nivel nutricional, pueden también alterar las características seminales, teniéndose buenas características seminales durante el verano y la anormalidad se incrementa durante el invierno; mientras que la edad tiene un efecto muy sutil en la producción espermática, ya que las características mejoran ligeramente de acuerdo aumenta la edad, pero dicha diferencia no es significativa factores ambientales y fisiológicos (48).

### **6.7.4. Luz**

Las intensidades lumínicas encontradas normalmente en el laboratorio pueden deprimir la tasa metabólica, la motilidad y fertilidad de los espermatozoides. los efectos adversos solo se notan si el semen está en contacto con oxígeno (18).

### **6.7.5. Presión osmótica**

La membrana de los espermatozoides es semipermeable, por lo cual las soluciones hipo e hipertónicas alteran la transferencia de agua a través de la membrana, lesionando la integridad de la célula, es muy importante utilizar solo soluciones isotónicas ya que los espermatozoides permanecen móviles por más tiempo (18).

### **6.7.6. Temperatura**

Cuando la temperatura se eleva a más de 50°C los espermatozoides sufren una pérdida irreversible de su motilidad. Si se mantiene a la temperatura corporal, solo vivirán por unas pocas horas, debido al agotamiento de los substratos de energéticos, a una caída del pH (49).

### **6.8. Métodos de conservación del semen**

La IA con semen fresco, refrigerado y congelado son tecnologías reproductivas importantes en la reproducción de animales domésticos, han contribuido sustancialmente en el mejoramiento genético de diversas especies domésticas y disponer de prole de alta calidad genética (16).

#### **6.8.1. Crioconservación**

La crioconservación permite el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular a temperaturas bajas, por lo que es posible detener el proceso que sufre el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación y conservarlo en el tiempo potencialmente fértil. El fin de los protocolos de criopreservación es el de obtener mejores resultados en relación con la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelamiento (50)

##### **6.8.1.1. Diluyentes de semen**

Un diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (albumina sérica de ternero), controlar el pH del medio (bicarbonato, tris, hepes), la presión osmótica (sales NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano mediante la adición de antibióticos (46).

Los diluyentes de uso común son los que se preparan para el día como: Tris-yema de huevo, leche descremada, suero albúmina bovina; así como también diluyentes comerciales que ya vienen preparados como: Steridyl, Andromed, Biladyl, Triladyl. Todos ellos cumplen la función de preservar, nutrir y mantener a los espermatozoides en un medio estable (16).

Según Raymundo et al., 2006 “A la fecha, se reporta el uso de varios diluyentes para semen de alpacas, entre los que se encuentran la leche descremada, fosfato salino tamponado, glucosa-citrato, yema de huevo-glucosa-citrato, tryladil y tris tamponado; aunque parece que el mejor diluyente para semen de alpacas es el tris tamponado, existen resultados contradictorios y muchas veces no repetibles” (51).

### **6.8.1.2. Crioprotectores**

Según Ávila et al., 2006 “la criopreservación funciona como un mantenimiento de la funcionalidad y viabilidad celular para poder mantenerse en temperaturas bajas en los sistemas celulares, este tiene problemas y variaciones químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las diferentes membranas celulares o lo que se vaya a crioconservar” (50). El uso de crioprotectores alternativos se ha planteado como una medida para disminuir el estrés osmótico durante el proceso de congelación de semen reducir su viscosidad, para facilitar su uso en tecnologías reproductivas (52).

- **Crioprotectores permeables**

Sustancias de bajo peso molecular que pueden pasar a través de la membrana celular, reemplazando el volumen de agua intracelular evitando los daños producidos por la formación de cristales de hielo y, a su vez, manteniendo el volumen celular impidiendo el colapso celular por excesiva deshidratación (53). Son utilizados: el glicerol, el dimetilsulfoxido (DMSO) y propanediol (PROH) (50).

- **Crioprotectores no permeables**

Son sustancias de alto peso molecular, efectivas a velocidades altas de congelación, son importantes por ejercer su acción crioprotectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes (50). Dentro de estos azúcares como la rafinosa, trehalosa y sacarosa, estos favorecen la excreción de agua fuera de la célula, a fin de disminuir la formación de cristales de hielo intracelular (54).

### **6.8.1.3. Licuefacción del semen**

El esperma es eyaculado en estado líquido, pero inmediatamente después de la eyaculación el semen se vuelve una masa semisólida coagulada. La licuefacción ocurre en 10-20 minutos a temperatura ambiente. Una muestra se considera normal si es una muestra licuada, homogénea, sin grumos ni coágulos (55).

Según Toro, 2009 “El semen se coagula casi inmediatamente después de su eyaculación, para nuevamente licuarse de 5 a 40 minutos después, por la acción del antígeno específico de próstata. En algunos casos, la licuefacción no se completa hasta después de una hora y se debe informar; sin embargo, su significado clínico es controvertido (56)”.

El plasma seminal en CSA, es altamente viscoso (parecido a la clara de huevo), lo que dificulta la motilidad de los espermatozoides presentando tan solo una motilidad progresiva después de la aplicación del dilutor y licuefacción (31).

El aspecto viscoso del semen, no tiende a la licuefacción como en semen humano. Su carácter filante dificulta la confección de frotis, como también la succión y vaciado de las micropipetas en la preparación de muestras para la determinación de concentración. Por tal motivo, los recuentos deben ser valorados con mesura (57).

Durante los últimos años se han utilizado diferentes técnicas para mejorar las propiedades del semen y a su vez la motilidad espermática; Apaza et al., 2020 menciona que “algunos investigadores aplicaron licuefacción mecánica, agitación, punción, pipeteo y centrifugación, últimamente, exposición a ultrasonido con éxito para eliminar viscosidad y mejorar la preservación enfriada a corto plazo del semen. Otros autores complementaron el diluyente de semen con diferentes enzimas a fin de eliminar viscosidad, uso de catalizadores de descomposición con peróxido de hidrógeno, catalizadores de descomposición de carbohidratos de cadena larga, enzimas proteolíticas” (58).

### **6.8.2. Semen fresco**

En varias especies de interés productivo, especialmente en el bovino, la inseminación artificial (IA) constituye la principal herramienta para la diseminación de genes de alta calidad; sin embargo, en camélidos sudamericanos (CSA) se limita a la utilización de semen fresco con una tasa máxima de preñez del 77% (1), si bien existen reportes sobre el desarrollo de la IA con semen fresco donde se han obtenido resultados ente 60-62% de fertilidad en ensayos experimentales y una natalidad del 48% en crianza campesinas (16)

### **6.8.3. Semen refrigerado**

“La refrigeración a 4 grados Celsius esta entre las metodologías más usadas para la conservación del semen, pero este método es limitado por el tiempo que el semen puede ser almacenado, dada la reducción en la fertilidad del semen con el transcurso de horas, la refrigeración es recomendable cuando se realiza inseminaciones repetidas” (59).

El proceso de refrigeración forma parte del proceso de congelación; sin embargo, también puede utilizarse como método de conservación a corto plazo para lo que necesita medios diluyentes adecuados que deben contener componentes específicos, es decir, una solución tampón, sales, azúcares y sustancias que aporten una cierta protección de la membrana contra el descenso de temperatura, como la yema de huevo (60).

#### **6.8.4. Semen congelado**

En camélidos sudamericanos se han obtenido malos resultados con semen congelado-descongelado oscilaron entre 0 y 26 %, mientras que la preñez máxima (33 %) se obtuvo con semen enfriado a 5 °C [...] Hasta la fecha, ningún estudio ha examinado las alteraciones de la ultraestructura del espermatozoide en llamas causadas por enfriamiento o congelación (61).

El proceso de congelamiento de semen es semejante al proceso que existe en otros animales de granja, el proceso de enfriamiento se puede alcanzar en una hora, luego la inclusión de glicerol parece apropiada para llamas y alpacas, aunque recientemente, una metodología eficiente de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca ha sido desarrollada utilizando glicerol a una concentración de 3% pero a pesar de sus beneficios, el glicerol es potencialmente citotóxico a ciertas concentraciones ya que debe ser usado en concentraciones menos del 4% y tiene un efecto contraceptivo en algunas especies (62). [...] Al descongelamiento existe aproximadamente un 50% de espermatozoides que pierden su motilidad y constituye un reto en el proceso de descongelamiento que se viene investigando (63).

Moore et al, 2006 menciona que “La curva de congelamiento y los diferentes cambios de temperatura utilizados durante el proceso de criopreservación de las muestras espermáticas, están directamente relacionados con los daños celulares, dado que los espermatozoides sufren deshidratación y la formación de cristales de hielo intracelulares, durante este proceso” (64).

#### **6.9. Factores críticos en el proceso de criopreservación**

La alta viscosidad, la reducida concentración espermática, el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados y las dificultades en la colección de semen y en el manejo de las muestras seminales; se constituyen en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación que nos brinden óptimos resultados de calidad espermática (65) Además, factores ambientales y fisiológicos, como estación del año, edad de los animales, raza, nivel nutricional, pueden también alterar las características seminales, como se ha observado en otras especies (48).

## 7. PREGUNTAS CIENTÍFICAS O HIPÓTESIS:

A través de uno de los métodos de colección se pudo obtener una muestra viable la cual fue analizada en el laboratorio y posteriormente mezclada con el diluyente Triladyl, para crioconservar la muestra y luego evaluar sus características microscópicas post descongelación, obteniendo una baja viabilidad a diferencia con de la muestra de semen fresco; aceptando así la Hipótesis Nula “A través de los métodos de extracción de semen y su crioconservación no se pudo obtener una alta viabilidad y conservación”.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1. Área de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del Centro Experimental Académico Salache y el Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la carrera de Medicina Veterinaria de Universidad Técnica de Cotopaxi (UTC), localizado en la provincia de Cotopaxi en la parroquia Eloy Alfaro a una distancia de 7.7 Km de la ciudad, geográficamente se encuentra ubicada a 16°31'28" de latitud sur y 68°20'39" de longitud oeste y una altitud de 3990 msnm (66).

### 8.2. Unidad Experimental

#### 8.2.1. Registro de animales

La población estuvo conformada por 3 Alpacas machos en los cuales se consideró su condición corporal y su edad; los machos introducidos en el programa de colecta de semen tenían una edad promedio de 3, 4 y 7 años, para estimar la edad de los ejemplares se evaluó su dentadura aplicando la técnica de boqueo (67); posteriormente se procedió a examinar sus órganos reproductores tomando en cuenta el tamaño, forma, consistencia y elasticidad de testículos y epidídimo, así como las condiciones del prepucio y el pene (41).

**Tabla Nº 2:** Determinación de las edades de los machos mediante técnica de boqueo.

No animales	Identificación	Edad
1	0814 (Pablo)	7 años
2	4503 (Fonsi)	4 años
3	SN (Camilo)	3 años

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia, 2023.

### 8.3. Materiales

#### Equipos de campo

Alpaca receptiva	Overol
Maniquí de grupa	Botas
Maniquí completo	Guantes de manejo
Feromonas (Orina de alpaca receptiva)	Tubos de falcón de 15 ml
Cono de látex	Gasas o algodón
Camisa de látex	Papel aluminio
Ligas	Termómetro
Frazada eléctrica	Cooler
Tetera eléctrica	Sogas
Agua a 40° C	Jeringas de 20, 5 ml
Extensión de luz	

#### Materiales de oficina

Resma de papel  
 Anillados  
 Empastados 30  
 Copias  
 Lápiz, marcadores, esferográficos  
 Memory flash  
 Libreta

#### Materiales Experimentales

Contenido eyaculado	Micro pipeta 10 u
Tubos con muestras seminales	Puntas de pipetas
Tubos de falcón de 15 ml	Portaobjetos
Guantes	Cubreobjetos
Microscopio simple	Vasos de precipitación
Cámara de Neubauer	Jeringas de 3, 5ml
Gotero	Colorantes (nigrosina)

Termómetro	Agua destilada
Placa de calentamiento en temperatura de 37° C	Baño María
Agua destilada	Tanque criogénico
Papel secante	Nitrógeno
Diluyente Triladyl	Pajillas
	Selladora eléctrica

#### **8.4. Manejo del Ensayo**

##### **8.4.1. Evaluación del estado de la salud animal y la valoración del sistema reproductor de los machos.**

Se realizó la evaluación de cada uno de los alpacas machos, mediante palpación del testículos, prepucio y pene para la observación y verificar el estado del aparato reproductor, se observó el tamaño testicular y longitudinal del prepucio y cumplieron con los parámetros requeridos para poder continuar con el estudio (1). De la misma forma en este proceso, el macho juega un papel importante en el proceso reproductivo y mejoramiento genético, porque de su correcta selección y buen manejo dependerá el éxito de la explotación (68).

##### **8.4.2. Entrenamiento de la alpaca macho para la monta**

Se entrenó a los animales de dos a tres veces por semana, estuvieron aislándolos por tres semanas y a la semana posterior al aislamiento se tuvo un contacto visual con hembras que presentaron interés por cada uno de los sementales, también se empleó un maniquí de grupa y un maniquí completo. El adiestramiento y extracción tuvo una duración de dos meses donde se evidenció interés de la alpaca macho (0814) desde la primera semana, del cual se obtuvo un buen eyaculado y se pudo valorar las características macroscópicas y microscópicas de la muestra seminal.

**Tabla Nº 3.** Planificación del entrenamiento de alpacas machos.

<b>Protocolo maniquí completo</b>	
<b>Dia</b>	<b>Actividad</b>
25-26 de abril de 2023	Aislamiento de alpacas machos y construcción de corrales.
05 de mayo de 2023	Entrenamientos de las alpacas en las instalaciones del CEASA.
23 de mayo de 2023	Inicio de protocolo con maniquí completo, se colocó feromonas (orina) para que se impregne el olor por 48 horas.
26-28-30 de mayo de 2023 Lunes-miércoles-viernes	Reconocimiento del macho hacia el maniquí, y colección de muestra espermática, durante dos horas en la mañana y 2 horas en la tarde, tres veces a la semana.
<b>Protocolo maniquí de grupa</b>	
<b>Dia</b>	<b>Actividad</b>
06 de junio de 2023	Con la ayuda de una hembra receptiva más grupa y vagina artificial iniciamos el segundo protocolo, entrenando a la hembra para que su manejo sea lo menos estresante.
9-12-14 de junio de 2023 16-19-21 de junio de 2023 23-26-28 de junio de 2023	Se realizo entrenamientos tres veces por semana durante la mañana y tarde por dos horas.
<b>Protocolo de desvío de pene con vagina artificial y hembra receptiva</b>	
<b>Dia</b>	<b>Actividad</b>
30 de junio de 2023	Se coloco a la hembra en posición esternal y al macho en posición de copula, se verifico que el pene se encuentre dentro de la vagina artificial.
03 de julio de 2023	Preparación de diluyente “Triladyl CSS One Step”
05 de julio de 2023	Extracción de muestra en la mañana con vagina artificial a una temperatura de 40°C regulada con frazada.
	Análisis macroscópico y microscópico de la esperma obtenida.
	En la tarde se procedió a crioconservar la muestra durante 2 horas.
06 de junio de 2023	Se descongelo las muestras y se observó al microscopio para su valoración y análisis.

### **8.4.3. Identificación del método de extracción del semen**

Los animales que fueron seleccionados se mantuvieron en un corral dividido en dos secciones. En una sección se tenía a los machos y en la otra a la hembra receptiva, se procedió a entrenar con un maniquí completo, maniquí de grupa y una hembra receptiva, donde el semen fue colectado con el maniquí de grupa y el uso de la vagina artificial, esta consta de un tubo de caucho de 21 cm de largo por 4 cm de diámetro, al que internamente se le adaptó una camisa de látex. La VA se cubrió con una frazadilla eléctrica para mantener una temperatura de 40° C durante la colecta.

#### **8.4.3.1. Protocolo con maniquí completo**

- Este método es el menos trabajoso para extraer esperma seminal de los machos; para ellos se presentó el maniquí artesanal a los machos para observar sus primeras reacciones.
- Tomamos muestras de orina de las hembras en vasos para muestras y se colocó sobre la grupa 6 horas antes para que su olor se pueda impregnar y de esta manera incentivar más la libido del animal.
- Se paseo al animal alrededor del maniquí para que este se familiarice y se vaya adaptando al mismo.
- Cada mañana se lo entrenaba alrededor de 2 horas, lo llevábamos por sitios aislados para que se sientan en confianza con sus entrenadores, dependiendo de su aceptación.
- La vagina artificial se encontraba regulada a una temperatura de 40° C con la ayuda de una frazada, esta temperatura es constante en cada uno de los tres métodos de extracción del proyecto de tesis.
- Se lo entreno durante dos semanas con maniquí sin tener éxito debido a que el animal nunca logro aceptar al maniquí artesanal eyaculando fuera de la vagina artificial.

#### **8.4.3.2. Protocolo con maniquí de grupa**

- Este método de colección se realizó con grupa y la ayuda de una hembra receptiva, se continuo con el entrenamiento de la alpaca macho junto con la hembra con el fin de que se familiaricen.
- El entrenamiento se realizó en la mañana durante 2 horas y en la tarde 2 horas durante 3 días a la semana.
- Una vez culminado el entrenamiento ayudándonos de cuerdas para sujeción se derribó a la hembra colocándola en posición esternal y sobre ella se ubicó la grupa ensamblada con la vagina artificial, es importante incentivar a la hembra con comida para que esta no se estrese.
- Al macho se le dio varias vueltas alrededor de la hembra para elevar su lívido.
- Durante la monta el macho no lograba acomodarse a la grupa ya sea por el tamaño del animal o la posición de la grupa constantemente eyaculaba en los contornos de la vagina.
- Por varias semanas se intentó que el macho se acople a este método, sin embargo, los resultados no fueron los esperados. Similares eventos ocurrieron con el método del maniquí, sin lograr un acople adecuado a la grupa.

#### **8.4.3.3. Protocolo con hembra receptiva con desviación de pene**

- Para este método se requirió nuevamente una hembra receptiva que se la colocó en posición esternal, esta vez sin grupa.
- A continuación, se presentó al macho para que se familiarice con la hembra, siendo su aceptación de inmediato.
- El operador procedió a desviar el pene a la vagina artificial durante 20 minutos aproximadamente, obteniendo así su primera muestra.
- El entrenamiento se realizó en la mañana entre 2 horas durante 2 días a la semana.
- Este método tuvo éxito en la toma de muestra, sin embargo, el grado de dificultad fue mayor respecto a los otros métodos aplicados, por cuanto el operador debió mantener el prepucio dentro de la vagina artificial durante la colecta.

#### **8.4.4. Extracción de semen**

Una vez adaptado y familiarizado el macho con los maniquís y el personal que estuvo permanentemente operando al animal; se procedió a la extracción de semen por el método de desviamiento de pene utilizando una hembra receptiva y vagina artificial.

#### **8.4.5. Elección del diluyente**

El estudio se realizó con el diluyente “Triladyl CSS One Step”, este es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso de un solo paso, que está basado en TRIS (Hidroxi-metil aminometano, un amortiguador sintético) (69), además el crioprotector de este diluyente es el glicerol que es una sustancia de bajo peso molecular (92.09 de peso molecular ) y permeables a través de la membrana, que protegen a la célula de las lesiones producidas por las congelaciones a velocidad lenta, evitando la formación de cristales durante el congelamiento evitando la ruptura del espermatozoide (70). Dentro de este grupo el glicerol es el más usado en la crio conservación espermática.

#### **8.4.6. Preparación del diluyente**

Se adiciono tres partes de agua destilada (60%), una parte de yema de huevo a baño maría (20%) y una parte del concentrado comercial Triladyl (20%), seguidamente se centrifugó a 500 revoluciones por 2 min.

#### **8.4.7. Dilución de semen**

En tubos falcón se midió el eyaculado – semen del ejemplar (0814), se mantuvo temperado en baño maría a 37°C. La dilución se realizó en una relación 1:1 de semen y de diluyente.

#### **8.4.8. Congelación de semen con diluyente**

Una vez mezclado el diluyente y el semen se enfrió a 5°C con una velocidad de 0.4°C/minuto, y se mantuvo a esa temperatura por 2 horas, donde los espermatozoides estuvieron en contacto con el glicerol.

Las pajuelas se colocaron horizontalmente en una gradilla a una distancia de 4 cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido dentro de una caja de poliestireno o couler.

Las pajuelas se pusieron a vapores de nitrógeno líquido entre -100°C durante 20 minutos y posteriormente se depositaron directamente en nitrógeno líquido -196°C y seguidamente se depositó en el tanque criogénico.

#### **8.4.9. Post descongelación del semen con diluyente**

Una vez congelada la muestra se retiró la pajilla del tanque criogénico y se puso en baño maría a una temperatura de 37 °C para su posterior uso en la evaluación espermática.

#### 8.4.10. Variables analizadas referente a la calidad macroscópica del semen fresco.

Se extrajo una muestra de eyaculado del macho N.º 0814, se la llevó al laboratorio donde las placas se encontraban listas para evaluar las siguientes características macroscópicas del semen fresco:

- **Aspecto:** es la formación del hilo dada por la viscosidad del semen. Se midió con ayuda de una micropipeta de 10  $\mu$ l haciendo una extensión que se toma en cuenta desde la lámina porta objeto hasta la ruptura del hilo.
- **Color:** se realizó observando a trasluz en un tubo Falcón graduado, considerando los valores de transparente, semi lechoso y lechoso.
- **Volumen:** se midió con el tubo Falcón graduado de 15 ml.
- **pH:** se determinó mediante tiras reactivas indicadoras de pH aplicando una gota de semen.

#### 8.4.11. Variables analizadas referente a la calidad microscópica del semen fresco.

Con la ayuda de una micropipeta de 10 uL colocamos una muestra de semen fresco en la cámara de Neubauer y en un porta y cubreobjetos donde se evaluaron las siguientes características microscópicas del semen fresco:

**Concentración:** El recuento en cámara se lleva a cabo a través de los siguientes pasos:

- Adherir el cubreobjetos sobre la cámara ejerciendo luego una firme presión contra la cámara. Si la adhesión es correcta se observa en los bordes del cubreobjetos un fenómeno de difracción de la luz denominado "anillos de Newton".
- Aspirar 5 microlitros de semen mediante micropipeta.
- Secar los laterales del tip de la micropipeta con papel blanco.
- Colocar la punta del tip de la micropipeta en el borde del cubreobjetos. El líquido no debe pasar a los surcos laterales de la cámara ni deben quedar burbujas de aire o zonas sin cargar.
- Colocar la cámara bajo observación microscópica (40x). Si los espermatozoides no están distribuidos uniformemente en toda la cámara, debe repetirse la operación de cargado.
- Dejar reposar unos minutos antes de iniciar el recuento.
- Se cuenta el número de espermatozoides en un cuadrado grande por cada cuadrante y se repite el conteo en uno de los cuadrantes elegido al azar, contándose en total 5 cuadrados.

Se usó la fórmula  $\text{Esp. /mm}^3 = (A \times B \times C \times D) / F$ . En la cual: Número de espermatozoides contados (A), tamaño del cuadrado de  $400\text{mm}^2$  (B), dilución realizada 0.5ml (C), altura de la cámara 0.1mm (D), se multiplica por 10 para que el resultado quede expresado en  $1\text{mm}^3$  (E), número de cuadraditos contados (F).

**Motilidad:** se colocó 10  $\mu\text{l}$  de semen en una lámina portaobjeto atemperada y se observó en un microscopio a 40X. Para determinar la motilidad, se consideró a todos los espermatozoides que presentaron algún tipo de movimiento (lineal o rotatorio). El resultado fue expresado en porcentaje.

La evaluación se realizó dividiendo el número de espermatozoides móviles contados entre el total de espermatozoides contados en un campo, este resultado se multiplica por 100.

$$\% \text{ de motilidad} = \frac{\# \text{ de espermatozoides móviles}}{\text{total espermatozoides contados}} \times 100$$

**Vitalidad:** se colocó 10  $\mu\text{l}$  de semen en una lámina portaobjetos seguido de 10  $\mu\text{l}$  de eosina-nigrosina. Se homogenizo y se hizo un frotis. Se cuentan los espermatozoides a 40X. Se consideraron como muertos a los espermatozoides coloreados y como vivos a los no coloreados. El resultado fue expresado en porcentaje.

Se considera que un semen es de buena calidad cuando se observa un 90 – 95% de espermatozoides vivos en semen fresco.

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{\# \text{ espermatozoides teñidos}}{\# \text{ espermatozoides totales contados}} \times 100$$

n= Número de espermatozoides sin teñir N= Número de espermatozoides contados.

#### **8.4.12. Medición y valoración de las variables microscópica de semen con el diluyente Triladyl**

Colocamos la muestra y el diluyente Triladyl en relación 1:1, con la ayuda de una micropipeta de 10  $\mu\text{L}$  ponemos la muestra en la cama de Neubauer y en un porta y cubre objetos y valoramos con lentes de 10X y 40X, para la valoración de datos.

#### **8.4.13. Análisis de Morfo-anomalías en el semen de camélidos.**

Las anomalías de los espermatozoides se pueden observar mediante el microscopio, al contar 100 espermatozoides y separando las anomalías en primarias y secundarias,

la suma entre anormalidades primarias y secundarias no deberá ser mayor de 20% para obtener un semen apto para usar.

En el semen de las alpacas, las proporciones de espermatozoides vivos y morfológicamente normales varían desde 58 – 83% y 71 – 84%, respectivamente, se pueden encontrar anormalidades como: colas con curvaturas y colas dobles (9 – 15%), cabezas libres y cabezas dobles (3 – 13%) y la presencia de gota citoplasmática (1 – 7%) los efectos de muchas anormalidades en la fertilidad no han sido determinados (71).

## 9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 9.1. Comparación de los tres métodos de colección de semen.

Se comparó tres métodos de colección de semen de alpaca, el primero fue el método con maniquí completo más vagina artificial y uso de feromonas (orina), el segundo fue el método por grupa más vagina artificial con la ayuda de una hembra receptiva y por último fue el método de desviación de pene y hembra receptiva. Para la evaluación del libido y la aceptación de los métodos de colecta la siguiente escala (tabla 4).

**Tabla N° 4:** Escala de evaluación del libido y aceptación de los métodos de colecta

Escala numérica	Escala arbitraria
3	Alto
2	Medio
1	Bajo
0	Nulo

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia; 2023.

En la tabla N° 5 se muestra que las alpacas machos 4503 y SN mostraron una carencia total de libido en los tres métodos provocando un rechazo total a dichas maniobras, mientras que el ejemplar 0814 mantuvo un interés y libido alto; en el primer método no pudo adaptarse a la forma del maniquí debido a que era cuadrado y las esquinas punzaban su abdomen, haciendo que la muestra de semen se riegue afuera de la vagina artificial dificultando así su colecta. “Aproximadamente, solo un 60% de los machos responden al entrenamiento con el maniquí, dado la naturaleza nerviosa propia de la especie” (72).

**Tabla No 5:** Método con maniquí completo más vagina artificial y uso de feromonas (orina).

ID	Libido	Aceptación de maniquí	N.º de montas por hora	N.º de eyaculados	Observaciones
0814	Alto	Medio	1	0	No logro adaptarse a la forma del maniquí.
4503	Nulo	Nulo	0	0	No mostro interés en el maniquí.
SN (Camilo)	Nulo	Nulo	0	0	No alcanza aún su madurez sexual.

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia; 2023.

Mientras que en la tabla N<sup>o</sup> 6 podemos observar que, con el método de maniquí con grupa más hembra receptiva, el macho 0814 presento interés, pero no pudo adaptarse a la forma de la grupa y a los movimientos de la hembra, por lo tanto, este método lo intentamos por varias ocasiones hasta que el macho pueda acoplarse, pero no se obtuvo resultados ya que la muestra de semen se rego afuera de la vagina artificial y encima de la hembra receptiva.

**Tabla N<sup>o</sup> 6:** Método por grupa más vagina artificial con la ayuda de una hembra receptiva

ID	Líbido	Aceptación del método	N.º de montas por hora	N.º de eyaculados	Observaciones
0814	Alto	Medio	2	2	Constantemente eyaculaba fuera de la vagina artificial.
4503	Nulo	Nulo	0	0	No mostro interés.
SN	Nulo	Nulo	0	0	

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia; 2023.

Sin embargo, en la tabla N<sup>o</sup> 7 se indica las características del tiempo de cópula y del eyaculado mediante el método de desviación de pene y hembra receptiva donde el ejemplar 0814 presento un libido alto, con un numero de montas de 2 veces por hora en lo que duro la copula obteniendo así en la primera muestra 1 ml y en la ultima 1.5 ml.

**Tabla N° 7:** Método de desviación de pene y hembra receptiva

<b>ID</b>	<b>Líbido</b>	<b>Aceptación del método</b>	<b>N.º de montas por hora</b>	<b>N.º de eyaculados</b>	<b>Cantidad de muestra en (ml)</b>	<b>Observaciones</b>
<b>0814</b>	Alto	Alto	2	3	1-1.5 ml	Se extrajo la muestra de eyaculado
<b>4503</b>	Nulo	Nulo	0	0	0	No mostro interés
<b>SN</b>	Nulo	Nulo	0	0	0	

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia; 2023.

En la tabla N° 8 se explica los resultados de los diferentes métodos de colecta. En la cual la alpaca macho 0814 en el método con maniquí completo obtuvo un rango de 2 (medio), en el método por maniquí de grupa y hembra receptiva se obtuvo un promedio de 3 (alto) al igual que el método de hembra receptiva y desviación del pene, siendo los dos últimos métodos más viables y aceptables; el uso de la hembra receptiva ayudó a incrementar la libido de los machos mostrando así mayores ventajas.

**Tabla N° 8:** Aceptación de los diferentes métodos de colecta en escala de 0-3.

<b>ID</b>	<b>Maniquí completo</b>	<b>Maniquí de grupa y hembra receptiva</b>	<b>Hembra receptiva y desviación del pene.</b>
<b>0814</b>	2	3	3
<b>4503</b>	0	0	0
<b>SN</b>	0	0	0

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia; 2023.

## **9.2. Análisis de las variables de la calidad del semen**

### **Medición y valoraciones macroscópicas de semen fresco**

Como se muestra en la tabla N° 9 la medición y valoración de las variables macroscópicas de semen fresco que se obtuvo la alpaca macho 0814, tuvo un volumen de 1 a 1.5 ml de aspecto viscoso con un color semi lechoso, donde se pudo medir su PH el cual fue de 7.2.

**Tabla N° 9:** Medición y valoración de las variables macroscópica de semen fresco.

ID	Edad	Aspecto	Color	Volumen	PH
0814	7 años	Viscoso	Semi lechoso	1-1.5	7.2
4503	4 años	0	0	0	0
SN	3 años	0	0	0	0

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia; 2023.

Mientras que en la tabla N° 10 la medición y valoración de las variables microscópicas de semen fresco se pudo observar que en la primera muestra del ejemplar 0814 se obtuvo una concentración de 1.9 millones de espermatozoides por ml teniendo una motilidad de 53%, una mortalidad del 14% y morfoanomalias del 26%; para la segunda muestra se tuvo una concentración de 1.5 millones de espermatozoides por ml, una motilidad del 49%, mortalidad 20% y morfoanomlias del 51%.

**Tabla N° 10:** Medición y valoración de las variables microscópica de semen fresco.

ID	Concentración X 10 6	Motilidad	Mortalidad	Morfo anomalías
0814	1.9	53 %	14%	26 %
0814	1.5	49%	20%	51%

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia; 2023.

En la tabla N° 11 se indica la medición y valoración de las variables microscópicas de semen más diluyente se pudo observar que el ejemplar 0814 en la primera muestra obtuvo una concentración de 1.4 millones de espermatozoides por ml teniendo una motilidad de 12%, una mortalidad del 25% y morfoanomalias del 40%. En la segunda muestra del mismo ejemplar se tuvo una concentración de 1.2 millones de espermatozoides por ml, una motilidad del 14%, una mortalidad 24% y morfoanomalias del 43%.

**Tabla N° 11:** Medición y valoración de las variables microscópica de semen con diluyente post descongelación.

ID	Concentración x1 06	Motilidad	Mortalidad	Morfo anomalías
0814	1.4	12 %	25 %	40 %
0814	1.2	14 %	24 %	43%

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia; 2023.

En la tabla N° 12 se indica las anomalías de la muestra de semen del ejemplar 0814 donde se obtuvo un 74% de espermatozoides normales, colas curvas 9%, colas dobles 7%, cabezas libres 3%, cabezas dobles 6% y la presencia de gota citoplasmática 1%.

Mientras que la evaluación de semen con diluyente post descongelado fue: espermatozoides normales 49%, colas curvas 10%, colas dobles 15%, cabezas libres 6%, cabezas dobles 13% y la presencia de gota citoplasmática 7%.

En la segunda colecta de semen fresco se obtuvo lo siguiente: espermatozoides normales 60%, colas curvas 9%, colas dobles 13%, cabezas libres 3%, cabezas dobles 12% y la presencia de gota citoplasmática 3%; en la segunda muestra de semen con diluyente post descongelado se consiguió los siguientes resultados: espermatozoides normales 57%, colas curvas 9%, colas dobles 13%, cabezas libres 3%, cabezas dobles 13% y la presencia de gota citoplasmática 5%.

**Tabla N° 12:** Morfo anomalías del semen en camélidos

	ID	Espermatozoides Normales	Colas Curvas	Colas dobles	Cabezas libres	Cabezas dobles	Presencia de gota citoplasmática
<b>Sin diluyente</b>	0814	74%	9%	7%	3%	6%	1%
	0814	49%	10%	15%	6%	13%	7%
<b>Con diluyente post descongelación</b>	0814	60%	9%	13%	3%	12%	3%
	0814	57%	9%	13%	3%	13%	5%

**Fuente:** Directa

**Elaborado por:** Jorge Molina, Alejandro Segovia; 2023.

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se pudo establecer las diferencias que existió entre los tres métodos de colección siendo el método por desvío de pene y vagina artificial el más viable al momento de la obtención de la muestra como lo indica. La obtención de semen con vagina artificial y desvío presenta ventajas como desventajas la primera positiva es que con este método se logró hacer la colecta al primer intento sin la necesidad de un equipo de alto costo y puede ser llevado a cabo por técnicos especializados, mientras que la principal desventaja es que es necesario contar con cierta cantidad de días dedicados al entrenamiento de los machos (46). El entrenamiento es un factor primario al momento de la colección, al igual que el aislamiento entre machos y hembras, esto nos permitió obtener una mejor colecta al momento de los distintos métodos.

Delgado y colaboradores presentaron tres técnicas de colección de semen en llamas donde al comparar las tres técnicas se tuvo una aceptación por parte del macho del 20 % para la técnica del maniquí completo sin hembra receptiva, 80 % para la técnica del maniquí de grupa y un 90 % para la técnica de la desviación del pene al inicio de la cópula, según el autor la última técnica es la más recomendable pues evita la contaminación del eyaculado (73).

Mediante la colección de semen con el método de hembra receptiva y desviación de pene se obtuvo un volumen de 1 a 1.5 ml el cual fue evaluado con y sin diluyente Triladyl para valorar sus características macroscópicas, microscópicas y sus anormalidades. Siendo el semen fresco el más óptimo para la inseminación debido a que se obtuvo un porcentaje del 60% de viabilidad en comparación con el semen con diluyente el cual presentó una mayor mortalidad al momento de su valoración, de igual manera su concentración espermática disminuyó y aumentó sus anormalidades por los cambios de temperatura al momento de criconservar.

## **11. IMPACTO**

La crianza de alpacas enfrenta problemas y dificultades en su productividad principalmente en las comunidades, donde la producción se realiza en sistemas tradicionales, con muchas carencias que repercuten en una baja productividad y altos niveles de morbilidad y mortalidad como consecuencia de la presencia de enfermedades.

Las alpacas son muy sensibles al frío, los cambios bruscos en la temperatura. Estas condiciones hacen al rebaño más vulnerable ante enfermedades y contribuye a un aumento en la tasa de mortalidad en animales recién nacidos, por ellos es importante la implementación de variedades de alpacas de color que están mejor adaptadas a las condiciones extremas de los ecosistemas altoandinos y tienen mayor resiliencia a la variabilidad climática.

La utilización de la biotecnología en la reproducción en alpacas tiene el propósito de desarrollar capacidades productivas y técnicas en el mejoramiento genético, permitiendo acceder a animales que cumplan con características necesarias para los productores y de esta manera mejorar los problemas de los rebaños y a su vez los ingresos económicos y las condiciones de vida de las familias productoras de alpacas con el país.

## 12. CONCLUSIONES

Se realizo la extracción de semen de alpaco (*Vicugna pacos*), con tres diferentes métodos siendo la desviación de pene y vagina artificial con la ayuda de una hembra receptiva el más óptimo para su obtención, las concentraciones de espermatozoides son muy variables esto dependerá de la edad, estado fisiológico, alimentación, entrenamiento y características propias del animal.

El semen fresco es el más óptimo para la inseminación artificial, habiendo una tasa alta de viabilidad, la muestra con diluyente, “Triladyl CSS One Step” presento mayor mortalidad en comparación con el semen fresco al momento de la valoración y una concentración espermática mayor en comparación al semen con diluyente post descongelación.

## 13. RECOMENDACIONES

- Establecer un protocolo de entrenamiento efectivo ya que esto será fundamental al momento de la extracción seminal, el animal se familiarizará con la persona a cargo teniendo un vínculo así mejora su manejo y estará libre de estrés.
- Separar lo más distante a los machos de las hembras ya que estos mejoraran su libido y tendremos mayores cantidades de muestra.
- Implementar un plan de extracción seminal ya que la temperatura es un factor esencial para la vitalidad de los espermatozoides.
- La técnica de desviamiento de pene con la ayuda de una hembra receptiva es efectiva pero no es la más recomendada al momento de la extracción por las complicaciones que esta presenta como el tiempo de eyaculado que es superior a 20 minutos, además dar un incentivo a la hembra garantizando su confort y correcta extracción.
- Implementar los datos obtenidos a futuras investigaciones en el área de conservación y reproducción ya que en el país la información es casi nula.

#### 14. BIBLIOGRAFÍA

1. Wilber G V., Virgilio AB, Bravo PWM. Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú [Internet]. 1 de abril de 2017 [citado 28 de enero de 2023];28(2):337-44. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172017000200013&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172017000200013&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
2. hanzen c., Cucho Dolmos H., Ampuero Casquino E., Ordóñez Rodríguez C. y, Sumar Kalinowski J . Principios de reproducción de los pequeños camélidos sudamericanos . Servicio Internacional de Información Veterinaria, editor. 2015.
3. Galina C. Unidad 4. Reproducción aplicada a las especies de compañía. En: Claudia Méndez JJV, editor. Reproduccion de los animales domesticos [Internet]. Monterrey; 2021 [citado 21 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo17/autores.html>
4. Frank E. Curso de Manejo Reproductivo de Camelidos Sudamericanos Domesticos. Sitio Argentino de Producción animal [Internet]. 2017;28. Disponible en: [https://www.produccion-animal.com.ar/libros\\_on\\_line/23-curso\\_camelidos\\_1999/05-manejo\\_reproductivo.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/libros_on_line/23-curso_camelidos_1999/05-manejo_reproductivo.pdf)
5. Soria Eddy Bryan M. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE ALPACAS CON SEMEN COLECTADO POR ELECTROEYACULADOR AJUSTADO A 2 VOLTAJES. [Internet]. Univeridad Tecnica de Cotopaxi; [citado 7 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/6740/1/PC-000900.pdf>
6. FAO. Manual de prácticas de manejo de alpacas y llamas. 1996. 99 p.
7. Ferny Boada. Reproducción en camélidos [Internet]. 2014 [citado 7 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/FernyBoada/reproduccion-en-camlidos-29935384>
8. UNAM. Camelidos Sudamericanos. En: REPRODUCCIÓN DE LOS ANIMALES DOMÉSTICOS [Internet]. 2021 [citado 12 de enero de 2023].

- Disponible en:  
<https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo20/pubertad-macho.html>
9. Skidmore L. Fisiología reproductiva de los camellos macho y hembra | IVIS [Internet]. 2000 [citado 21 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.ivis.org/library/recent-advances-camelid-reproduction/fisiología-reproductiva-de-los-camellos-macho-y-hembra>
  10. Marai I, Zeidan A, Abdek A, Fadil A. EFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE CARACTERÍSTICAS REPRODUCTIVAS Y FISIOLÓGICAS DEL CAMELLO]. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 2009;10(2):129-49.
  11. Emma Quina. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE ALPACAS EN UN CONTEXTO DE CRIANZA CAMPESINA [Internet]. 2017 [citado 25 de enero de 2023]. p. 117. Disponible en: [http://www.descosur.org.pe/wp-content/uploads/2018/01/LIBRO\\_publicado.pdf](http://www.descosur.org.pe/wp-content/uploads/2018/01/LIBRO_publicado.pdf)
  12. Anonimo. ENDOCRINOLOGIA [Internet]. [citado 21 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://www.uv.es/garao2/estresyadiccion/psicoendocrinologia.htm>
  13. DANIEL SEVERO CHOQUE SANCHEZ. “Comparación de tres métodos de diagnóstico de preñez en llamas (Lama glama) de la Estación Experimental Choquenaira”. 2016.
  14. GIUVIKA SESY CAVALCANTI NALVARTE. «EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE LA HORMONA LIBERADORA DE GONADOTROFINAS (GnRH) EN LA CALIDAD SEMINAL DE ALPACAS (Vicugna pacos), CIP - QUI MS AC HAT A -Puno2012». 2011;2015.
  15. Delgado Ordinola JK. Evaluación de la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en muestras frescas sin fijar (0 horas) y muestras fijadas en formaldehído (24 horas y 1 semana) mediante citometría de flujo. Repositorio de Tesis - UNMSM. 2019;

16. Gandarillas D, Annie EE, Hualla T. MANUAL DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL EN ALPACAS [Internet]. 1a ed. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann Av. Miraflores S/N Tacna Perú, editor. Tacna ; 2021 [citado 24 de enero de 2023]. Disponible en: [http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/4432/manual\\_de\\_inseminacion\\_artificial\\_en\\_alpacas.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/4432/manual_de_inseminacion_artificial_en_alpacas.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
17. ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA. MANUAL DE PRÁCTICAS DE EMBRIOLOGIA HUMANA. Mexico;
18. Valle E. Evaluación de dos técnicas de colección de semen en llamas (Lama glama) en la estación experimental de Choquenaira. UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES FACULTAD; 2013.
19. Quintero NITL; LAB. Proteínas del plasma seminal y su relación con la fertilidad espermática. Genetica Bovina [Internet]. 2018 [citado 21 de agosto de 2023]; Disponible en: <https://revistageneticabovina.com/reproduccion/proteinas-plasma-seminal-relacion-fertilidad-espermatologica/>
20. Hugo Diaz, Juan Espinoza, Wilfredo Hunca, Bernardo López, Bernardo Torres, José Rodríguez. Características Bioquímicas del Plasma Seminal Fresco y Congelado/Descongelado de Alpaca (Vicugna pacos). Scielo Peru [Internet]. enero de 2015 [citado 11 de enero de 2023];26. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172015000100006](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172015000100006)
21. Avalos Rodriguez A, Gonzales Santos JA, Vargas Ibarra AK, Herrera Barragan JA. Recolección y manipulación seminal in vitro. En: Journal of Chemical Information and Modeling. 2013. p. 1689-99.
22. Aparicio M, Reus R. Fases de la espermatogénesis. Reproduccion Asistida ORG [Internet]. 2018 [citado 21 de agosto de 2023];1-11. Disponible en: <https://www.reproduccionasistida.org/espermatogenesis/>
23. Biología. TESTICULOS Y ESPERMATOZOIDES [Internet]. 2012 [citado 5 de enero de 2023]. Disponible en:

<http://biologian2012.blogspot.com/2012/07/testiculos-y-esperamtozoides.html>

24. Marcos S. Desarrollo heterogéneo , alternante y altamente ordenado en los túbulos seminíferos de la alpaca adulta ( Vicugna pacos ): resultados preliminares Seminiferous tubules development was heterogeneous , alternating and highly ordered in the adult alpaca ( Vi. 2007;1-4.
25. Fernandes HP. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL DEL SEMEN DE LLAMA COLECTADO MEDIANTE VAGINA ARTIFICIAL. 2014. 139 p.
26. OSCAR EVANGELISTA. CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA DE LOS ESPERMATOZOIDES EN ALPACAS MACHO (Vicugna pacos) DE FERTILIDAD COMPROBADA. [Lima ]: UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS; 2015.
27. IN VITRO. El espermatozoide: una célula muy particular | IN VITRO Buenos Aires [Internet]. 2020 [citado 13 de enero de 2023]. Disponible en: <https://invitro.com.ar/el-espermatozoide-una-celula-muy-particular/>
28. JHONY XAVIER CONCHA CUENCA. VALORIZACIÓN DE TRES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SEMEN EN CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS [Internet]. [Riobamba]: ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO; 2019 [citado 12 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/13382/1/17T01606.pdf>
29. Abad MMG. “Evaluación de la teratozoospermia en hombres jóvenes en relación con el proceso de fertilidad y las aberraciones cromosómicas“.
30. JOHANA ELIZABETH GARCES CABRERA. “EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE SEMEN FRESCO DE ALPACAS EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AÑA MOYOCANCHA CON LA APLICACIÓN DE OLIGOELEMENTOS“. [Riobamba ]: ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO; 2017.

31. Laruta Limachi, Loza Manuel, Delgado Pedro. Evaluación de características microscópicas de semen de llama (*Lama glama*) crioconservados en dos dilutores. *Journal of the Selva Andina Animal Science* [Internet]. 2016 [citado 28 de enero de 2023];3. Disponible en: [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2311-25812016000100002](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2311-25812016000100002)
32. Zirena N. COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS FÍSICOS EN EL TRATAMIENTO DEL SEMEN FRESCO DE ALPACA Y SU RELACIÓN CON LA CALIDAD ESPERMÁTICA POST CONGELACIÓN [Internet]. Universidad nacional Mayor de San Marcos; 2014 [citado 21 de agosto de 2023]. Disponible en: [chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/4313/Zirena\\_an.pdf?sequence=1&isAllowed=y](chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/4313/Zirena_an.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
33. YOVANA KATTI ROJAS CASTILLO. “EVALUACIÓN SEMINAL EN ALPACAS HUACAYA MEDIANTE LOS TEST DE EXPANSION HIPOOSMÓTICO (HOST) Y DE FRUCTOLISIS CON FINES DE MEJORA EN LOS INDICES REPRODUCTIVOS”. [Huanuco]: UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN; 2018.
34. JOHANA ELIZABETH GARCES CABRERA. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE SEMEN FRESCO DE ALPACAS EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL AÑA MOYOCANCHA CON LA APLICACIÓN DE OLIGOELEMENTOS [Internet]. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO; 2017 [citado 21 de agosto de 2023]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8138/1/17T1505.pdf>
35. BRAVO JT. Estudio Histológico del Espermatozoide de Alpacas y su correlación con las características microscópicas de calidad Seminal en el fundo Ucrucancha – Cerro de Pasco 2019 [Internet]. UNIVERSIDAD NACIONAL DANIEL ALCIDES CARRIÓN; 2019 [citado 21 de agosto de 2023]. Disponible en:

- [http://repositorio.undac.edu.pe/bitstream/undac/1490/1/T026\\_04080784\\_T.pdf](http://repositorio.undac.edu.pe/bitstream/undac/1490/1/T026_04080784_T.pdf)
36. Guerrero A, Bustiza J. Manual del Alpaquero [Internet]. 1996. Disponible en: [https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/978/1/Huanca-manual\\_del\\_alpaquero.pdf](https://repositorio.inia.gob.pe/bitstream/20.500.12955/978/1/Huanca-manual_del_alpaquero.pdf)
  37. Tataje Lavanda LA. Expresión testicular de ciclina A1 ( CCNA1 ) en alpacas ( Lama pacos ). 2013;1:79.
  38. MELISSA MARGARET VILCA SULCA. "LA IMPORTANCIA DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN LA. [Lima ]: Universidad Científica del SUR ; 2019.
  39. Bonacic S. Características biológicas y productivas de los camélidos sudamericanos. Avances en Ciencias Veterinarias. 1991;6(2):1-12.
  40. Cruz L. Parámetros genéticos de caracteres funcionales y secundarios en alpacas. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID; 2017.
  41. Wílber García. Manual de empadre controlado de alpacas. Lima ; 2009. p. 40.
  42. J. SUMAR MG. FISILOGIA DE REPRODUCCION DE LA ALPACA. En: Nuclear and related techniques in animal production and health. Viena: NOTE; 1986. p. 149-77.
  43. Fredy Zhindon. Comportamiento sexual de las hembras en Camélidos - Engormix [Internet]. 2010 [citado 15 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.engormix.com/ovinos/foros/comportamiento-sexual-hembras-camelidos-t11899/>
  44. Rodríguez JS, Moresco A. EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA FUNCIÓN REPRODUCTIVA DE LOS CAMÉLIDOS DEL NUEVO MUNDO. ZOOLOGICA NEOTROPICAL. 2019;4(1):15.
  45. Pacheco J. Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos. Revista electrónica de Veterinaria. 2015;9(May 2008):1-17.
  46. RENE CIPRIAN ACHIRCANA. CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE ALPACA UTILIZANDO METIL- $\beta$ -CICLODEXTRINA CARGADA CON

- COLESTEROL [Internet]. [Lima ]: UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA; 2018 [citado 25 de enero de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/3603/ciprian-achircana-rene.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
47. Hilasaca Mamani MG, Urviola Sánchez JM, Rodríguez Huanca FH, Leyva Vallejos VR, Hilasaca Mamani MG, Urviola Sánchez JM, et al. Efecto de la duración de cópula en la respuesta ovulatoria y tasa de preñez en alpacas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*. 31 de octubre de 2021;23(4):229-35.
  48. Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. Influence of Cryopreservation on the Motility, Viability and Fertility of Llama (*Lama Glama*) Spermatozoa. *Archivos de Zootecnia* [Internet]. 2003;52(197):15-23. Disponible en: [http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/30\\_10\\_28\\_02a%0Ahttp://www.redalyc.org/pdf/495/49519702.pdf](http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/30_10_28_02a%0Ahttp://www.redalyc.org/pdf/495/49519702.pdf)
  49. Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim Reprod Sci*. 18 de agosto de 2000;62(1-3):173-93.
  50. Luz Mabel Ávila-Portillo JIMCL et al. Fundamentos de criopreservacion. *Rev Colomb Obstet Ginecol* [Internet]. diciembre de 2006 [citado 25 de enero de 2023];57. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74342006000400008](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008)
  51. Raymundo T. F, Huanca L. W, Huanca M. T, Huerta O. S, Cordero R A. Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2006;17(2):125-30.
  52. Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci*. 2005;89(1-4):105-13.
  53. Marino Terreros C, Wilfredo Huanca L, Irma Arriaga C, Antonio Ampuero B. Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* [Internet]. 2015 [citado 28 de enero de 2023];26(3):420-6. Disponible en:

[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172015000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172015000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

54. Ramón JC, Landívar SG, Pesántez JL, Rodríguez DF. Efecto de agentes crioprotectores no permeables y uno comercial sobre las características físicas de semen bovino postdescongelación. MASKANA, Producción Animal. 2017;
55. IEE. SEMINOGRAMA. EVALUACIÓN DEL SEMEN [Internet]. 2020 [citado 28 de enero de 2023]. Disponible en: <https://estudioesterilidad.com/news/seminograma-evaluacion-del-semen/>
56. Isabel Toro Montoya A. Espermograma. Medicina & Laboratorio [Internet]. 2009 [citado 28 de enero de 2023];15:145-69. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2009/myl093-4c.pdf>
57. von BAER L, HELLEMANN C. Variables seminales en llama (Lama glama) . Arch Med Vet [Internet]. 1998 [citado 28 de enero de 2023];30(2):171-6. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X1998000200019&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X1998000200019&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
58. Apaza-Callisaya BN, Loza-Murguía MG, Quispe-Paxipati CH, Machicado-Gómez RM, Achu-Nina C. Parámetros cinéticos de espermatozoides en semen fresco y crioconservado de alpaca ( Vicugna pacos L.) . Journal of the Selva Andina Animal Science. 1 de abril de 2020;7(1):17-29.
59. Ana Celeste Andrade Martins. INFLUENCIA EN LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE LA ADICIÓN DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE CRIOPROTECTORES PARA LA CONSERVACIÓN DEL SEMEN CANINO. [Madrid ]: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID ; 2005.
60. Esther Martínez, Ramos Isabel. EVALUAR LA CAPACIDAD FECUNDANTE DE ESPERMATOZOIDEOS REFRIGERADOS EN LA PRODUCCION DE EMBRIONES IN VITRO EN ALPACAS (Vicugna pacos) HUACA YA . [HUANCAVELICA]: UNIVERSIDAD NACIONAL DE HUANCAVELICA; 2015.

61. Zampini R, Castro-González XA, Sari LM, Martin A, Diaz A V., Argañaraz ME, et al. Effect of Cooling and Freezing on Llama (*Lama glama*) Sperm Ultrastructure. *Front Vet Sci* [Internet]. 28 de octubre de 2020 [citado 28 de enero de 2023];7:587596. Disponible en: [/pmc/articles/PMC7655875/](#)
62. Pariona NC, Arnedo FP, Cuya MV. Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* [Internet]. 2015 [citado 28 de enero de 2023];26(3):434-43. Disponible en: [http://dev.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172015000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://dev.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172015000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
63. Bravo PW, Alarcon V. PRESERVACIÓN DE SEMEN Y AVANCES RECIENTES EN LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE LLAMAS Y ALPACAS Semen preservation and recent advances in artificial insemination of llamas and alpacas *Spermova*. 2013; 3(2): 158-160. *Spermova* [Internet]. 2013 [citado 28 de enero de 2023]; Disponible en: <http://spermova.pe/site/files/revista2013-vol3%20No.2/158-160okok.pdf>
64. Moore AI, Squires EL, Bruemmer JE, Graham JK. Effect of cooling rate and cryoprotectant on the cryosurvival of equine spermatozoa. *J Equine Vet Sci*. 1 de mayo de 2006;26(5):215-8.
65. Javier Jesús JUÁREZ VERA. Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca [Internet]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos ; 2018 [citado 28 de enero de 2023]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/323344006.pdf>
66. MapCarta. UNIVERSIDAD TECNICA DE COTOPAXI - CAMPUS EXPERIMENTAL CEASA [Internet]. [citado 8 de agosto de 2023]. Disponible en: <https://mapcarta.com/es/N4150086518>
67. FAO. Camellos, llamas y alpacas. En: Manual para el personal auxiliar de sanidad animal primaria [Internet]. Roma ; 1995 [citado 28 de enero de 2023]. Disponible en:

<https://www.fao.org/3/t0690s/t0690s0c.htm#lecci%C3%B3n%2058:%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20edad%20de%20los%20camellos%20por%20los%20dient>

68. Incahuanaco LM, Ayala RD, Hinojosa RL, Torres EY, Huanca T, Nina A, et al. Eficiencia reproductiva de alpacas machos en relación al tamaño testicular y niveles hormonales durante época reproductiva en puna seca. *Revista de investigación Agropecuaria Science and Biotechnology*. 26 de mayo de 2021;1(2).
69. Galarza DA. EFICACIA DE DOS DILUYENTES: TRIS + LECITINA DE SOYA (ANDROMED®) Y TRIS + YEMA DE HUEVO (TRILADYL®), EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE TORO DE LA RAZA JERSEY EN CUENCA – ECUADOR [Internet]. 2013 mar. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/306012290>
70. Fernandez A, Gonzalvo M, Clavero A, Ruiz R, Zamora S, Roldan M, et al. Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *Asebir*. 2009;14(1).
71. Ahmed Tibary. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *The journal of the international goat association* . febrero de 2006;61:283-98.
72. Virgilio Alarcón B.1 WGV 2 , PWB. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE ALPACAS CON SEMEN COLECTADO POR ASPIRACIÓN VAGINAL Y VAGINA ARTIFICIAL. *Rev Inv Vet Perú* [Internet]. 2012 [citado 30 de julio de 2023];23:58-64. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v23n1/a07v23n1.pdf>
73. DELGADO P, FF, FR, GV, ME, CS y MJ. Técnicas de colección de semen en llamas. III Congreso mundial de camélidos. 2003.

## 15. ANEXOS

### ANEXOS 1. Aval de traducción



### *AVAL DE TRADUCCIÓN*

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“EXTRACCIÓN Y CRIOCONSERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACAS EN EL CENTRO EXPERIMENTAL ACADÉMICO SALACHE DEL CANTÓN LATACUNGA”** presentado por: **Jorge Alcides Molina Panchi y Joel Alejandro Segovia Villacis**, egresados de la Carrera de Medicina Veterinaria, perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizaron bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a los peticionarios hacer uso del presente aval para los fines académicos legales

Latacunga, 29 de agosto del 2023

Atentamente,



firmado electrónicamente por:  
BLANCA GLADYS  
SANCHEZ AVILA



CENTRO  
DE IDIOMAS

**MSc. Blanca Gladys Sánchez A.**  
**DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC**  
**CI: 2100275375**

## ANEXO 2. Hoja de vida docente tutor

## HOJA DE VIDA

DATOS PERSONALES

APELLIDOS: GARZON JARRIN  
 NOMBRES: RAFAEL ALFONSO  
 ESTADO CIVIL: CASADO  
 CEDULA DE CIUDADANIA: 0501097224  
 DIRECCION DOMICILIARIA: SALCEDO: CONJUNTO HABITACIONAL SIERRA



VISTA

TELEFONO CONVENCIONAL: 032727575 TELEFONO CELULAR: 0999934497  
 CORREO ELECTRONICO: Rafael.garzon@utc.edu.ec; garzonjarrin@gmail.com  
 EN CASO DE EMERGENCIA CONTACTARSE CON: Loudes Zambonino Tlf 0987034912

ESTUDIOS REALIZADOS Y TITULOS OBTENIDOS

NIVEL	TITULO OBTENIDO	FECHA DE REGISTRO EN EL CONESUP	CODIGO DEL REGISTRO CONESUP
TERCER	Dr. Medicina Veterinaria	1005-04-492026	29- 03- 2004
CUARTO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MAGISTER EN ciencias de la educación:mención planificación y administración edutativa</li> <li>• DIPLOMADO: en didáctica de la educación superior</li> <li>• ASPIRANTE: Al PhD</li> </ul>	1020-05-587559	11-07-2005

HISTORIAL PROFESIONAL

UNIDAD ACADEMICA EN LA QUE LABORA: C.A.R.E.N.  
 CARRERA A LA QUE PERTENECE: Medicina Veterinaria  
 AREA DEL CONOCIMIENTO EN LA CUAL SE DESEMPEÑA: Cc. Humanísticas  
 Agricultura y veterinaria  
 PERIODO ACADEMICO DE INGRESO A LA UTC: octubre 1997

-----  
 FIRMA

**ANEXO 3. Hoja de vida del estudiante I****DATOS PERSONALES**

NOMBRES Y APELLIDOS:	Jorge Alcides Molina Panchi
LUGAR Y FECHA DE NACIMIEINTO:	14 de Mayo de 1997
CÉDULA DE CIUDADANÍA:	0503823858
SEXO:	Masculino
ESTADO CIVIL:	Soltero
TELÉFONO:	0983937998
E-MAIL:	<a href="mailto:jorge.molina3858@utc.edu.ec">jorge.molina3858@utc.edu.ec</a>

**PERFIL PROFESIONAL**

Escuela Isidro Ayora, Club rotario | NIVEL PRIMARIO  
2009

Colegio Nacional Primero de Abril | BACHILLERATO GENERAL UNIFICADO  
2015

**ANEXO 4. Hoja de vida del estudiante II****INFORMACIÓN PERSONAL**

**Nombres y apellidos:** Joel Alejandro Segovia Villacis

**Fecha de nacimiento:** Mayo, 15 de 1999

**Nacionalidad:** ecuatoriano

**Sexo:** Masculino

**Cedula de ciudadanía:** 0503505901

**Estado civil:** Soltero

**Número telefónico:** 0992924389

**E- mail:** joel.segovia5901@utc.edu.ec

**FORMACIÓN ACADÉMICA**

**Nivel primario:** Escuela Isidro Ayora, Club rotario

**Nivel secundario:** Colegio Nacional Primero de Abril – Título de Bachiller en Bachillerato general unificado

### **ANEXOS 5. Evaluación de aparato reproductor del Macho**



### **ANEXO 6. Separación de las alpacas machos**



### **ANEXO 7. Entrenamiento de los Alpacos**



### ANEXO 8. Ensamblaje de vagina artificial

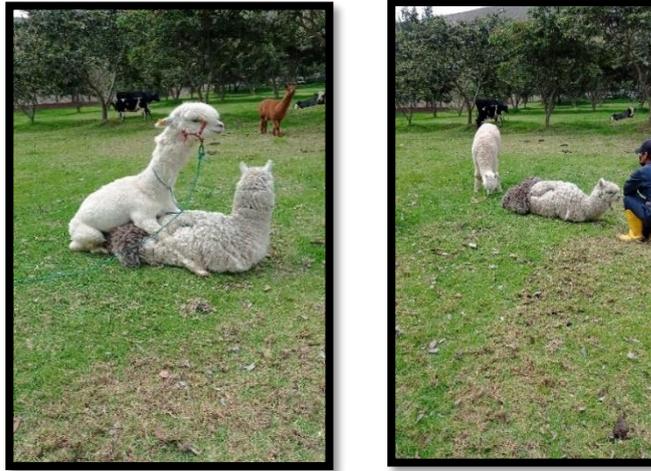


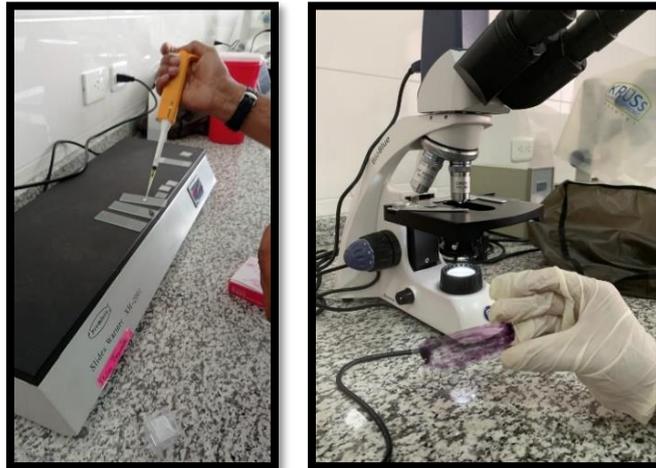
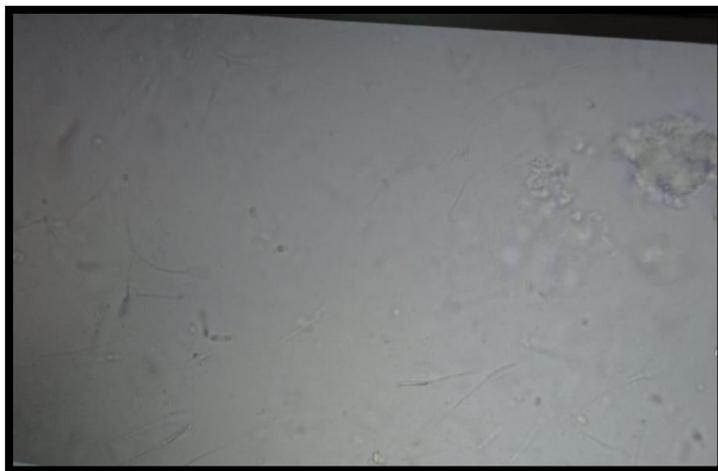
### ANEXO 9. Método de maniquí

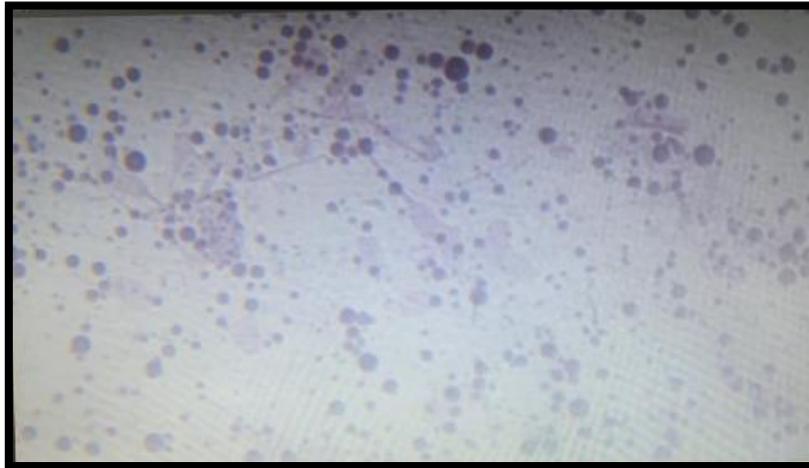
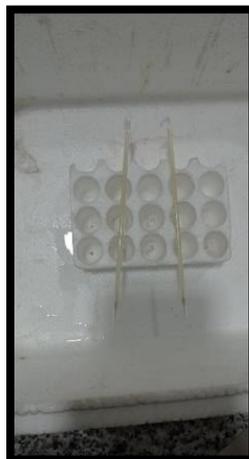


### ANEXO 10. Presentación de maniquí a la alpaca macho



**ANEXO 11. Método de maniquí de grupa más hembra receptiva****ANEXO 12. Muestra extraída con grupa.** (Se tuvo el inconveniente que terminaba a los alrededores)**ANEXO 13. Método de desviación del pene**

**ANEXO 14. Obtención de muestra con método de desvío de pene****ANEXO 15. Evaluación espermática con semen fresco****ANEXO 16. Observación macroscópica con lente 40X**

**ANEXO 17. Observación de espermatozoides con eosina****ANEXO 18. Mezcla 1:1 de diluyente y semen fresco****ANEXO 19. Crioconservación y elaboración de pajuelas**

**ANEXO 20. Evaluación post descongelamiento se semen con diluyente**

