



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

## ESCUELA DE POSGRADO

### DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL



#### TESIS

**CALIDAD SEMINAL, BACTERIOLÓGICA Y FERTILIDAD DEL SEMEN  
FRESCO COLECTADO POR EL MÉTODO POSCÓPULA EN ALPACAS  
HUACAYA (*Vicugna pacos*)**

**PRESENTADA POR:**

**NILTON MARCIAL CARDENAS SUAREZ  
PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:  
DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL**

**PUNO, PERÚ**

**2023**

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

**CALIDAD SEMINAL, BACTERIOLÓGICA Y FERTILIDAD DEL SEMEN FRESCO COLECTADO POR EL MÉTODO POSCÓPULA EN A**

AUTOR

**NILTON MARCIAL CARDENAS SUAREZ**

RECuento DE PALABRAS

**18825 Words**

RECuento DE CARACTERES

**102827 Characters**

RECuento DE PÁGINAS

**87 Pages**

TAMAÑO DEL ARCHIVO

**5.7MB**

FECHA DE ENTREGA

**Dec 21, 2023 2:23 PM EST**

FECHA DEL INFORME

**Dec 21, 2023 2:24 PM EST**

● **16% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base c

- 16% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 5% Base de datos de trabajos entregados
- 5% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossr

● **Excluir del Reporte de Similitud**

- Material bibliográfico
- Material citado
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)



*Dr. Pedro Ubaldo Coila Anasco*  
Dr. Pedro Ubaldo Coila Anasco  
CMVP:2842

Resumen



# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

## ESCUELA DE POSGRADO

### DOCTORADO EN CIENCIA ANIMAL

#### TESIS

**CALIDAD SEMINAL, BACTERIOLÓGICA Y FERTILIDAD DEL SEMEN  
FRESCO COLECTADO POR EL MÉTODO POSCÓPULA EN ALPACAS  
HUACAYA (*Vicugna pacos*)**



#### PRESENTADA POR:

**NILTON MARCIAL CARDENAS SUAREZ**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:**


**DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL**

APROBADA POR EL JURADO SIGUIENTE:

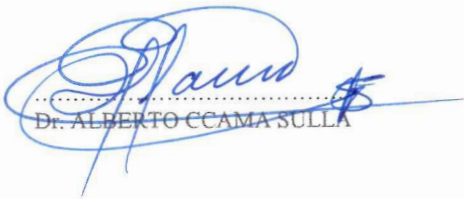
PRESIDENTE

  
.....  
Dr. LUIS VICENTE OLIVERA MAROCHO

PRIMER MIEMBRO

  
.....  
D. Sc. DOMINGO ALBERTO RUELAS CALLOAPAZA

SEGUNDO MIEMBRO

  
.....  
Dr. ALBERTO CCAMA SULLÁ

ASESOR DE TESIS

.....  
Dr. JULIO MALAGA APAZA

Puno, 24 de julio de 2023

**ÁREA:** Reproducción Animal

**TEMA:** Calidad seminal y fertilidad de semen poscópula

**LÍNEA:** Reproducción de alpacas



## DEDICATORIA

*Con amor, a mi esposa Magnolia Moreno e hijos Therryus y Jheray que son mi motivación y razón de seguir creciendo profesionalmente y ser una persona útil en la sociedad.*

*Con eterna gratitud a mis padres Marco Cárdenas y Roberta Suarez que son ejemplo de trabajo, superación y por su apoyo incondicional para culminar mis estudios.*

*Con cariño a mi suegro Luis Moreno por su permanente apoyo moral y orientaciones para el logro de mis objetivos y crecimiento profesional.*

*A mis hermanos Marco, Carlos y Nury por sus constantes muestras de aliento para el logro de mis estudios y a mi hermano Edwin que fue ejemplo de superación.*



## AGRADECIMIENTOS

*Al proyecto de investigación aplicada 053-2018-FONDECYT/BM. "Mejorar la técnica de inseminación artificial con semen fresco para incrementar los parámetros reproductivos y productivos en alpacas"*



## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1

### **CAPÍTULO I**

#### **REVISIÓN DE LITERATURA**

1.1. Marco teórico	3
1.1.1. Características reproductivas de la alpaca hembra	3
1.1.1.1. Fisiología reproductiva de la alpaca hembra	3
1.1.1.1.1. Pubertad de la alpaca hembra	3
1.1.1.1.2. Ciclo folicular	4
1.1.1.1.3. Ovulación	5
1.1.1.1.4. Fertilización	6
1.1.1.2. Características reproductivas de la alpaca macho	7
1.1.1.1. Fisiología reproductiva de la alpaca macho	7
1.1.1.1.1. Pubertad de la alpaca macho	7
1.1.1.1.2. Estacionalidad	8
1.1.1.1.3. Comportamiento sexual y cópula	8
1.1.3. Colección de semen	10
1.1.4. Parámetros macro y microscópicos del semen de alpaca	11
1.1.5. Licuefacción del semen	13
1.1.6. Bacteriología en semen de camélidos	15
1.1.7. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos	15
1.2. Antecedentes	17

### **CAPÍTULO II**

#### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

2.1. Identificación del problema	21
	iii



2.2. Enunciados del problema	22
2.3. Justificación	22
2.4. Objetivos	24
2.4.1. Objetivo general	24
2.4.2. Objetivos específicos	24
2.5. Hipótesis	24
2.5.1. Hipótesis general	24
2.5.2. Hipótesis específicas	24
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1. Lugar de estudio	26
3.2. Población	26
3.3. Muestra	27
3.4. Método de investigación	27
3.5. Descripción detallada de métodos por objetivos específicos	28
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1. Calidad seminal	40
4.2. Aislamiento e identificación bacteriana a nivel del prepucio, vagina y semen colectado por los métodos electroeyaculación, vagina artificial y poscópula	43
4.3. Tasa de fertilidad en alpacas	48
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53
ANEXOS	61



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
1. Parámetros macroscópicos del semen de alpaca	13
2. Parámetros microscópicos del semen de alpaca	13
3. Tasa de fertilidad por inseminación artificial en alpacas y llamas	17
4. Características de las variables macro y microscópicas del semen fresco colectados por los métodos poscópula, vagina artificial y electroyacuación	41
5. Bacterias identificadas a nivel del prepucio y vagina de alpacas	44
6. Bacterias identificadas en semen de alpaca colectados por los métodos electroyacuación, poscópula y vagina artificial	45
7. Determinación cuantitativa de la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC/ $\mu$ l) en semen de alpaca colectados por los métodos electroyacuación, poscópula y vagina artificial	47
8. Tasa de fertilidad en alpacas huacaya por inseminación artificial con semen fresco colectado por el método poscópula	48



## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
1. Identificación de bacterias aerobias del prepucio de alpacas huacaya	61
2. Identificación de bacterias aerobias de vagina de alpacas huacaya	62
3. Recuento de bacterias del semen colectado por el método poscópula en alpacas huacaya	63
4. Recuento de bacterias del semen colectado por el método vagina artificial en alpacas huacaya	64
5. Recuento de bacterias del semen colectado por el método electroeyaculación en alpacas huacaya	65
6. Inseminación artificial en alpacas a 24 horas post inducción de ovulación	66
7. Inseminación artificial en alpacas a 26 horas post inducción de ovulación	67
8. Inseminación artificial en alpacas a 28 horas post inducción de ovulación	68
9. Inseminación artificial en alpacas a 30 horas post inducción de ovulación	69
10. Materiales de colección de semen para el método electroeyaculación	70
11. Materiales de colección de semen para el método vagina artificial	70
12. Materiales de colección de semen para el método poscópula	71
13. Evaluación ecográfica del útero, ovarios y tamaño folicular	72
14. Evaluación ecográfica del tamaño y ubicación del folículo preovulatorio	73
15. Limpieza y desinfección del prepucio para la colección de semen del método electroeyaculación	74
16. Colección de semen por el método electroeyaculación	75
17. Evaluación de los parámetros reproductivos del semen con el Sis. CASA SCA®	76
18. Inseminación artificial en alpacas con semen fresco	77

## RESUMEN

En alpacas existe discrepancias en los valores de los parámetros seminales y presencia de bacterias en semen colectados por diferentes métodos y la hora adecuada a inseminar, por ello, se planteó el objetivo de evaluar la calidad seminal y bacteriológica del semen colectados por los métodos poscópula (PC), vagina artificial (VA) y electroeyaculación (EE) y determinar la fertilidad en alpacas huacaya inseminadas con semen fresco de poscópula a diferentes horas post inducción de ovulación. La obtención de muestras de semen e inseminación, se realizó en el C.E. La Raya de la UNSAAC y la evaluación seminal en los Laboratorios de Reproducción y Microbiología de la FMV de la UNMSM. El semen colectado por el método PC presentó mayor motilidad  $69.1 \pm 2.3\%$ , viabilidad  $82.8 \pm 1.3\%$ , HOST+  $77.9 \pm 1.3\%$ , integridad acrosomal  $85.2 \pm 1.3\%$  y volumen  $2.9 \pm 1.8$  ml; en viscosidad fue mayor del semen de VA seguido de EE y PC. Las bacterias aisladas del prepucio, vagina y del semen de los métodos PC, VA, EE fueron *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Nocardia sp*, *Bacillus sp* y *Micrococcus sp* y la tasa de fertilidad obtenido fue 45, 50, 35 y 30% a las 24, 26, 28 y 30 horas respectivamente. Se concluye, que hay diferencia entre las variables de calidad seminal y presencia de bacterias, no existiendo similitud en número ni en carga bacteriana en el semen de los tres métodos y la mejor hora para inseminar es a las 26 horas post inducción de ovulación.

**Palabras clave:** Alpaca, bacteriología, calidad seminal, inseminación artificial, métodos de colección de semen, semen.



## ABSTRACT

In alpacas there are discrepancies in the values of the seminal parameters and the presence of bacteria in semen collected by different methods and the appropriate, time to inseminate, the objective of evaluating the seminal and bacteriological quality of semen collected was done by post copulation (PC) methods, artificial vagina (VA) and electroejaculation (EE) and determine fertility in huacaya alpacas inseminated with fresh post copulation semen at different hours post ovulation induction. Semen samples and insemination were obtained at the C.E. The Raya of the UNSAAC and the seminal evaluation in the Reproduction and Microbiology Laboratories of the FMV of the UNMSM. The semen collected by the PC method presented higher motility  $69.1 \pm 2.3\%$ , viability  $82.8 \pm 1.3\%$ , HOST+  $77.9 \pm 1.3\%$  acrosomal integrity  $85.2 \pm 1.3\%$  and volume  $2.9 \pm 1.8$  ml; in viscosity it was higher in VA semen followed by EE and PC. The bacteria isolated from the foreskin, vagina and semen from the PC, VA, EE methods were *Streptococcus sp*, *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Nocardia sp*, *Bacillus sp* *Micrococcus sp* the fertility rate obtained was 45, 50, 35 and 30% and 24, 26, 28 and 30 hours respectively. As a conclusion, there is a difference between the variables of semen quality and presence of bacteria, there being no similarity in number or bacterial load in the semen of the three methods and the best time to inseminate is 26 hours post ovulation induction.

**Keywords:** Alpaca, bacteriology, seminal quality, artificial insemination, semen collection methods, semen.

## INTRODUCCIÓN

La aplicación de las biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos se viene utilizando en diferentes programas de mejoramiento genético, con limitados resultados; aún hay problemas en la evaluación de la calidad seminal; por las características propias del semen como la alta viscosidad, baja motilidad, baja concentración, baja viabilidad entre otros, dependiendo del método de colección de semen; por ello, es importante estandarizar los valores de las variables de calidad seminal con el uso del Sistema CASA SCA ® (Computer Asisted Sperm Analysis System), es un equipo automático, objetivo y estandarizado, para la evaluación de los parámetros seminales.

Existe poca información de la presencia de bacterias a nivel del prepucio, vagina y de semen colectados de los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación, es importante conocer las bacterias residentes propias de estos órganos y del semen, porque permitirá utilizar antibióticos específicos durante la dilución y poder controlar el deterioro de los espermatozoides, disminución de la fertilidad del semen y la transmisión de enfermedades reproductivas.

No hay un método estandarizado de colección de semen en alpacas, que cumpla las especificaciones técnicas necesarias para utilizar el semen fresco, refrigerado o congelado en biotecnologías reproductivas, cada método tiene ventajas y desventajas en la manipulación del semen. Por tal motivo, se desarrollaron diversas técnicas y métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos, la electroeyaculación, en alpacas mostró mucha variabilidad entre machos y aún entre el mismo animal, variando de una colección a otra, además se obtuvo semen muy diluido con presencia de secreciones de las glándulas anexas y baja concentración espermática (Pacheco, 2008), otro método, la vagina artificial muy utilizado en vacunos y ovinos, se tuvo que adecuar una vagina artificial de ovinos e incorporarle una frazadilla eléctrica para mantener una temperatura adecuada durante el tiempo de cópula y colocada a un maniquí que asemeja a una alpaca en posición de cópula, que mejoró la técnica de colección, pero el semen colectado es muy viscoso que dificulta la dilución (Alarcón *et al.*, 2012; Garnica *et al.*, 1993). También, se realizó la colección de semen por el método poscópula, que es una técnica simple, que requiere de una hembra receptiva al macho y un proctoscopio, pero el semen colectado es una mezcla de fluidos vaginales y uterinos, que posiblemente se encuentre contaminado con mayor número de bacterias. Por ello, la importancia de esta

investigación de utilizar el método de colección de semen poscópula, por su facilidad de colección y también el semen es de baja viscosidad y manejable durante la dilución. Así mismo, se realizó la inseminación artificial en alpacas huacaya para evaluar la fertilidad a diferentes horas post inducción de ovulación y determinar a cuantas horas post inducción de ovulación se debe inseminar en alpacas.

La presente investigación se encuentra dentro del área de estudio de la biotecnología reproductiva, del doctorado de ciencia animal, que nos permite conocer la calidad seminal, las bacterias presentes a nivel del prepucio, vagina y en el semen obtenido por los métodos de vagina artificial, electroeyaculación y poscópula en alpacas huacaya y la hora adecuada post inducción de ovulación, para inseminar artificialmente con semen fresco; los resultados de la investigación contribuirá al desarrollo de programas de mejoramiento genético en alpacas a nivel local, regional y nacional.

Esta investigación primeramente, muestra el resumen en español e inglés, seguidamente se da una introducción al tema en estudio, luego se detalla la revisión de la literatura con el marco teórico, que sustenta con conocimientos previos de la investigación y antecedentes referentes al tema en estudio, luego definimos el planteamiento del problema, la hipótesis y los objetivos, además se especifica los materiales y métodos utilizados en la presente investigación, para presentar los resultados y discusiones con otros autores, finalmente terminamos con las conclusiones y recomendaciones de acuerdo a los objetivos específicos planteados en la presente investigación y finalmente en anexos se considera los actuados y evidencias de la ejecución de la investigación.

## CAPÍTULO I REVISIÓN DE LITERATURA

### 1.1. Marco Teórico

#### 1.1.1. Características reproductivas de la alpaca hembra

##### 1.1.1.1. Fisiología reproductiva de la alpaca hembra

###### 1.1.1.1.1. Pubertad de la alpaca hembra

Las alpacas de buena condición cárnica, alimentadas en praderas de pastos naturales y cultivados de buena calidad nutricional, y generalmente criadas en zonas de puna húmeda la actividad ovárica inicia a los diez meses de edad aproximadamente, cuando los ovarios muestran folículos de tamaño  $\geq 5$  mm de diámetro (Pacheco *et al.*, 2017; Sumar y Garcia, 1986).

La pubertad criadas en zonas alto andinas propias de la crianza de camélidos sudamericanos las alpacas, inician a los 12 meses de edad aproximadamente, con comportamientos reproductivos similares a una alpaca adulta, mostrando conducta sexual, aceptación al macho, tasa de fertilidad y sobrevivencia embrionaria, por lo que, alpacas hembras servidas de 12 a 13 meses de edad, con pesos mayores a 33 Kg, se comportan reproductivamente igual a las hembras adultas, pero los productores alpaqueros acostumbran iniciar el empadre a las hembras primerizas recién a los dos años de edad, cuando alcanzan generalmente el 100% de su crecimiento y desarrollo corporal, debido, a la falta de pastos naturales de buena calidad nutritiva en sus

comunidades y predios, esto se presenta por el sobre pastoreo y en zonas denominadas puna seca y la falta de introducción de pastos cultivados de buena calidad nutricional, que está comprobado que prosperan en altitudes donde se crían alpacas y llamas, también por un inadecuado manejo técnico, sanitario y alimentación (Sumar y Garcia, 1986).

#### **1.1.1.1.2. Ciclo folicular**

Las alpacas y llamas de sexo hembra que no están juntas al macho, desarrollan ondas foliculares sucesivas y se desarrolla en tres fases, donde en un momento determinado un grupo de folículos son reclutados y de ellos, solo uno es seleccionado e inicia con la siguiente fase de crecimiento, diferenciándose hasta alcanzar el tamaño ovulatorio de  $\geq 7$  mm de diámetro y los demás folículos que no fueron seleccionados inician la fase de regresión (Bravo *et al.*, 1990; Brown, 2000; Fernández-Baca, 1993).

El reclutamiento de un grupo de folículos generalmente se encuentran entre 2 a 3 mm de diámetro, estos folículos inician a crecer hasta un diámetro de 4 a 5 mm aproximadamente, donde en esta fase ocurre la desviación folicular, y así mismo, se ocurre la selección de un folículo dominante y la regresión del resto de los folículos subordinados (Adams *et al.*, 2005).

En otros estudios en alpacas, la tasa de crecimiento folicular reportan que durante los 10 primeros días después de la aparición de una nueva onda folicular es constante el crecimiento folicular de  $1.0 \pm 0.3$  mm/día (Vaughan, 2011; Vaughan *et al.*, 2004).

El largo de una onda folicular en camélidos sudamericanos dura en promedio 13.8 días, para la fase de crecimiento  $4.8 \pm 1.5$  días; de maduración  $5 \pm 1.6$  días y para la fase de regresión  $4.0 \pm 1.1$  días (Bravo *et al.*, 1990); mientras que Adams *et al.* (1990) determinaron mayor tiempo del largo de la onda folicular de 20 a 25 días; mientras Aba *et al.* (2000) establecieron el largo de la onda en  $22.6 \pm 2.5$  días;

siendo la fase de crecimiento desde 3 mm a su máximo diámetro de  $9.2 \pm 2.8$  mm/días; la maduración que es la permanencia alrededor del máximo diámetro de  $5.2 \pm 1.4$  días y la regresión o diámetros decrecientes de  $8.2 \pm 2.2$  días.

En alpacas se tiene conocimiento que los folículos en en la fase de crecimiento son capaces de ovular cuando alcanzan o llegan a 7 mm de diámetro (Vaughan *et al.*, 2003). También, reportan que el tiempo óptimo de servicio con el macho es de 6 a 8 días después de la aparición de una nueva onda folicular (Adams, 1989)

En alpacas, los folículos en crecimiento alcanzan el tamaño de 8 mm de diámetro en un tiempo promedio de 10.8 días y el crecimiento de un folículo ovárico de 3 mm a 8 - 12 mm puede ser alcanzado en una alpacas adulta en un tiempo de 4 a 5 días y así mismo, los folículos permanecen en estado de madurez por un tiempo aproximado de 4 a 5 días y la fase de regresión se presenta en promedio de 4 días y el intervalo entre dos ondas foliculares varía de 10 a 12 días aproximadamente en alpacas (Bravo, 1994).

La actividad ovárica en alpacas no presenta diferencia cuando se toma en cuenta los dos ovarios, ambos ovarios son funcionales tan igual que en otras especies, siendo el ovario derecho ligeramente más activo que el izquierdo (Sumar y Garcia, 1986).

#### **1.1.1.1.3. Ovulación**

Las alpacas no presentan ciclos estrales durante la estación reproductiva, los camélidos presentan ondas foliculares permanentemente y en ausencia de macho, las alpacas hembras permanecen en un estado de celo continuo pero sin signos de comportamiento de celo como en otras especies, y esto puede durar unos 28 días e incluso llegar a los 36 días, con intervalos cortos de rechazo al macho y que puede durar hasta 48 horas y la ovulación es inducida en los camélidos sudamericanos y ocurre aproximadamente



a las 26 horas después del estímulo coital y por el sonido gutural del macho (Sumar y Garcia, 1986).

En alpacas, la ovulación puede ser inducida por la aplicación de hormonas, como la hormona gonadotrópica (GnRH) (García *et al.*, 2017; Mamani, *et al.*, 2013), la hormona gonadotrópica coriónica humana (hCG), con dosis que varían desde 10 a 1600 U.I. produciéndose la ovulación a las 24 horas (Hafez y Hafez, 2002; Sumar y Garcia, 1986). También, en dos artículos reportan la aplicación del plasma seminal por vía intra muscular, para inducir la ovulación, con resultados similares la hormona análoga a la GnRH tanto en alpacas y llamas (Adams, *et al.*, 2005; Mamani, *et al.*, 2013).

Hay alpacas que no logran ovular a la estimulación de la monta natural, pueda ser atribuida a una baja sensibilidad de los folículos a los niveles circulantes de LH debido a las variaciones en los estadios de maduración folicular (Fernández-Baca, 1993).

En alpaca y llamas la ovulación está vinculado al plasma seminal a un factor inductor de la ovulación (OIF) presente en el semen de los camélidos, esta molécula presenta propiedades biológicas y químicas que se le denominó como  $\beta$ -Nerve Growth Factor ( $\beta$ -NGF), donde la alta concentración de OIF/ $\beta$ -NGF en el plasma seminal produce un efecto sobre la función ovárica de acción endocrino generando importantes consecuencias fisiológicas y reproductivas, desafiando a la corriente de estudios que sustenta que la ovulación es inducida por acción mecánica de la cópula del macho (Chen *et al.*, 1985; Silva *et al.*, 2020).

#### **1.1.1.1.4. Fertilización**

Cuando el macho realiza la monta adecuadamente y por un tiempo no menor a 15 minutos y en la hembra a las 26 horas posteriores se produce la ovulación, el porcentaje de fertilización por lo general es mayor de 80%, las etapas que siguen a la fertilización, como la migración uterina a través del cuerno derecho al izquierdo, durante los

primeros 30 días siguientes a la fertilización, siendo la etapa más crítica de mortalidad embrionaria, puesto que en este periodo se presenta el mayor porcentaje de muertes embrionarias y la implantación ocurre dentro de los primeros 21 días que siguen a la fertilización (Sumar y Garcia, 1986). El porcentaje de preñez es variable, depende del método utilizado, en empadre tradicional donde permanecen machos y hembras durante todo el año sobre todo a nivel de comunidades alpaqueras, pequeños y medianos productores se obtienen porcentajes bajos de fertilidad y natalidad de 50 y 40% respectivamente y en empadre dirigido y controlado donde se seleccionan previamente a los machos y hembras formando grupos de empadre y se toma registro del día, del macho y de la hembra que se están empadrando en este método el porcentaje de natalidad se incrementa a unos 70 a 85% (FAO, 1996).

## **1.1.2. Características reproductivas de la alpaca macho**

### **1.1.2.1. Fisiología reproductiva de la alpaca macho**

#### **1.1.2.1.1. Pubertad de la alpaca macho**

La pubertad ocurre cuando el macho se encuentra en la capacidad de producir espermatozoides aptos para la fertilización (Hafez y Hafez, 2002). Aproximadamente, inicia a los 12 meses de edad, los testículos deben estar descendidos al escroto y en los túbulos seminíferos comienza la espermatogénesis, algunos autores señalan que se inicia en algunas alpacas a los 16 meses y en otras hasta los 26 meses, esto también dependerá del desprendimiento de la adherencia pene-prepucial en los machos que es bastante variable y que tiene relación directa con la heredabilidad (Sumar y Garcia, 1986).

Conforme los machos alcanzan la adultez, los testículos aumentan de tamaño y los niveles de testosterona en sangre también se incrementan aproximadamente hasta los 20 meses de edad en la mayoría de alpacas y la variación del tamaño testicular a distintas edades esta influenciada

de factores, como la genética (Hafez y Hafez, 2002; Sumar y Garcia, 1986).

#### **1.1.2.1.2. Estacionalidad**

Las alpacas son consideradas de actividad reproductiva estacional en condiciones propias de la crianza de camélidos sudamericanos en praderas con pastos naturales y que tiene lugar entre los meses de diciembre a abril, donde hay presencia de lluvias frecuentes, rebrote de pasto verde succulento con mayor nutrientes, se incrementa la temperatura ambiental creando un microclima más benigna, donde los machos presenta un comportamiento más activo y paulatinamente va incrementando la libido a inicios de la época reproductiva en el mes de diciembre, pero realmente los camélidos sudamericanos no son reproductivamente estacionales y los machos, son capaces de producir semen y eyaculados fértiles durante todo el año, pero al igual que en otras especies domésticas estacionales, la calidad del semen, así como la libido, se ven influenciados por la estación y los meses del año y por la disponibilidad de alimento succulento con mayores nutrientes (Sumar y Garcia, 1986).

#### **1.1.2.1.3. Comportamiento sexual y cópula**

La alpaca macho en edad reproductiva, muestra un comportamiento activo y en ocasiones agresiva durante la época de apareamiento durante los meses de diciembre a marzo e incluso el mes de abril, en comunidades campesinas alpaqueras, en pequeños y medianos criadores de alpacas donde no realizan un empadre controlado se impone la dominancia de los machos más fuertes y solo empadran estos macho que generalmente son los de mayor edad y pocos machos jóvenes, tienen la oportunidad de empadran a una hembra, mientras las alpacas hembras son de actitud pasiva cuando se encuentren vacías o no estén preñadas adoptando la posición de cópula de cubito ventral cuando el macho la intenta montar (Hafez y Hafez, 2002).

La actividad sexual durante la época de empadre, las alpacas machos cuando se las expone a las hembras dentro de un mismo hatu los primeros días hasta las primera semana, la libido de los macho es muy activa empadrando con mucha frecuencia con alrededor de 70% de montas a hembras, al menos una vez a cada hembra, hasta que los machos se muestran agotados y pierden paulatinamente la libido sexual y dejan de intentar montar a las hembras y es necesario cambiar con otros machos descansados (Sumar y Garcia, 1986). Posteriormente, la actividad sexual decrece a pesar de la presencia de hembras receptivas, pero después de cambiar los machos, el empadre se reactiva alcanzando niveles comparables como los de la primera semana (Sumar, 1996; Sumar y Garcia, 1986).

El comportamiento sexual de los camélidos sudamericanos machos, se divide en dos fases: cortejo y cópula (Sumar y Garcia, 1986). El cortejo empieza con el macho persiguiendo activamente a las hembras receptivas e intentando montarlas, luego la hembra en celo y receptiva acepta al macho y toma la posición de cúbito ventral y el macho inicia la cópula por varios minutos (Brown, 2000).

El proceso de la cópula en los camélidos sudamericanos es intrauterino e intracornual donde el pene y prepucio ingresan hasta los cuernos uterinos y empiezan a realizar movimientos semi rotativos, con la finalidad de dañar las paredes del endometrio uterino y constantemente van depositando el semen e intercaladamente en ambos cuernos uterinos derecho e izquierdo con leves movimientos de empuje y el prepucio va lacerando las paredes endometriales; así mismo, el macho realiza un sonido gutural característico y la duración de la cópula es determinada por el macho puede darse de 5 a 50 minutos, pero es recomendable que el tiempo mínimo de cópula debe ser 10 minutos, para garantizar la fertilidad de la alpaca hembra, así mismo no es recomendable tiempos muy prolongados de cópula, por que estaría dañando las paredes endometriales del útero y que podría causar daño y hemorragias (Alarcón *et al.*, 2012; Sumar y Garcia, 1986).

### 1.1.3. Colección de semen

Los camélidos sudamericanos domésticos presentan características reproductivas muy peculiares, como la posición en el apareamiento, que es de decúbito ventral, la deposición del semen es a nivel uterina e intracornual, el tiempo de cópula es prolongado de 5 a 50 minutos aproximadamente, que dependerá de la condición física y frecuencia de cópulas de los machos; por ello, la colección de semen presenta dificultades; como el tiempo de cópula, que es de mayor tiempo en comparación a otras especies domésticas, la posición de la hembra que es de cúbiteo ventral y el macho se posiciona encima de la hembra por un tiempo prolongado, el lugar de depósito del semen es intrauterina e intracornual, el tipo de eyaculación es continuo o permanente y sobre todo el semen es de elevada viscosidad, que dificulta su evaluación para ver la calidad de los parámetros seminales y para el proceso de la dilución; por estas y otras dificultades propias de los camélidos sudamericanos, se requiere realizar más estudios de investigación en biotecnología reproductiva en camélidos sudamericanos para encontrar una técnica óptima de coleccionar semen y manejar los espermatozoides sin que estos pierdan su capacidad fecundante (Sumar y Garcia, 1986).

Los reportes sobre métodos de colección son diversos, desde el primer reporte de Mogrovejo, quien colectó semen de alpacas utilizando una funda de látex colocada intravaginalmente; San Martín utilizó esponjas vaginales; otro método de colección de semen fue por medio de una fístula en la uretra peniana (Pacheco, 2008), Fernández-Baca y Calderón colectaron semen por el método de electroeyaculación en alpacas; posteriormente, se reporta el uso de una vagina artificial adecuada de ovino con una simulación de una cervix y posteriormente se adicionó el uso de un maniquí y para mantener la temperatura por varios minutos se envolvió con bolsas de agua caliente (Sumar y Garcia, 1986). Años después, se adecuó una frazadilla eléctrica que permitió mantener una temperatura constante por el tiempo que dura el proceso de eyaculación en alpacas (Bravo *et al.*, 1997). Posteriormente, se utilizó el método de colección de semen poscópula que es una técnica práctica y fácil de realizar, no requiere de equipos sofisticados, solo una alpaca receptiva al macho, libre de enfermedades reproductivas y una vez terminada la monta natural con el macho, se procede a coleccionar el semen con un proctoscópio esterilizado y un tubo colector, que se introduce cuidadosamente a la vagina y levantando un poco el tren

anterior y por gravedad se colecta los restos de semen y fluidos que quedan a nivel de vagina, cérvix y útero (Alarcón *et al.*, 2012).

#### **1.1.4. Parámetros macro y microscópicos del semen de alpaca**

El eyaculado de semen de los camélidos está caracterizado, por un reducido volumen y baja concentración de espermatozoides, comparado con otros animales domésticos de producción, los parámetros como volumen, color, motilidad, concentración espermática, vitalidad y morfología son altamente variables entre machos, el semen de alpacas y llamas no es fraccionado, por tanto la calidad del semen es uniforme desde el comienzo hasta el final de la copula (Hafez y Hafez, 2002). Las características físicas y biológicas del semen de camélidos sudamericanos también varían dependiendo del método de colección, la libido del macho, temperatura ambiental y época reproductiva (Tibary y Vaughan, 2006).

El color del semen de las alpacas ha sido descrito como blanco lechoso a blanco cristalino colectado por vagina artificial (Hafez y Hafez, 2002), rojo claro a rojo oscuro colectado por el método poscópula (García y Alarcón, 2019). Aunque, el color del semen de alpacas y llamas depende de la concentración espermática y la proporción de la secreción de las glándulas sexuales accesorias (Tibary y Vaughan, 2006).

Una de las características físicas del semen de camélidos sudamericanos de importancia es la alta viscosidad, la que dificulta su manipulación durante los procedimientos en el laboratorio para determinar parámetros seminales, como concentración espermática, motilidad y la dificultad de mezclar el semen con el dilutor (Garnica *et al.*, 1993; Kershaw-Young y Maxwell, 2012; Tibary y Vaughan, 2006). El grado de viscosidad, la baja concentración de espermatozoides y el alto porcentaje de anormales varía entre machos, así mismo, la contaminación de microorganismos patógenos presentes en el semen depende del método de colección (Fernández-Baca, 1993; Kershaw-Young & Maxwell, 2012).

El volumen de eyaculado en alpacas varía de 0.4 a 12.5 ml aproximadamente por colección, esto por el método de vagina artificial (Garnica *et al.*, 1993). Por lo general, el volumen es menor cuando se colecta por electroeyaculación en comparación al semen colectado por vagina artificial y poscópula, en este último,

el volumen varía demasiado de un macho a otro e incluso en el mismo macho (García y Alarcón, 2019).

El pH del semen reportados por muchos autores indican que los valores se encuentran entre la neutralidad, con ligera tendencia a la alcalinidad (Bravo *et al.*, 1997; Hafez y Hafez, 2002).

La valores de la concentración espermática del semen obtenido por el método de vagina artificial varía de 85000 a 195000 espermatozoides por ml aproximadamente en alpacas, esta diferencia es atribuida a la edad y número de eyaculaciones (Garnica *et al.*, 1995). Así mismo, estas variaciones en la concentración espermática se le atribuye al factor animal, método de colección de semen y al número de eyaculados (Hafez y Hafez, 2002; Sumar y Garcia, 1986).

La motilidad seminal se incrementa progresivamente cuando el eyaculado de semen va perdiendo la viscosidad a medida que pasa el tiempo o mediante la aplicación de enzimas específicas que permiten acelerar la licuefacción y mantenidas en baño maría a una temperatura de 38 °C (Bravo y Alarcon, 2013; Garnica *et al.*, 1993).

El plasma seminal de las alpacas está compuesto por secreciones de las glándulas anexas del aparato reproductor del macho, las que son secretadas hacia la uretra durante el proceso de la eyaculación, mezclándose con los espermatozoides y se conforma el semen (Hafez y Hafez, 2002; Kershaw-Young y Maxwell, 2012). Estas, secreciones contienen diversos componentes bioquímicos y minerales como cloruros, calcio, proteínas, lípidos, glucosa, fructuosa y ácido cítrico, que actúan en diferentes funciones espermáticas (Barrios *et al.*, 2000; Kershaw-Young y Maxwell, 2012). Así mismo, contiene mucopolisacáridos que contribuye a la viscosidad del plasma seminal y a nivel de los cuernos uterinos mantiene a los espermatozoides agrupados esperando a que ovule la hembra (Garnica *et al.*, 1993; Kershaw-Young y Maxwell, 2012).

Se presenta un resumen de reportes de investigaciones de las características del semen de alpacas recolectados por los métodos de vagina artificial y poscópula de las variables macroscópicas en la Tabla 1 y de las variables microscópicas en la Tabla 2.

Tabla 1

*Parámetros macroscópicos del semen de alpaca*

Método	Volumen (ml)	Color	Consistencia	Autor
VA	1.7 ± 0.2	Blanco lechoso	Viscoso	Garnica <i>et al.</i> , 1993
VA	1.4 ± 0.1			Garnica <i>et al.</i> , 1995
VA	1.5	Blanco cristalino	Viscoso	Bravo <i>et al.</i> , 1997
VA	1.8 ± 0.8	Blanco opalescente	Viscoso	Flores <i>et al.</i> , 2002
VA	1.5 ± 0.9	Blanco/Lechoso	Viscoso	Bravo y Alarcon, 2013
PC	3.6 ± 1.3	Rojizo	Ligeramente viscoso	Bravo y Alarcon, 2013
PC	2.8 ± 1.1	Rojo claro	Ligeramente viscoso	García y Alarcón, 2019

Tabla 2

*Parámetros microscópicos del semen de alpaca*

Método	Concentración (10 <sup>6</sup> /ml)	Motilidad (%)	Vitalidad (%)	HOST+ (%)	Autor
VA	8500 - 195000				Garnica <i>et al.</i> , 1993
VA	56.2	75.2	65.3		Bravo <i>et al.</i> , 1997
VA	17.6 ± 26.1				Flores <i>et al.</i> , 2002
VA	80.34 ± 25.56	69.0 ± 14.4	70.8 ± 12.7		Bravo y Alarcon, 2013
PC	75.20 ± 20.34	73.5 ± 7.9	75.3 ± 7.2		Bravo y Alarcon, 2013
PC	73.8 ± 23.8	63.1 ± 3.5	75.6 ± 3.2	51.1 ± 2.8	García y Alarcón, 2019

### 1.1.5. Licuefacción del semen

El semen de camélidos es altamente viscoso con una baja concentración de espermatozoides, la viscosidad del plasma seminal es el mayor impedimento sobre



la investigación en la crio preservación de semen y otras tecnologías de reproducción asistida (Kershaw-Young y Maxwell, 2012)

Se tiene poco conocimiento de la función de la alta viscosidad del semen de camélidos sudamericanos y se presume que crea una especie de reservorio y de capacitación de los espermatozoide del semen que puede ser importante para mantener a los espermatozoides viables dentro del útero y también, permite la espera de 24 a 26 horas que ocurre recién la ovulación post cópula (Huanca y Adams, 2007).

Garnica *et al.* (1993) evaluaron la licuefacción en forma natural, sin la utilización de ninguna enzima y encontraron un promedio de  $23 \pm 1.2$  horas donde se pierde la viscosidad, pero este tiempo es muy largo y no apoya para realizar una evaluación y manejo del semen. En otro estudio, se evaluó cuatro enzimas la colagenasa, brinolisina hialurodinasa y tripsina para ver el efecto de eliminar la viscosidad del semen de alpaca, la colagenasa eliminó la viscosidad en un 100% dentro de los 5 primeros minutos (Bravo *et al.*, 2000). En llamas utilizaron extracto de jugo de piña para bajar la viscosidad del semen (Laruta *et al.*, 2016). Giuliano *et al.* (2010), mencionan que para disminuir la filancia del plasma seminal del eyaculado, se debe incubar por 4 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en una solución de colagenasa al 0.1% o mediante una acción mecánica como la centrifugación del semen, como resultado se separa los espermatozoides del plasma seminal. En un estudio, en semen de alpacas, se utilizó la papaína y una proteasa inhibidor E-64 (L-trans-3-Carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine) que redujo la viscosidad sin afectar la viabilidad de los espermatozoides y así mismo, mejoró la tasa de motilidad posterior a la descongelación (Kershaw *et al.*, 2016).

En camellos y dromedarios realizaron un estudio para disminuir la viscosidad del semen, utilizando enzimas y papaína, donde obtuvieron resultados como el incremento de la motilidad, mayor viabilidad posterior a la descongelación, sin embargo se observó un efecto negativo en la integridad del acrosoma, habiendo daño en la integridad de la membrana de las células espermáticas, mas no así con grupo control que se utilizó ultrasonido para disminuir la licuefacción del semen, lo cual este resultado nos aclara la eficiencia de utilizar la tecnología de ultrasonido para eliminar la viscosidad del semen en camellos (El-Bahrawy *et al.*, 2017).

El semen de alpacas y llamas son altamente viscosos, que dificulta un adecuado manejo durante la dilución del semen y aunque es posible licuar el eyaculado con el uso de enzimas como la colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa o tripsina, se necesita aún más investigaciones para determinar los efectos de dichos tratamientos sobre la calidad y vitalidad del semen (Huanca y Adams, 2007).

#### **1.1.6. Bacteriología en semen de camélidos**

Se han desarrollado varios estudios en diferentes especies, que en muchos casos no se encuentra relación con el grado de fertilización y que en algunos casos se ve disminuido. Según lo mencionado por Pacheco *et al.* (2022) en alpacas a nivel de vagina y prepucio, reportaron la presencia de las bacterias *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*. Mientras que en llamas fue descrita la existencia de poblaciones bacterianas en útero y vagina de hembras vacías y preñadas (Jimenez, 2016), así mismo, este mismo autor reporta la presencia de poblaciones bacterianas en prepucio de machos. En un estudio en llamas, en semen colectado mediante vagina artificial (VA) y electroeyaculación (EE) aislaron bacterias gram positivas y gram negativas, en semen obtenido por el método de vagina artificial se aislaron las bacterias: *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Proteus sp*, *Streptococcus sp*, *Enterococcus sp*, *Gardnerella sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Morganella sp*, *Serratia sp*, y en semen colectado por el método de electroeyaculación se identificaron además de las bacterias obtenidas por el método de vagina artificial, bacterias del género *Bacillus sp* (Pezo *et al.*, 2021).

#### **1.1.7. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos**

En camélidos sudamericanos, se viene aplicando el uso de la inseminación artificial en centros de producción e investigación, como también en algunos proyectos de mejoramiento genético en alpacas a nivel regional, provincial y distrital con bajos porcentajes de fertilidad, por lo que, aún persisten problemas como la colección, dilución, congelación y descongelación de semen, que limita a porcentajes bajos de fertilidad, que no permite avanzar el mejoramiento genético en camélidos sudamericanos con biotecnologías reproductivas, su uso se encuentra limitado por ahora a la inseminación artificial con semen fresco (Huanca y Adams, 2007).

La dificultad de la colección y manejo del semen de alpacas, debido a su naturaleza viscosa propia del semen de camélidos sudamericanos, lo que dificulta el uso de dilutores comerciales y demás tratamientos para realizar la conservación del semen; sumado a esto la baja concentración de espermatozoides viables y el alto porcentaje espermatozoides anormales (Fernández-Baca, 1993).

La inseminación artificial con semen refrigerado en camélidos sudamericanos presentan resultados muy variables, así Giuliano *et al.* (2012) reportan 13% de tasa de preñez en llamas y Bravo y Alarcon (2013) reportan 50% de preñez en alpacas. Una de las posibles causas de esta variabilidad podría estar en la utilización de yema de huevo fresco como parte del diluyente en la conservación del semen (Bravo y Alarcon, 2013), por sus propiedades para estabilizar la membrana del espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000), se han realizado varios estudios de inseminación artificial con semen fresco, refrigerados y descongelado en alpacas, con resultados muy variados, que nos indica que se debe realizar más estudios de investigación, para estandarizar la técnica de inseminación artificial e incrementar la tasa de fertilidad y así masificar esta técnica y poder realizar programas de mejoramiento genético a nivel nacional, regional y local. También, reportan tasas de fertilidad superiores al 80% en alpacas, que nos indica, que la inseminación artificial en camélidos sudamericanos está resuelta, y que no sería necesario continuar con más estudios de investigación, pero cuando se replica la metodología aplicada, en condiciones propias de la crianza de los camélidos sudamericanos, continúan las dificultades y los porcentajes de fertilidad permanecen por debajo del 40%.

Se realizaron varios estudios de investigación en inseminación artificial en alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectados por varios métodos que se realizaron en diferentes años y por varios autores, con resultados que van entre 20 a 53.33% de fertilidad, como se observa un resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

*Tasa de fertilidad por inseminación artificial en alpacas y llamas*

Semen	Dilutor	Inducción de ovulación	Hembras inseminadas	Fertilidad (%)	Autor
Fresco	Tris-Ac-fructuosa	GnRH	57	20	Aller <i>et al.</i> , 1997
Refrigerado	Tris-Ac-fructuosa	GnRH	54	27.7	González <i>et al.</i> , 2011
Descongelado	Tris tamponado	hCG	160	51.5	Alarcón <i>et al.</i> , 2012
Fresco	Tris yema de huevo	GnRH	-	50	Bravo y Alarcon, 2013
Fresco	Tris, A. citrico, fructuosa	GnRH	30	33.33	Ordoñez <i>et al.</i> , 2013
Refrigerado	Tris, A. citrico, fructuosa	GnRH	31	29.03	Ordoñez <i>et al.</i> , 2013
Descongelado	Tris, A. citrico, fructuosa	GnRH	33	9.09	Ordoñez <i>et al.</i> , 2013
Fresco	Tris yema de huevo	GnRH	120	48.4	García <i>et al.</i> , 2017
Refrigerado	Tris yema de huevo	GnRH	60	31.7	García <i>et al.</i> , 2017
Fresco	Triladyl y Andromed	GnRH	30	53.33	Murillo, 2018
Refrigerado	Triladyl y Andromed	GnRH	30	43.34	Murillo, 2018
Fresco	Tris, glucosa, ácido cítrico	GnRH	200	50.5	García y Alarcón, 2019

## 1.2. Antecedentes

Los reportes sobre métodos de colección de semen son diversos, desde el primer reporte en el año de 1952 por Mogrovejo, quien reporta la colección de semen de alpacas utilizando una funda de látex colocada intra vaginalmente antes de la cópula, San Martín en el año de 1961, reporta un método de colección de semen en camélidos quien introduce trozos de esponja a nivel vaginal que cumple la función de absorber el semen, fluidos vaginales y uterinos, que quedan en la cavidad vaginal durante el tiempo de eyaculación (Pacheco, 2008). En estos dos métodos se interfiere el proceso normal de eyaculación y dan como resultado un tiempo menor de cópula y volumen de semen, así mismo, se producen movimientos continuos del macho, que no se encuentra cómodo en durante el proceso de eyaculación del semen, se presenta la formación de espuma en el semen y

sobre todo se genera daño al espermatozoide (Johnson, 1989). Ya en el siglo XX, continuaron más estudios de investigación y se reportó un método de colección de semen, por medio de una fístula uretral, pero con también con varias desventajas sobre todo en los cuidados post operatorios de los machos, y se colectan volúmenes menores sin presencia de fluidos de las glándulas accesorias y en muchos casos discapacidad del macho para colectar semen por una mala operación o post operatorio, perdiendo así un macho de buena calidad genética; también, se reportó el uso del método de electroeyaculación para la colección de semen de alpacas, que mostro gran variabilidad entre machos y aun entre el mismo animal, con desventajas como la obtención de semen muy diluido con secreciones abundantes de las glándulas anexas reproductivas y también en la mayoría de las colecciones es semen de baja concentración espermática, y el método por el uso de anestésico, sedantes y carga eléctrica es muy traumático para el macho, que posterior a la colección su recuperación es lenta y que necesita cuidados post colección (Pacheco, 2008); posteriormente se mejoró este método de colección de semen, realizando con mayor asepsia y estandarizando los estímulos eléctricos adecuados por medio un transductor de ovinos y vacunos, obteniendo buena calidad espermática en semen de llamas (Giuliano *et al.*, 2008); otra técnica de colección de espermatozoides es por desviación del conducto deferente, este semen es prácticamente puro espermatozoides provenientes del testículo y epidídimo, sin presencia de fluidos de las glándulas accesorias reproductivas las bulbouretrales y de la próstata, la cantidad colectada de espermatozoides es muy pequeña y tiene desventajas en la nutrición y capacitación de los espermatozoides, con posibles daños a nivel del acrosoma y en muchos casos los conductos deferentes se inflaman y se taponan y constantemente se requiere una nueva intervención quirúrgica (Pacheco, 2008). Posteriormente, reportan el uso de una vagina artificial, que si bien mejora la técnica de colección, aún presenta dificultades para mantener una temperatura adecuada y constante durante el tiempo de la cópula y para ello se incluyó una frazadilla térmica eléctrica que cubre toda la vagina artificial y que permite mantener una temperatura constante durante el tiempo que dura la colección de semen (Alarcón *et al.*, 2012). Luego, se incluyó el uso de un maniquí de alpaca en posición de cópula (Garnica *et al.*, 1993). Años después, se realizó la colección de semen por el método poscópula, que es una técnica simple, sin embargo, las muestras de semen obtenidas generalmente son incompletas y contaminadas con sangre, fluidos vaginales y uterinos. Así mismo, reportaron diferencias físicas del semen colectado por los métodos poscópula y vagina artificial, en la cual las variables como volumen, motilidad y el

número de espermatozoides vivos fueron superiores en el semen colectado por el método poscópula, en tanto que la concentración espermática fue mayor en el semen obtenido con vagina artificial, también, el 90% de los eyaculados colectados con vagina artificial presentaron alta viscosidad en comparación con el 10% de los eyaculados obtenidos por el método poscópula que es prácticamente semen pre-diluido (Alarcón *et al.*, 2012).

Existe mucha variabilidad en los valores de los parámetros seminales en alpacas, en semen colectado por el método de vagina artificial, en concentración espermática Bravo *et al.* (1997) reportan  $10^6/\text{ml}$  56.2, Flores *et al.* (2002)  $10^6/\text{ml}$   $17.6 \pm 26.1$  y Bravo y Alarcon (2013)  $10^6/\text{ml}$   $69 \pm 14.4$ ; en vitalidad Bravo *et al.* (1997) reportan 75.2% y Bravo y Alarcon (2013)  $70.8 \pm 12.7\%$ .

Se realizaron estudios de determinación de carga bacteriana a nivel del aparato reproductivo en alpacas machos y hembras aparentemente sanas, en un estudio de investigación en alpacas hembras se obtuvieron muestras de fluido vaginal y en machos muestras a nivel del prepucio donde lograron aislar bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Bacillus* y *Streptococcus* (Pacheco *et al.*, 2022), en otro estudio también reportaron los géneros bacterianos descritos por Tibary y Anouassi, (2001); mientras que en llamas fue descrita la existencia de poblaciones bacterianas en útero y vagina de hembras vacías y preñadas, como también presencia de poblaciones bacterianas en prepucio de machos (Jimenez, 2016). En un estudio en llamas Pezo *et al.* (2021) reportan en semen colectados por los métodos de vagina artificial y electroeyaculación poblaciones de bacterias de *Staphylococcus sp*, *Proteus sp*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp*, *Enterococcus sp*, *Klebsiella sp*, *Gardnerella sp*, *Enterobacter sp*, *Morganella sp*, *Serratia sp* y Jarvinen y Kinyon (2010) reportan en microflora prepucial de alpacas y llamas 22 géneros bacterianos y los más frecuentes fueron *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Corynebacterium*, *Arcanobacterium* y *Actinomyces*.

La biotecnología reproductiva en camélidos se viene estudiando décadas atrás, la inseminación artificial no ha sido desarrollada completamente y se requiere de más estudios, en llamas se realizaron varios estudios de inseminación artificial con semen colectado por el método de vagina artificial donde Aller *et al.* (1997) reportan 20% de fertilidad; Giuliano *et al.* (2012) reportan 75% de fertilidad y en alpacas Gonzáles *et al.* (2011) reportan 27.7% de fertilidad inseminadas con semen refrigerado; Ordoñez *et al.*



(2013) reportan 33.33% de fertilidad inseminadas con semen fresco; García *et al.* (2017) reportan 48.4% de fertilidad inseminadas con semen fresco de poscópula; Murillo (2018) reporta 53.33% de preñez en alpacas inseminadas con semen fresco colectadas por el método poscópula y García y Alarcón (2019) reportan 50.5% de fertilidad en alpacas inseminadas con semen fresco colectados por el método poscópula.

## CAPÍTULO II

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 2.1. Identificación del problema

- En alpacas no está definido los valores de las variables de los parámetros seminales, por presentar características propias de la especie, que dificultan la colección, evaluación y dilución del semen. Así mismo, la evaluación microscópica de la calidad seminal se realiza mediante pruebas clásicas y los valores reportados presentan muchas diferencias, que dificultan los trabajos de biotecnología reproductiva en alpacas.
- Existen pocos estudios de evaluación bacteriológica de la vagina, del prepucio y del semen de camélidos sudamericanos y no se conoce específicamente las bacterias residentes del aparato reproductor del macho y de la hembra en alpacas huacaya. Así mismo, en la dilución del semen para la inseminación artificial, no se están utilizando los antibióticos específicos que puedan estar afectando la calidad del semen y para prevenir infecciones del aparato reproductor de la hembra y del macho.
- Se han realizado varios estudios de inseminación artificial en alpacas, con resultados de fertilidad muy variables y aún no está definido, ha cuantas horas post inducción de ovulación se debe inseminar artificialmente, puesto que las alpacas son de ovulación inducida y para ovular requiere de un estímulo por parte del macho por el coito o por presencia de compuestos químicos en el plasma seminal o también se puede estimular la ovulación artificialmente vía la aplicación de hormonas como la GnRh comercial.



## 2.2. Enunciados del problema

- En la mayoría de los estudios de reproducción asistida en camélidos, la evaluación del semen se realizó mediante análisis seminal clásico y que desafortunadamente los valores reportados muestran mucha variabilidad y no es posible utilizar en trabajos de biotecnología reproductiva. Por ello, la utilización del Sistema CASA SCA® que es un evaluación automática, objetiva y estandarizada, para la evaluación de parámetros seminales como concentración, motilidad y vitalidad, incluso permite evaluar individualmente diferentes parámetros y su posible relación con la fertilidad.
- Existe poca información de las bacterias que se encuentran como residentes a nivel del prepucio, vagina y en semen colectado por los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación, de ahí la necesidad de aislar e identificar dichas bacterias, para realizar un adecuado manejo sanitario del semen y evitar la disminución de la capacidad fertilizante del macho e infecciones del aparato reproductor de la hembra.
- No hay un adecuado protocolo para realizar la inseminación artificial en alpacas, aún presentan dificultades, una de ellas, no se conoce a cuantas horas post inducción de ovulación se debe realizar la inseminación artificial en alpacas para alcanzar el mayor porcentaje de fertilidad, por ello, la necesidad de este estudio de inseminar artificialmente con semen colectado por el método poscópula en alpacas huacaya a las 24, 26, 28 y 30 horas post inducción de ovulación y determinar la tasa de fertilidad en cada una de estas 4 horas propuestas para el estudio de investigación.

## 2.3. Justificación

Desde décadas atrás continua la dificultad en la colección de semen en camélidos sudamericanos, se han intentado por varios métodos de colección, sin tener buenos resultados esto también por la dificultad del manejo del semen así mismo, hay mucha variabilidad de los valores reportados de los parámetros de la calidad seminal. Por ello, la necesidad de evaluar el semen colectado por los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación con un equipo moderno a la actualidad, el Sistema CASA SCA® y los valores encontrados, serán confiables y de utilidad en el manejo del semen.

Existe poco conocimiento de las bacterias presentes en el aparato reproductor de las alpacas, la presencia de microorganismos patógenos en alta carga puede provocar alteraciones en la motilidad, viabilidad, integridad de la membrana plasmática y acrosomal, presencia de aglutinaciones y la consecuente disminución de la capacidad fertilizante, diseminación de bacterias, con la consecuente endometritis y descargas vaginales (Hernández *et al.*, 2017). En alpacas y llamas, se realizaron dos estudios de evaluación bacteriológica de semen, reportando presencia de bacterias, que podría influenciar en la viabilidad reproductiva de los espermatozoides (Pacheco *et al.*, 2022; Pezo *et al.*, 2021). Por ello, se requiere de más estudios que corroboren la presencia e identificación de bacterias residentes a nivel del prepucio, vagina y en semen de alpacas colectados por tres métodos, con la finalidad de conocer las bacterias propias de estos órganos y del semen, para posteriormente realizar antibiogramas e identificar los antibióticos específicos a utilizar durante la dilución y manejo del semen en biotecnología reproductiva en alpacas.

El método de colección de semen poscópula, necesita una hembra receptiva y un macho, libres de enfermedades reproductivas, un proctoscopio y un tubo colector graduado; después de terminada la monta natural entre el macho y la hembra, se procede a colectar el semen sobrante, fluidos vaginales y uterinos a nivel vaginal (Alarcón *et al.*, 2012). El semen colectado por este método, es de baja viscosidad, manejable en términos de evaluación y adición del dilutor y puede ser utilizado a nivel de campo mediante la inseminación artificial con semen fresco, pero aún falta conocer la hora post inducción de ovulación en que se debe inseminar y obtener una mayor tasa de fertilidad.

Se justifica la presente investigación, de evaluar la calidad seminal reproductiva y bacteriológica del semen colectado por los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación y la evaluación de la fertilidad en alpacas huacaya inseminadas artificialmente con semen fresco colectado por el método poscópula a diferentes horas post inducción de ovulación en alpacas huacaya. Por ende, los conocimientos obtenidos contribuirán en la elaboración y ejecución de programas de mejoramiento genético en productores alpaqueros del país y producir reproductores de alto valor genético.

## 2.4. Objetivos

### 2.4.1. Objetivo general

Evaluar la calidad seminal y bacteriológica del semen colectado por el método poscópula, vagina artificial, electroeyaculación y determinar la tasa de fertilidad en alpacas huacaya inseminadas con semen fresco colectado por el método poscópula a diferentes horas post inducción de la ovulación.

### 2.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el volumen, color, concentración espermática, motilidad, viabilidad, integridad de membrana plasmática e integridad acrosomal de semen colectado por los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación.
- Aislar e identificar las bacterias a nivel del prepucio, vagina y del semen colectado de los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación.
- Determinar la fertilidad en alpacas huacaya inseminadas con semen fresco colectado por el método poscópula a 24, 26, 28 y 30 horas post inducción de la ovulación.

## 2.5. Hipótesis

### 2.5.1. Hipótesis general

La calidad seminal y bacteriológica del semen es variable según los métodos de colección poscópula, vagina artificial y electroeyaculación; y la tasa de fertilidad de las alpacas inseminadas con semen fresco de poscópula, variará de acuerdo a la hora de inseminación post inducción de la ovulación.

### 2.5.2. Hipótesis específicas

- La calidad seminal en alpacas varía en volumen, color, concentración espermática, motilidad, viabilidad, integridad de membrana plasmática e integridad acrosomal del semen colectado por los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación.



- En alpacas, las bacterias que se encuentran en el aparato reproductor del macho y de la hembra y en semen colectado por los métodos poscópula, vagina artificial y electro eyaculación, varían en especies y concentración.
- Las alpacas huacaya inseminadas con semen fresco colectado por el método poscópula a las 24, 26, 28 y 30 horas post inducción de la ovulación, presentan diferentes tasas de fertilidad.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de estudio

La investigación se realizó en las instalaciones del Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicado en el distrito de Marangani, provincia de Canchis, región Cusco a una altitud de 4070 a 5489 metros, entre las coordenadas latitud sur  $14^{\circ}30'$  y longitud oeste  $71^{\circ}30'$ , a la altura del nevado Chimboya que es parte de la cordillera del Nudo del Vilcanota, con presencia de temperaturas extremas, frío intenso por las noches y radiación solar alta por el día, propias de los andes peruanos, cuenta con paraderas de pastos naturales, bofedales, manantiales, riachuelos y otros que son propios de la crianza de camélidos sudamericanos y unas 12 Has de pastos cultivados de rye gras ingles cercados con mallas de alambre, infraestructura de laboratorios, galpón de esquila y canchas de manejo de ganado.

#### 3.2. Población

En el Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, cuenta con una extensión de terreno aproximado de 6500 Has donde se realiza una crianza extensiva de alpacas y llamas en praderas de pastos naturales de estrato alto y bajo con presencia de bofedales, manantiales, así mismo cuenta con unas 12 Has de pastos cultivados, donde cuenta con una población de 3450 alpacas huacaya y suri de las cuales unas 2100 alpacas son hembras en estado reproductivo y 280 llamas K'ara y Ch'acu, población de alpacas suficiente para seleccionar las alpacas para el estudio de investigación.

### 3.3. Muestra

Para realizar el estudio de investigación científica, se seleccionó al azar el 5% de la población del total de alpacas huacaya hembra en estado reproductivo y machos de plantel del Centro Experimental La Raya de la UNSAAC Cusco y se distribuyó por sexo:

- **Alpacas huacaya hembra:** Los animales para la investigación, se obtuvo de una punta de alpacas huacaya de parición con cría en pie, de las cuales se seleccionó al azar 100 hembras huacaya de 3 a 8 años de edad aproximadamente, de condición corporal 3, sin problemas reproductivos, clínicamente sanas, con cría en pie y con descanso post parto mayor o igual a 20 días.
- **Alpacas huacaya macho:** Se seleccionó al azar 20 alpacas huacaya machos de 4 a 8 años de edad aproximadamente, del rebaño de la punta de alpacas y llamas machos reproductores, previa evaluación del aparato reproductor y sin signos de enfermedades reproductivas.

### 3.4. Métodos de investigación

- ***Toma de muestras y evaluación de las variables macro y microscópicas del semen***

El método utilizado fue de tipo experimental, se colectó semen por los métodos poscópula, electroeyaculación y vagina artificial en alpacas huacaya y las variables macroscópicas del semen colectado por los métodos de electroeyaculación, vagina artificial y poscópula se evaluaron en el Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y las variables microscópicas del semen colectados por los tres métodos mencionados anteriormente, se evaluaron en el Laboratorio de Reproducción Animal del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura de la Estación Marangani de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- ***Toma de muestras para análisis bacteriológico***

El método utilizado fue de tipo experimental, se tomó muestras antes de realizar el empadre con un hisopo estéril a nivel de las paredes del prepucio, vagina y del semen colectado de los métodos poscópula, electroeyaculación y vagina artificial y se remitió las muestras en medios de transporte de Cary y Blair (Difco) para su

aislamiento e identificación de bacterias al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

- ***Inseminación artificial con semen fresco***

El método utilizado fue de tipo experimental, se inseminó artificialmente a alpacas huacaya hembras con semen fresco colectado por el método poscópula a las 24, 26, 28 y 30 horas post inducción de ovulación con una hormona análoga a la GnRh (conceptase) en dosis de 1 ml, y la inseminación artificial propiamente se realizó mediante el método transcervical con una pipeta y con ayuda de un proctoscopio con fuente de luz y el semen fresco diluido se depositó dentro del cuerpo del útero.

### **3.5. Descripción detallada de métodos por objetivos específicos**

#### **3.5.1. Métodos del objetivo de evaluar el volumen, color, concentración espermática, motilidad, viabilidad, integridad de la membrana plasmática e integridad acrosomal de semen colectado por los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación.**

##### ***a. Descripción de variables analizadas***

- ***Volumen de semen***

Es la cantidad de semen colectado por eyaculado y es uno de los parámetros que se evalúa y su medición se realiza en mililitros del total de semen colectado por diferentes métodos y no es un indicador del número de espermatozoides.

- ***Color del semen***

Es la tonalidad del volumen del semen colectado, esto dependerá del método de colección, concentración espermática y del plasma seminal.

- ***Concentración espermática***

Es el número de espermatozoides por mililitro de semen eyaculado o colectado por diferentes métodos, el número varía por especie, frecuencia de monta y otros.

- ***Motilidad espermática***

Es la velocidad en que se mueven los espermatozoides en el plasma seminal o en un medio de dilución en dirección recta.

- ***Viabilidad espermática***

Este parámetro mide el porcentaje de espermatozoides vivos en un mililitro de semen.

- ***Integridad de la membrana plasmática***

Es uno de los parámetros evaluados con mayor frecuencia durante el análisis seminal de rutina y su determinación es útil para predecir la capacidad fecundante del espermatozoide, en términos de integridad morfológica y funcional.

- ***Integridad acrosomal***

Es un parámetro que indica la capacidad fecundante de los espermatozoides en el semen.

***b. Descripción de materiales***

*Instrumentos y materiales para la evaluación del semen.*

- Sistema CASA SCA®.
- Microscopio óptico.
- Baño maría en seco.
- Vortex.
- Calentador de cobre y porta objetos
- Porta y cubre objetos.
- Tubos de ensayo de laboratorio.
- Micropipetas.

*Para el método de colección de semen por poscópula, se utilizó:*



- Proctoscopios previamente esterilizados.
- Tubo colector graduado.
- Material de aseo.
- 10 alpacas hembras huacaya de 3 a 8 años de edad aproximada.
- 10 alpacas machos huacaya de 4 a 8 años de edad aproximada.

*Para el método de colección de semen por vagina artificial, se utilizó:*

- 02 maniquís de alpaca.
- 02 vaginas artificiales.
- Fundas de látex recta y cónica.
- Tubo colector graduado.
- Frazadilla eléctrica.
- Hervidor de agua a electricidad.
- Materiales de aseo.
- 10 alpacas machos huacaya de 4 a 8 años de edad aproximada, entrenados y acostumbrados a copular en vagina artificial.

*Para el método de colección de semen por electroeyaculación, se utilizó:*

- Equipo electroeyaculador con sus accesorios.
- Ecógrafo portátil con transductor lineal de 7.5 MHz.
- Tubo colector graduado.
- Anestésico
- Sedante.
- Jeringas de 5 y 10 ml.
- Guantes quirúrgicos de látex.

- Gel lubricador.
- Agua destilada.
- Materiales de aseo.
- 10 alpacas huacaya macho de 4 a 8 años de edad aproximadamente.

### **c. Metodología**

***Colección de semen por el método poscópula***, las muestras de semen se obtuvieron, de acuerdo a la técnica descrita por Alarcón *et al.* (2012), se utilizó alpacas hembras adultas vacías clínicamente sanas y sexualmente receptivas al macho. Cada hembra se empadró naturalmente con un macho, terminado la copula, se insertó un proctoscopio a nivel vaginal y se colectó el semen sobrante, fluidos vaginales y uterinos que quedaron dentro de la vagina y se depositó en un tubo colector de vidrio graduado y se mantuvo a 37 °C hasta su evaluación.

***Colección de semen por el método electroeyaculación***, para la colección del semen, se realizó los siguientes pasos:

- ***Medición de la distancia ano-próstata***, se realizó con un ecógrafo portátil con un transductor lineal de 7.5 MHz para determinar la distancia ano-próstata de cada animal. Esta medición es necesaria para poder ubicar el vástago del electro eyaculador sobre la próstata durante la extracción del semen.
- ***Sedación y anestesia general***, se aplicó a cada animal Ketamina 10% (2.3 ml/100 kg/PV) y Xilazina 2% (1.4 ml/20 kg/PV) por vía endovenosa.
- ***Estimulación eléctrica***, una vez anestesiado, el animal se colocó de decúbito lateral y previo lavado del prepucio con agua destilada a 37 °C. El vástago lubricado con gel, se introdujo cuidadosamente en el recto, colocando los electrodos sobre la próstata. Para realizar la electro estimulación, el voltaje se incrementó en 0.2 voltios desde 2 hasta los 14 voltios. El semen se colectó en tubos falcón, protegidos

por una funda externa que mantuvo a una temperatura de 37 °C hasta su evaluación.

*Colección de semen por el método vagina Artificial*, se utilizó un maniquí de alpaca en posición de cópula y se le colocó una vagina artificial adaptada de ovino, que consta de un tubo de caucho de 21 cm de largo por 4 cm de diámetro, con una funda de látex recta y cónica que termina adosada a un tubo colector graduado. La vagina artificial contuvo aire a presión y agua a una temperatura entre 38 a 40 °C cubierta con una frazadilla eléctrica a 40 °C de temperatura, que permitió mantener a una temperatura constante la vagina artificial. Terminada, la cópula se retiró cuidadosamente la vagina artificial con el semen colectado y se mantuvo a una temperatura de 37 °C hasta su evaluación.

#### *Evaluación del semen*

- **Volumen.** El volumen del semen colectado, se determinó a través de la lectura visual, en tubos colectores esterilizados y medidos en mililitros.
- **Color.** El color del semen colectado se determinó paralelamente a la evaluación del volumen, también a la lectura visual directa a trasluz.
- **Concentración espermática.** Se determinó por el Sistema CASA SCA®, se montó 10 µl de semen en una lámina portaobjetos precalentada, cubriéndola con una laminilla de cubreobjetos.
- **Motilidad.** Se montó 10 µl de semen en una lámina portaobjetos precalentadas, cubriéndola con una laminilla cubreobjetos y se evaluó mediante el Sistema CASA SCA ®.
- **Viabilidad.** Se determinó por el Sistema CASA SCA®.
- **Integridad de membrana plasmática.** Se utilizó el test de endosmosis (Hypo-Osmotic- Swelling test, HOST). Para esto, se incubó 25 µl de la muestra en 500 µl de solución hipoosmótica (100 mOsm) durante 60 minutos a 37 °C y luego se observó en 10 µl de la muestra al microscopio. Un total de 200 espermatozoides fueron contados en

varios campos del microscopio, donde los espermatozoides vivos con colas dobladas e hinchadas fueron registrados como células positivas a HOST.

- **Integridad acrosomal.** Se determinó por medio de la tinción de eosina-nigrosina en portaobjetos temperados a 37 °C y con la ayuda de un microscopio óptico a 100x se evaluaron 200 espermatozoides en varios campos del microscopio.

#### ***d. Análisis estadístico***

Los datos de las variables como volumen, color, concentración y morfología del eyaculado se analizarán mediante estadística descriptiva de tendencia central. Los porcentajes de motilidad, viabilidad, HOST+ e integridad acrosomal; se analizaron empleando estadística descriptiva para verificar si existe diferencias estadísticas entre los promedios mediante DCA y su respectivo análisis de varianza, contrastado a través de la Prueba múltiple de significación de duncan.

### **3.5.2. Métodos del objetivo de aislar e identificar las bacterias del prepucio, vagina y del semen colectado de los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación**

#### ***a. Descripción de variables analizadas***

- ***Bacterias***

Son microorganismos que pueden tener diferentes formas, pueden ser esféricas, alargadas o espirales. Son células procariotas sin núcleo definido y células eucariotas con núcleo definido.

- ***Prepucio***

Es el pliegue de piel que cubre el extremo del pene en camélidos es la porción que se separa a partir del año de edad (adherencia pene-prepucial).

- ***Vagina***

Es el órgano reproductor de la hembra, de forma de tubo muscular revestido de membranas mucosa, que conecta el útero con el exterior del cuerpo, que recepción el pene del macho durante la cópula.

- ***Semen***

Fluido viscoso que contiene los espermatozoides y el plasma seminal de las glándulas accesorias y del testículo, que es expulsado durante la cópula del macho.

- ***Métodos de colección de semen***

Son métodos que permiten colectar el semen del macho artificialmente, pueden ser el método poscópula, electroeyaculación, vagina artificial y otros.

***b. Descripción de materiales***

Se utilizó los mismos equipos y materiales de colección de semen del experimento del objetivo 1 y se incluyó:

- Hisopos estériles.
- Medios de transporte de Cary y Blair (Difco).
- Recipiente de espuma de poliestireno.
- Hielo seco.
- Material de aseo.
- Guantes quirúrgicos.
- Bolsas de plástico.

***c. Metodología***

***Toma de muestras***, las muestras para la investigación de aislamiento e identificación bacteriológica se obtuvieron por contacto directo con un hisopo estéril de las paredes de los órganos del prepucio y vagina e

inmersión directa con el semen colectado en un tubo colector graduado de vidrio y se detalla de la siguiente forma:

- **Prepucio**, se realizó el hisopado de la superficie del prepucio de 5 machos previos a la monta natural y se colocó en el medio de transporte de Cary y Blair (Difco).
- **Vagina**, previa una adecuada asepsia de alrededores y labios vaginales, se realizó el hisopado a nivel de la porción media del interior de la vagina de 5 alpacas hembras, esto previos al empadre, para ello se utilizó un proctoscopio estéril para acceder a la porción media vaginal y se colocó en el medio de transporte de Cary y Blair (Difco).
- **Semen colectado de los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación**, con un hisopo estéril, se tomó por contacto directo con el semen colectado de los tres métodos de colección y se colocó en el medio de transporte de Cary y Blair (Difco).

Las muestras fueron remitidos al laboratorio dentro de un recipiente de espuma de poliestireno con hielo.

**Análisis bacteriológico**, las muestras obtenidas en campo, se enviaron en un medio de transporte de Cary y Blair (Difco) en recipientes de espuma de poliestireno con hielo, vía aérea al Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde el personal encargado del laboratorio procedieron a realizar el cultivo de las muestras remitidas en Agar sangre y Agar MacConkey, en aerobiosis y anaerobiosis con el uso de generadores de anaerobiosis de Anaerocult®, por 24 a 72 horas a 37 °C, para la identificación bacteriana del género y especie se utilizó pruebas bioquímicas y el Manual Bergey. Luego, se realizó el sembrado de las colonias obtenidas en medios diferenciales bioquímicos y para el recuento bacteriano se emplearon diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-5}$ . Para el recuento bacteriano de mesófilos se empleó PCA (*Plate count agar*) y para el recuento de coliformes el Agar VRB (Violeta cristal-rojo neutro-bilis-

lactosa), en las cuales se inoculó tomando un volumen de un 1 ml, de cada dilución.

#### *d. Análisis estadístico*

El análisis estadístico, se realizó aplicando un análisis de estadística descriptiva de tendencia central.

### **3.5.3. Métodos del objetivo de determinar la fertilidad en alpacas huacaya inseminadas con semen fresco colectado por el método poscópula a 24, 26, 28 y 30 horas post inducción de la ovulación**

#### *a. Descripción de variables analizadas*

##### *- Fertilidad*

Es la unión de un óvulo y un espermatozoide, que ocurre generalmente en los oviductos uterinos, el resultado de esta unión genera la producción de una célula llamada también huevo o cigoto a partir de ello, inicia el desarrollo de un embrión. Así mismo, la nominación es en porcentaje, cuando se requiere evaluar a un grupo de animales.

##### *- Inseminación artificial con semen fresco*

Es el proceso de la inseminación artificial a una alpaca hembra previa inducción de ovulación, con semen inmediatamente colectado y diluido.

#### *b. Descripción de materiales*

Se utilizó los mismos equipos y materiales de colección de semen del experimento del objetivo 1 y se incluyó:

- Fuente de luz acoplable al proctoscopio.
- Pipetas para inseminación.
- Fundas para cubrir las pipetas de inseminación.
- Funda para cubrir de los rayos del sol y mantener la pipeta de inseminación a una temperatura constante.

- Semen fresco diluido.
- Hormona análoga a la GnRH (Conceptase).
- Jeringas de 10 ml.
- Materiales de sujeción para alpacas

### **c. Metodología**

**Colección de semen**, se realizó mediante el método de colección de semen poscópula; para lo cual, se seleccionaron alpacas hembras huacaya adultas con cría en pie, con descanso de  $\geq 20$  días post parto, clínicamente sanas y sexualmente receptivas al macho. Las alpacas hembra se empadraron con machos también previamente seleccionados, por un tiempo mínimo de 10 minutos, terminada la copula, se introdujo un proctoscopio vía vaginal y se levantó a la hembra por la parte anterior para crear una inclinación y se procedió a colectar por gradiente de inclinación el semen que quedo a nivel vaginal conjuntamente con fluidos vaginales y uterinos, presentes en el interior de la vagina, a un tubo colector de vidrio graduado y fue mantenido a una temperatura constante de 37 °C.

**Análisis de la calidad seminal**, realizada la colección del semen, se evaluó el volumen, color, concentración espermática y motilidad, para determinar la calidad del semen y determinar la cantidad de dilutor a utilizar.

**Dilución del semen fresco**, para determinar la utilización del semen, se tomó en consideración, que el volumen colectado sea  $\geq 1$ ml, motilidad  $\geq 65\%$ , color (blanco lechoso o rojo claro) y procedió a la dilución, en una solución compuesta por 0.3 M Tris, 27.75 mM glucosa, 94.7 mM ácido cítrico, tilosina 0.1 mg/ml, gentamicina 0.5 mg/ml y lincomicina 1.8 mg/ml (García *et al.*, 2017). Asimismo, se le añadió yema de huevo fresco de codorniz a una concentración del 20% y fue mantenida en un baño maría seco a una temperatura constante de 37 °C hasta el momento de la inseminación artificial.



***Inseminación artificial en alpacas***, un día antes de la inseminación artificial, las hembras seleccionadas fueron ecografiadas vía transrectal, para evaluar la funcionalidad del útero, ovarios y la presencia de folículos pre-ovulatorios  $\geq 7$  mm, a las hembras, que a la evaluación mostraron un buen estado reproductivo y con presencia de un folículo pre-ovulatorio, se las procedió a inducir la ovulación vía hormonal, con la administración intra muscular (IM) de 1 ml de un análogo de GnRH (0.0042 mg de acetato de buserelina), tomando nota de la hora y día de la aplicación hormonal para su posterior inseminación.

La inseminación artificial con semen fresco propiamente se realizó en cada uno de los siguientes tratamientos:

- T1 (n = 20 alpacas hembra huacaya): Inseminación artificial a las 24 horas post inducción de ovulación.
- T2 (n = 20 alpacas hembra huacaya): Inseminación artificial a las 26 horas post inducción de ovulación.
- T3 (n = 20 alpacas hembra huacaya): Inseminación artificial a las 28 horas post inducción de ovulación.
- T4 (n = 20 alpacas hembra huacaya): Inseminación artificial a las 30 horas post inducción de ovulación.

Las hembras fueron inseminadas artificialmente vía intrauterina, la pipeta de inseminación se cargó con 1 ml de semen fresco diluido, con una concentración aproximada de  $20 \times 10^6$ /ml de espermatozoides viables, por alpaca hembra.

Posterior a la inseminación artificial, las alpacas fueron mantenidas en corrales con pastos naturales y cultivados por un periodo de 30 días post inseminación artificial hasta la evaluación del diagnóstico de fertilidad, luego las alpacas retornaron a su majada anterior conjuntamente con sus crías.

***Diagnóstico de fertilidad***, el diagnóstico de fertilidad de las alpacas huacaya inseminadas artificialmente, se las evaluó a los 30 días post

inseminación artificial mediante ecografía vía transrectal y se realizó en un ambiente adecuado con instalaciones para una adecuada sujeción, se evaluó la presencia del embrión implantado para determinar la preñez.

*d. Análisis estadístico*

Se aplicó un análisis de estadística de tendencia central y para evaluar la fertilidad se empleó la prueba de Chi cuadrado.

$$\chi^2 = \sum \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

Donde:

$o_i$  representa a cada frecuencia observada.

$e_i$  representa a cada frecuencia esperada.

## CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Calidad seminal

Se realizó los análisis para determinar las variables macroscópicas y microscópicas de los parámetros reproductivos del semen fresco colectados por los métodos de electroeyaculación, vagina artificial y poscópula, las variables macroscópicas del semen se determinaron a través de métodos convencionales y los parámetros seminales microscópicas se determinó por el Sistema CASA SCA®, los resultados se muestran en la Tabla 4.

De las variables en estudio, del semen colectado por el método poscópula, presentan mayor porcentaje en viabilidad, HOST+ e integridad acrosomal con diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en comparación al semen colectado por vagina artificial y electroeyaculación y sin diferencias significativas en porcentaje de motilidad, esto debido a que el semen obtenido por el método poscópula es de menor viscosidad, semi diluido y con presencia de fluidos vaginales y uterinos que posiblemente cumplan la función de proteger al espermatozoide en el útero y los espermatozoides puedan llegar a la unión úterotubal en el momento oportuno de la ovulación, y poder realizar una fecundación exitosa (García y Alarcón, 2019; Hafez y Hafez, 2002). En cuanto, a la motilidad del semen colectado por el método de vagina artificial resultó ser menor en comparación al 75.2% y 69% de motilidad reportados en dos investigaciones por Bravo *et al.*, (1997) y Bravo y Alarcon (2013) respectivamente, este menor porcentaje pueda deberse, porque la evaluación fue hecha manualmente con un microscopio óptico a 40x y respecto a la motilidad del semen colectado por el método poscópula es similar a los reportados en dos estudios de investigación realizados en alpacas (Bravo y Alarcon, 2013; García y Alarcón, 2019). En cuanto, a la vitalidad y HOST+, Bravo *et al.* (1997); Bravo y Alarcon, (2013)

y García y Alarcón, (2019) reportan valores menores a los resultados obtenidos.

Tabla 4

*Características de las variables macro y microscópicas del semen fresco colectados por los métodos poscópula, vagina artificial y electroeyaculación*

Variables	n	Poscópula	Vagina Artificial	Electroeyaculación
Motilidad total (%)	5	69.1 <sup>a</sup> ± 2.3	62.5 <sup>b</sup> ± 10.4	59.1 <sup>c</sup> ± 1.0
Viabilidad (%)	5	82.8 <sup>a</sup> ± 1.3	71.4 <sup>b</sup> ± 3.5	62.0 <sup>c</sup> ± 1.2
HOST+ (%)	5	77.9 <sup>a</sup> ± 1.3	67.0 <sup>b</sup> ± 1.7	59.7 <sup>c</sup> ± 1.2
Integridad acrosomal (%)	5	85.2 <sup>a</sup> ± 1.3	79.8 <sup>b</sup> ± 3.0	84.2 <sup>a</sup> ± 2.3
Concentración (10 <sup>6</sup> /ml)	5	78.5 <sup>b</sup> ± 15.1	89.9 <sup>a</sup> ± 17.8	62.5 <sup>b</sup> ± 20.5
Volumen (ml)	5	2.9 ± 1.8	1.5 ± 0.9	1.6 ± 0.6
Consistencia (%)				
Viscosa		10	85	30
Poco viscosa		90	15	70
Color (%)				
Blanco lechoso		13.6	64.6	22.2
Blanco cristalino		4.6	35.4	77.8
Rojo claro		65.9		
Rojo oscuro		15.9		

<sup>ab</sup> Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencia significativa (p<0.05)

Respecto a la concentración (10<sup>6</sup>/ml), existe diferencia significativa (p ≤ 0.05) entre los valores de las concentraciones del semen de los tres métodos de colección, donde el semen colectado por vagina artificial presenta mayor concentración de espermatozoides,

seguido por las concentraciones de semen colectado por los métodos de poscópula y electroeyaculación; esto debido a que el semen de vagina artificial se encuentra en su totalidad de un eyaculado sin contaminación y el semen procedente de electroeyaculación es muy variable puesto que en algunos casos presenta mayor concentración y en la mayoría de las colecciones son de menor concentración, mientras que el semen colectado por el método de poscópula también es de menor concentración, puesto que es un semen semi diluido con presencia de fluidos vaginales y uterinos, así mismo, el semen colectado es incompleto, porque solo se colecta pequeña cantidad de semen que eyaculo a nivel vaginal (Alarcón *et al.*, 2012; García *et al.*, 2017). Los valores de concentración obtenidos ( $10^6/\text{ml}$ ) 78.5 en semen colectado de poscópula, es similar a los valores reportados de ( $10^6/\text{ml}$ ) 75.20 (Bravo y Alarcon, 2013) y ( $10^6/\text{ml}$ ) 73.8 (García y Alarcón, 2019). Mientras, la concentración del semen colectado por vagina artificial ( $10^6/\text{ml}$ )  $89.9 \pm 17.8$  es mayor en comparación a los reportados en otros estudios en alpacas ( $10^6/\text{ml}$ ) 17.6 (Flores *et al.*, 2002), ( $10^6/\text{ml}$ ) 56.2 (Bravo *et al.*, 1997) y ( $10^6/\text{ml}$ ) 80.34 (Bravo y Alarcon, 2013), esta diferencia pueda deberse a la frecuencia y método de colección de semen.

En la mayoría de las colectas, se obtuvo mayor volumen de semen colectado por el método poscópula, seguido por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial, esto debido a que el semen colectado por el método poscópula presenta adicionalmente sangre, fluidos vaginales y fluidos uterinos. Así mismo, García y Alarcón (2019) reportan en semen obtenido por el método poscópula, valores similares de  $2.8 \pm 1.1$  ml, mientras Bravo y Alarcon (2013) reportan valores mayores de  $3.6 \pm 1.3$  ml esto debido que es el promedio de semen colectado de alpaca y llama. Mientras en semen colectado por vagina artificial reportan valores de 1.4 a 1.8 ml (Bravo *et al.*, 1997; Bravo y Alarcon, 2013; Flores *et al.*, 2002; Garnica *et al.*, 1993) siendo similar al volumen de semen colectados en la presente investigación, puesto que se encuentra dentro de ese rango, este rango de variación pueda deberse a la frecuencia de uso de los machos en empadre natural, como también a la frecuencia de colectas de semen realizados.

A la evaluación, el semen colectado por el método de vagina artificial resulto ser muy viscoso, debido a la presencia fluidos mucopolisacáridos de las glándulas anexas bulbouretrales y próstata, que le confiere la alta viscosidad característica del semen de camélidos sudamericanos, seguido por el semen colectado por electroeyaculación que fue menos viscoso pero muy variable de un macho a otro y el semen colectado por el método poscópula fue en todas las colectas de menor viscosidad en comparación al semen

colectado por los métodos de vagina artificial y electroeyaculación. En otros estudios de investigación en camélidos sudamericanos, reportan, que el semen colectado por el método de vagina artificial también resulto ser muy viscoso, similar al resultado obtenido en la presente investigación (Bravo *et al.*, 1997; Bravo y Alarcon, 2013; Flores *et al.*, 2002; Garnica *et al.*, 1993) y en dos estudios en alpacas, reportan que el semen colectado por el método poscópula es ligeramente viscoso (Bravo y Alarcon, 2013; Sumar y Garcia, 1986), que es similar al resultado obtenido, que nos indica que el semen obtenido por el método poscópula, es manejable para la evaluación y dilución correspondiente.

Respecto al color, el semen colectado por el método poscópula fue de una tonalidad de color rojo claro a rojo oscuro esto por la presencia de glóbulos rojos de la sangre que está presente en el semen por la fricción constante del pene con las paredes endometriales de la vagina y útero, mientras el semen colectado por el método de vagina artificial fue mayormente de color blanco lechoso y el semen obtenido del método de electroeyaculación fue de un color blanco cristalino, esto debido a la menor cantidad de fluidos de las glándulas accesorias. Los reportes de color de semen colectados por el método de vagina artificial van desde blanco cristalino a blanco lechoso (Bravo *et al.*, 1997; Bravo y Alarcon, 2013; Flores *et al.*, 2002 y Garnica *et al.*, 1993) igual a los resultados de esta investigación, esto debido a la mayor concentración de espermatozoides presentes en el colectado de semen. Así mismo, el color del semen colectado por el método poscópula reportan que es de un color rojizo (Bravo y Alarcon, 2013) y rojo claro (García y Alarcón, 2019) y en la presente investigación, el semen colectado por el método poscópula se observó que el 65.9% fue de color rojo oscuro, que indica que es por la alta presencia de glóbulos rojos de la sangre contaminante en el semen y en menor porcentaje de color rojo claro y blanco lechoso, esto debido a que hay poca presencia de sangre en las colectas de semen, que nos indica que no siempre se presenta sangrado de las paredes vaginales o uterinos de las hembras durante la cópula.

#### **4.2. Aislamiento e identificación bacteriana a nivel del prepucio, vagina y semen colectado por los métodos electroeyaculación, vagina artificial y poscópula**

Se realizó el aislamiento e identificación de las bacterias residentes a nivel del prepucio, vagina y del semen colectados de los métodos de electroeyaculación, vagina artificial y poscópula, se evaluó las muestras en medios de cultivo en laboratorio de microbiología y bacteriología, los resultados obtenidos se presentan en las tablas 5, 6 y 7.

A nivel del prepucio, se aislaron 07 bacterias: *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Staphylococcus sp* y *Corynebacterium sp*, *Klebsiella oxitoca*, *Citrobacter sp* y *Streptococcus sp*; en vagina se aislaron 07 bacterias *Escherichia coli*, *Enterobacter sp*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Corynebacterium sp*, *Bacillus sp* y *Providencia sp* y bacterias en común al prepucio y vagina se aislaron 05 bacterias *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* y *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp* y *Corynebacterium sp*. que se podrían considerar como bacterias residentes comunes de estos dos órganos; además, se aislaron en vagina 02 bacterias *Bacillus sp* y *Providencia sp*. Esto, nos indica que en ambos órganos hay presencia de bacterias residentes, que se debe tener en cuenta durante la colección de semen y época de empadre, para controlar o bajar la carga bacteriana y evitar transmisión de enfermedades reproductivas.

Tabla 5

*Bacterias identificadas a nivel del prepucio y vagina de alpacas*

<b>Bacterias</b>	<b>prepucio</b>	<b>vagina</b>
<i>Escherichia coli</i>	++	+++
<i>Enterobacter sp.</i>	++	++
<i>Staphylococcus sp.</i>	++	+
<i>Klebsiella oxitoca</i>	+	-
<i>Citrobacter sp.</i>	+	-
<i>Streptococcus sp.</i>	+	+
<i>Corynebacterium sp.</i>	++	+
<i>Bacillus sp.</i>	-	+
<i>Providencia sp.</i>	-	+

+++ : Severo

++ : Moderado

+ : Leve

Pacheco *et al.* (2022) en un estudio en alpacas, reportan las mismas bacterias encontradas a nivel del prepucio y con mayor carga bacteriana, en comparación al presente estudio; también reportan la presencia del hongo *Aspergillus fumigatus*, esta similitud permite

deducir que estas 07 bacterias son residentes del prepucio de alpacas.

De las 07 bacterias aisladas de la vagina de alpaca en la presente investigación, 06 bacterias son iguales a los reportados y descritos en alpacas por, Pacheco *et al.* (2022) y solo el *Streptococcus sp.* no reportan dichos autores, tal similitud permite deducir que son bacterias residentes de la vagina en alpacas. También, en llamas Jimenez (2016) reporta la presencia de 13 bacterias de los cuales 06 bacterias son similares a lo reportado por dicho autor y solo el *Corynebacterium sp.* no es reportado; se deduce, que las bacterias residentes de vagina de alpacas también están presentes en llamas.

En llamas, las bacterias encontradas a nivel vaginal a excepción de la bacteria *Citrobacter sp.* se identificaron solo 03 bacterias, de los 4 descritos por Jimenez (2016) y 3 bacterias, de los 10 descritos por Jarvinen y Kinyon (2010), estos autores reportan mayor número de bacterias a los obtenidos en la presente investigación, esta diferencia se debería a la especie animal y a la menor altitud en que se crían las llamas y al tipo de pastura que comen en comparación a las alpacas que se crían a mayor altitud.

Tabla 6

*Bacterias identificadas en semen de alpaca colectados por los métodos electroeyaculación, poscópula y vagina artificial*

Bacterias	Electroeyaculación	Poscópula	Vagina Artificial
<i>Streptococcus sp.</i>	+	++	+
<i>Staphylococcus sp.</i>	++	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	++	-
<i>Nocardia sp.</i>	+	-	-
<i>Bacillus Sp.</i>	+	+	+
<i>Micrococcus sp.</i>	-	-	+

+++ : Severo

++ : Moderado

+ : Leve

En las muestras de semen obtenidos por el método de electroeyaculación, se aislaron 05 bacterias, a pesar que se dice, que es una técnica limpia donde previo a la colección se lava y desinfecta los alrededores del pene y prepucio y la carga bacteriana fue similar a



los del semen colectados por los métodos de poscópula y vagina artificial. La carga bacteriana del semen colectado por vagina artificial, puede contaminarse adicionalmente, porque el macho entra en contacto con el maniquí que se encuentra en posición de copula de alpaca, en contacto con el suelo y pasto. En el semen colectado por el método de poscópula se esperaba encontrar mayor carga bacteriana, porque el semen se colecta después de terminado la copula, donde la muestra obtenida es la suma del semen, fluidos vaginales, fluidos uterinos y contaminantes externos, arrastrados por el pene, puesto que la cópula en camélidos tiene una duración de varios minutos y durante el proceso, el pene del macho busca la entrada de la vagina y se expone al suelo y a la fibra sucia de la alpaca hembra.

En un estudio en llamas, aislaron bacterias del semen obtenidos por los métodos de electroeyaculación y vagina artificial además de las bacterias *Staphylococcus sp*, *Escherichia coli*, *Streptococcus sp* y *Bacillus sp*, encontrados en la presente investigación aislaron bacterias como *Proteus sp*, *Enterococcus sp*, *Gardnerella sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Morganella sp*, *Serratia sp* (Pezo *et al.*, 2021), esta mayor cantidad de bacterias reportadas pueda deberse a la especie animal. Así mismo, en un estudio en alpacas huacaya, en semen colectados por los métodos de electroeyaculación, vagina artificial y poscópula, reportan similares bacterias a los encontrados en la presente investigación (Pacheco *et al.*, 2022), esto permite concluir que las bacterias encontradas en presente estudio, son bacterias residentes de las alpacas y debe tomarse en consideración en los trabajos de biotecnología reproductiva.

En el semen obtenido por el método de poscópula, donde las bacterias presentes provienen tanto del macho como de la hembra, se aislaron las bacterias *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Escherichia coli* y *Bacillus sp.*, que son comunes en tractos reproductivos de machos y hembras en ovinos y vacunos (Swartz *et al.*, 2014), en equinos (Clément *et al.*, 1995) y en camélidos (Jimenez, 2016; Mshelia *et al.*, 2014; Pacheco *et al.*, 2022; Pezo *et al.*, 2021), se deduce que hay presencia de varias bacterias residentes comunes en diferentes especies domésticas.

En semen de alpacas colectados por el método de vagina artificial se aislaron las bacterias *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Micrococcus*, y en otro estudio en alpacas se aislaron las mismas bacterias, pero con diferente carga bacteriana (Pacheco *et al.*, 2022) y en un estudio en llamas, además de estas cuatro bacterias aislaron *Proteus sp*,

*Enterococcus sp*, *Gardnerella sp*, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp* y *Morganella sp*. (Pezo *et al.*, 2021), esta mayor carga bacteriana se debería a la especie animal y que su habitat natural se encuentra a menores altitudes en comparación a la alpaca. En ovinos también, reportan presencia de carga bacteriana en semen colectados por el método de vagina artificial (Ahmed *et al.*, 2017; Yániz *et al.*, 2010) y en vacunos (Meena *et al.*, 2015), Por ello, es necesario realizar una adecuada asepsia de los alrededores del pene y prepucio para casos de colección de semen en programas de inseminación artificial, fertilización *in vitro* y otros, por que reduciría significativamente la carga bacteria en semen colectado (Rasool *et al.*, 2018). Así mismo, alta carga bacteriana afecta la viabilidad espermática y por lo tanto, la calidad seminal (Yániz *et al.*, 2010). Se deduce, que el semen colectado por los tres métodos en estudio, siempre habrá presencia de carga bacteriana y que se debe tomar en consideración para utilizar los antibióticos específicos durante la dilución del semen de alpaca.

Tabla 7

*Determinación cuantitativa de la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC/μl) en semen de alpaca colectadas por los métodos electroeyaculación, poscópula y vagina artificial*

Método de colección	Bacterias mesófilas		Bacterias coliformes	
	(UFC/μl)		(UFC/μl)	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
Electroeyaculación	13.7x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>3</sup> – 3x10 <sup>5</sup>	2.37x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>2</sup> – 8x10 <sup>4</sup>
Poscópula	2.93x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>3</sup> – 5x10 <sup>4</sup>	2.83x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup> – 6x10 <sup>3</sup>
Vagina artificial	2.41x10 <sup>4</sup>	7x10 <sup>2</sup> – 6x10 <sup>4</sup>	2.59x10 <sup>4</sup>	4x10 <sup>2</sup> – 2x10 <sup>4</sup>

La cantidad de bacterias mesófilas, es mayor en las muestras de semen colectados por el método de electroeyaculación, seguido por poscópula y vagina artificial, este resultado pueda deberse a la mayor manipulación del pene y prepucio antes y durante la colección de semen; pero en las bacterias coliformes, la carga bacteriana fue similar en los tres métodos de colección. Se esperaba, menor carga bacteriana en semen colectado por el método electroeyaculación, porque antes de la colección se realiza la asepsia de alrededores del pene y prepucio, además el macho no entra en contacto con la hembra; en comparación a los otros dos métodos, donde el macho realiza la cópula, en vagina

artificial con un maniquí y en poscópula con una hembra receptiva y que previa a la monta, el pene entra en contacto con la fibra, alrededores de la vulva y vagina donde pueda arrastrar bacterias durante el proceso de la cópula.

En ovinos, las cantidades reportadas en bacterias mesófilas y coliformes son mayores a los reportados en el presente estudio (Yániz *et al.*, 2010), esto pueda deberse a la especie animal y al lugar de pastoreo o crianza. En semen de porcinos se reportó cantidades inferiores, con un rango de  $1 \times 10^1$  a  $3 \times 10^5$  UFC/mL<sup>-1</sup> (Bennemann *et al.*, 2018). En alpacas, Pacheco *et al.* (2022) reportan mayor cantidad de bacterias en comparación a la presente investigación.

Los resultados demuestran, la presencia de bacterias mesófilas y coliformes en el semen colectado en los tres métodos, con variación en la carga bacteriana y se deduce que hay presencia de bacterias residentes en el aparato reproductor del macho y de la hembra en alpacas.

### 4.3. Tasa de fertilidad en alpacas

La determinación de la fertilidad en alpacas huacaya inseminadas artificialmente con semen fresco colectados por el método poscópula a 24, 26, 28 y 30 horas post inducción de la ovulación, se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8

*Tasa de fertilidad en alpacas huacaya por inseminación artificial con semen fresco colectado por el método poscópula*

Condición de Preñez	Inseminación artificial post inducción de ovulación							
	24 h		26 h		28 h		30 h	
	n	%	n	%	n	%	n	%
P	9	45 <sup>a</sup>	10	50 <sup>a</sup>	7	35 <sup>b</sup>	6	30 <sup>b</sup>
V	11	55 <sup>a</sup>	10	50 <sup>a</sup>	13	65 <sup>b</sup>	14	70 <sup>b</sup>
Total	20	100	20	100	20	100	20	100

P = Preñada  
V = Vacía  
h = hora  
n = número

Los resultados de fertilidad, es independiente de la hora de inseminación artificial post

inducción de ovulación, la mayor tasa de fertilidad se alcanzó a las 26 horas post inducción de ovulación, 50% seguido de 45, 35 y 30% a las 24, 28 y 30 horas post inducción de ovulación respectivamente, existiendo diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ) de los resultados a las 28 y 30 horas post inducción, siendo la hora más adecuada para realizar la inseminación artificial a las 26 horas post inducción de ovulación.

En un estudio de inseminación artificial en alpacas con semen congelado procedente de los conductos deferentes, reportan tasas de fertilidad de 0, 15.78 y 25% inseminadas a las 24, 26 y 30 horas post inducción de ovulación respectivamente, en comparación con los resultados del presente estudio, son porcentajes menores, esto pueda deberse a que utilizaron semen descongelado que aún no está definido la técnica de congelación y descongelación, como también se utilizó solo espermatozoides más el dilutor sin la presencia de fluidos de las glándulas anexas y el porcentaje más alto se dio a las 30 horas post inducción (Pacheco *et al.*, 2009). En otro estudio, de inseminación artificial en alpacas con semen refrigerado colectados por el método de vagina artificial, reportan resultados de 16.6, 38.8 y 27.7% de preñez, inseminadas a las 26, 28 y 30 horas post inducción de ovulación respectivamente, donde los porcentajes de fertilidad son menores a los obtenidos en la presente investigación y el porcentaje de preñez más alto se dio a las 28 horas post inducción de ovulación y que es similar al resultado obtenido también a dicha hora de inseminación (González *et al.*, 2011), este menor porcentaje de fertilidad pueda deberse a que se inseminó con semen refrigerado colectado en vagina artificial que presenta dificultades durante la dilución por su alta viscosidad.

En llamas, en un estudio de inseminación artificial con semen fresco colectado por el método de vagina artificial, se obtuvo el 40% de fertilidad cuando se inseminó a las 24 horas post inducción de la ovulación (Aller *et al.*, 2003), dicho resultado es similar al obtenido en el presente estudio de 45% de fertilidad en alpacas inseminadas a las 24 horas post inducción de ovulación.

Murillo (2018) en un estudio de inseminación artificial en alpacas, con semen fresco colectado por el método poscópula reporta 53.33% de fertilidad a las 28 horas post inducción de ovulación, es mayor a lo obtenido en el presente estudio. Bravo y Alarcon (2013) reportan resultados de 25, 68.75 y 81.25% de fertilidad inseminadas a las 26, 28, y 36 horas post inducción de ovulación respectivamente, siendo las tasas de fertilidad superiores a los obtenidos en el estudio, crea duda dichos resultados en alpacas, porque



aún hay dificultades en el manejo del semen y la inseminación artificial, pueda que no hayan realizado un buen diagnóstico de preñez. García *et al*, (2017); García y Alarcón, (2019) reportaron en dos estudios de inseminación artificial en alpacas, con semen colectado por el método poscópula e inseminadas entre las 26 a 30 horas post inducción de ovulación y obtuvieron una tasa de fertilidad de 50% y 50.5% en ambos artículos, resultados similares obtenidos a las 26 horas de inseminación post inducción de ovulación en el presente estudio, que no es posible comparar la hora de inseminación, porque los realizaron dentro un rango de dichas horas.



## CONCLUSIONES

El semen colectado por los métodos de poscópula, vagina artificial y electroeyaculación se encontraron diferencias en cuanto a las variables de motilidad, viabilidad, HOST+, integridad acrosomal, concentración, volumen, viscosidad y color.

En el prepucio, vagina y en el semen colectado de los tres métodos, se aislaron bacterias mesófilas y coliformes, no existiendo igualdad de bacterias ni carga bacteriana y se consideran como bacterias residentes.

La hora óptima para inseminar artificialmente con semen fresco de postcópula y alcanzar tasas de fertilidad superiores al 50% es a las 26 horas post inducción de ovulación.



## RECOMENDACIONES

Utilizar los protocolos de la presente investigación en la evaluación del semen de alpacas para evaluar parámetros seminales.

Realizar más estudios, con mayor número de animales para conocer y estandarizar los valores normales de residencia y probar antibióticos específicos para las bacterias aisladas y utilizarlos en el proceso de la dilución del semen y si es factible llegar a congelar y descongelar semen.

Validar la técnica de inseminación artificial en alpacas con semen fresco colectados por el método poscópula e inseminar a las 26 horas post inducción de ovulación, en comunidades alpaqueras y en hatos de pequeños, medianos y grandes productores de camélidos sudamericanos, en condiciones propias de la crianza de alpacas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aba, M., Kindahl, H., Forsberg, M., Quiroga, M., & Auza, N. (2000). Levels of progesterone and changes in prostaglandin F<sub>2α</sub> release during luteolysis and early pregnancy in llamas and the effect of treatment with flunixin meglumine. *Animal Reproduction Science*, 59(1–2), 87–97. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00068-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00068-3)
- Adams, G. P. (1989). In situ morphologic dynamics of ovaries, uterus, and cervix in llamas. *Biology of Reproduction*, 41(3), 551–558. <https://doi.org/10.1095/biolreprod41.3.551>
- Adams, G. P., Ratto, M. H., Huanca, W., & Singh, J. (2005). Ovulation-Inducing Factor in the Seminal Plasma of Alpacas and Llamas<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, 73(3), 452–457. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040097>
- Adams, G., Sumar, J., & Ginther, O. (1990). Effects of lactational and reproductive status on ovarian follicular waves in llamas (*Lama glama*). *Journals of Reproduction y Fertility Ltd*, 90(2), 535–545. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0900535>
- Ahmed, E., Islam, M., Alam, M., Jha, P., Ghosh, S., Naher, N., & Bari, F. (2017). Bacterial contamination of ram semen used for artificial insemination in indigenous ewes. *The Bangladesh Veterinarian*, 34(1), 20–26. <https://doi.org/10.3329/bvet.v34i1.38709>
- Alarcón, V., García, W., & Bravo, W. (2012). Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(1), 58–64. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i1.882>
- Aller, J., Ferré, L., Rebuffi, G., & Alberio, R. (1997). Inseminación artificial en llamas (*Lama glama*). Primera comunicación en Argentina. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 5.
- Aller, J., Rebuffi, G., Cancino, A., & Alberio, R. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Archivos de zootecnia*, 52(197), 15–23.



- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. (2000). Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane1. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1531–1537. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1531>
- Bennemann, P., Machado, S., Girardini, L., Sonálio, K., & Tonin, A. (2018). Contaminantes bacterianos y perfil de susceptibilidad del semen porcino en centros de recogida em Brasil. *Revista MVZ Córdoba*, 23(2), 6637–6648. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1338>
- Bravo, W. (1994). Reproductive Endocrinology of Llamas and Alpacas. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 10(2), 265–279. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30561-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30561-2)
- Bravo, W., & Alarcon, V. (2013). 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. *SPERNOVA*, 3(2), 3.
- Bravo, W., Ccallo, M., & Garnica, J. (2000). The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Small Ruminant Research*, 38(1), 91–95. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(00\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(00)00142-5)
- Bravo, W., Flores, D., & Ordoñez, C. (1997). Effect of Repeated Collection on Semen Characteristics of Alpacas. *Biology of Reproduction*, 57(3), 520–524. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.3.520>
- Bravo, W., Fowler, M., Stabenfeldt, G., & Lasley, B. (1990). Ovarian follicular dynamics in the llama. *Biology of Reproduction*, 43(4), 579–585. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.4.579>
- Brown, B. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Animal Reproduction Science*, 58(3–4), 169–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(99\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(99)00081-0)
- Chen, B. X., Yuen, Z. X., & Pan, G. W. (1985). Semen-induced ovulation in the bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Reproduction*, 74(2), 335–339. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0740335>

- Clément, F., Vidament, M., & Guérin, B. (1995). Microbial Contamination of Stallion Semen. *Biology of Reproduction*, 52(monograph\_series1), 779–786. [https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph\\_series1.779](https://doi.org/10.1093/biolreprod/52.monograph_series1.779)
- El-Bahrawy, K., Rateb, S., Khalifa, M., Monaco, D., & Lacalandra, G. (2017). Physical and kinematic properties of cryopreserved camel sperm after elimination of semen viscosity by different techniques. *Animal Reproduction Science*, 187, 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.10.011>
- FAO. (1996). *Manual de prácticas de manejo de alpacas y llamas*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fernández-Baca, S. (1993). Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Animal Reproduction Science*, 33(1–4), 307–323. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90121-7](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90121-7)
- Flores, P., García-Huidobro, J., Muñoz, C., Bustos-Obregón, E., & Urquieta, B. (2002). Alpaca semen characteristics previous to a mating period. *Animal Reproduction Science*, 72(3–4), 259–266. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00095-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00095-7)
- García, W., & Alarcón, V. (2019). Efecto de la inseminación artificial con semen fresco, con uno y dos servicios, en la fertilidad y natalidad de las alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(2), 760–767. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i2.16072>
- García, W., Alarcón, V., & Bravo, W. (2017). Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(2), 337. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13080>
- Garnica, J., Achata, R., & Bravo, W. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*, 32(1–2), 85–90. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90059-Z](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90059-Z)
- Garnica, J., Flores, E., & Bravo, W. (1995). Citric acid and fructose concentrations in seminal plasma of the alpaca. *Small Ruminant Research*, 18(1), 95–98. [https://doi.org/10.1016/0921-4488\(95\)00720-6](https://doi.org/10.1016/0921-4488(95)00720-6)

- Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M., & Miragaya, M. (2010). Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science*, *118*(1), 98–102. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.005>
- Giuliano, S., Chaves, M., Trasorras, V., Gambarotta, M., Neild, D., Director, A., Pinto, M., & Miragaya, M. (2012). Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Animal Reproduction Science*, *131*(3–4), 204–210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.010>
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., & Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science*, *104*(2–4), 359–369. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.016>
- González, M., Huanca, T., & Cárdenas, O. (2011). Evaluación de la fertilidad en alpacas inseminadas con semen refrigerado a diferentes tiempos post inducción de ovulación. *Spermova*, *1*, 102–103. <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/1591>
- Hafez, E., & Hafez, B. (2002). *Reproducción e inseminación artificial en animales (7ª ED.)* / VV.AA. / Casa del Libro. casadellibro. <https://www.casadellibro.com/libro-reproduccion-e-inseminacion-artificial-en-animales-7-ed/9789701037195/825228>
- Hernández, M., Bueso, J., & Fernández, A. (2017). Evaluación de la contaminación bacteriana del semen de moruecos recogido mediante vagina artificial. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, *18*(12), 1–9.
- Huanca, W., & Adams, G. (2007). Semen Collection and Artificial Insemination in Llamas and Alpacas. En *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (pp. 869–873). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-072169323-1.50120-3>
- Jarvinen, J., & Kinyon, J. (2010). Preputial microflora of llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*). *Small Ruminant Research*, *90*(1–3), 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.01.007>

- Jimenez, J. (2016). *Detrerminacion de la flora bacteriana de la vagina y utero, y la realcion con la fertilidad en camelidos sudamericanos domesticos (Lama glama) del Centro Experimental Agropecuario Condoriri* [Thesis, Universidad Mayor de San Andres]. <http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/13285>
- Johnson, L. (1989). Llama Reproduction. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 5(1), 159–182. [https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)31008-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)31008-2)
- Kershaw, C., Evans, G., Rodney, R., & Maxwell, W. (2016). Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm function and improve post-thaw motility rates. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(6), 1107. <https://doi.org/10.1071/RD15261>
- Kershaw-Young, C., & Maxwell, W. (2012). Seminal Plasma Components in Camelids and Comparisons with Other Species. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(s4), 369–375. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02100.x>
- Laruta, F., Loza, G., & Delgado, A. (2016). Evaluación de características microscópicas de semen de llama (*Lama glama*) crioconservados en dos dilutores Microscopic evaluation of semen characteristics llama (*Lama glama*) cryopreserved two dilutors. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 3(1), 14.
- Mamani C., R., Huanca M., T., Pacheco C., J., Zapana V., R., & Condori R., N. (2013). Tasa de ovulación utilizando liberador de gonadotropinas y plasma seminal en alpacas y llamas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(2), 194–198.
- Meena, G., Raina, V., Gupta, A., Mohanty, T., Bhakat, M., Abdullah, M., & Bishist, R. (2015). Effect of preputial washing on bacterial load and preservability of semen in Murrah buffalo bulls. *Veterinary World*, 8(6), 798–803. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.798-803>
- Mshelia, G., Okpaje, G., Voltaire, Y., & Egwu, G. (2014). Comparative studies on genital infections and antimicrobial susceptibility patterns of isolates from camels (*Camelus dromedarius*) and cows (*Bos indicus*) in Maiduguri, north-eastern Nigeria. *SpringerPlus*, 3(1), 91. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-91>

- Murillo, Y. (2018). Tasa de fertilidad a la inseminación artificial y mérito económico en alpacas huacaya. *Revista de Investigaciones: Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno*, 7(3), 4.
- Ordoñez, C., Cucho, H., Ampuero, E., Antezana Julián, W., & Cayo, S. (2013). Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación Artificial insemination with fresh, cooled and thawed alpaca semen collected with electroejaculation SPERMOVA Spermova. 2013; 3(1): 65 -66. *Spermova*, 3, 65–66.
- Pacheco, J. (2008). Métodos de coleccion de semen en camélidos sudamericanos— Methods of semen collection in south american camelids. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, IX(4), 17.
- Pacheco, J., Angulo, J., Siuce, J., & García, W. (2022). Determinación de bacterias y hongos en semen fresco de alpaca obtenido por tres técnicas de colección. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 33(3), e22911. <https://doi.org/10.15381/rivep.v33i3.22911>
- Pacheco, J., Danilo, P., Velez, V., & Bravo, W. (2017). Descripción ecográfica del inicio de la actividad ovárica en Alpacas (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 19(2). <https://doi.org/10.18271/ria.2017.278>
- Pacheco, J., Perez, G., Calle, L., & Garcia, W. (2009). Efecto del lugar y la hora de inseminacion artificial sobre la fertilidad en Alpacas (Effect of the place and the hour of artificial insemination on the fertility in Alpacas). *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(8), 5.
- Pezo, D., Meza, A., Ampuero, E., Pezo, S., Cardenas, N., Becerra, J., Tarifa, N., Salas, F., & Cucho, H. (2021). Evaluación bacteriológica de semen de llamas reproductores obtenidos mediante vagina artificial y electroeyaculación. *VI Jornadas Internacionales Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal INITRA*, 87.
- Rasool, A., Bhakat, M., Ahmad, S., Kumar, T., Sinha, R., Ur, J., Bashir, Z., & Danish, Z. (2018). Role of preputial washing in reducing microbial load and improving

- bovine semen quality. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 7(3), 97.  
<https://doi.org/10.4103/2305-0500.233570>
- Salamon, S., & Maxwell, W. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Silva, M., Paiva, L., & Ratto, M. H. (2020). Ovulation mechanism in South American Camelids: The active role of  $\beta$ -NGF as the chemical signal eliciting ovulation in llamas and alpacas. *Theriogenology*, 150, 280–287.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.078>
- Sumar, J. (1996). Reproduction in llamas and alpacas. *Animal Reproduction Science*, 42, 11.
- Sumar, J., & Garcia, M. (1986). Nuclear and related techniques in animal production and health. *Livestock Production Science*, 17, 382. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0301-6226(87)90088-1)
- Swartz, J., Lachman, M., Westveer, K., O'Neill, T., Geary, T., Kott, R., Berardinelli, J. G., Hatfield, P., Thomson, J., Roberts, A., & Yeoman, C. (2014). Characterization of the Vaginal Microbiota of Ewes and Cows Reveals a Unique Microbiota with Low Levels of Lactobacilli and Near-Neutral pH. *Frontiers in Veterinary Science*, 1(19). <https://doi.org/10.3389/fvets.2014.00019>
- Tibary, A., & Anouassi, abdelhaq. (2001). Uterine infections in camelidae. *Veterinary Sciences Tomorrow*, 3, 12.
- Tibary, A., & Vaughan, J. (2006). Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research*, 61(2–3), 283–298. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.018>
- Vaughan, J. (2011). Ovarian function in South American camelids (alpacas, llamas, vicunas, guanacos). *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 237–243.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.031>
- Vaughan, J. L., Macmillan, K. L., & D'Occhio, M. J. (2004). Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Animal Reproduction Science*, 80(3), 353–361.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.08.002>



- Vaughan, J., Macmillan, K., Anderson, G., & D'Occhio, M. (2003). Effects of mating behaviour and the ovarian follicular state of female alpacas on conception. *Australian Veterinary Journal*, 81(1–2), 86–90. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2003.tb11442.x>
- Yániz, J., Marco-Aguado, M. A., Mateos, J., & Santolaria, P. (2010). Bacterial contamination of ram semen, antibiotic sensitivities, and effects on sperm quality during storage at 15°C. *Animal Reproduction Science*, 122(1–2), 142–149. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.006>



## ANEXOS

### Anexo 1

#### Identificación de bacterias aerobias del prepucio de alpacas huacaya

. Telef.: 4353349, Anexo 221 / 619-7000. Fax: 6197000 Anexo: 5030  
 unmsm.edu.pe/ http://www.veterinaria.unmsm.edu.pe

Av. Circunvalación 2800 – S  
 E-mail: bacteri

“Año de la universalización de la salud”  
**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
 Universidad del Perú, Decana de América  
 FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA VETERINARIA**

#### SECCIÓN DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA

<b>N° CASO</b>	<b>319-20</b>
REMITENTE/ PROCEDENCIA	Wilber García / IVITA Marangani
MUESTRA	Hisopado prepucial
ESPECIE	Alpacas
N° MUESTRAS/ANIMALES	06/06
ANÁLISIS SOLICITADO	Cultivo e identificación de bacterias aerobias
FECHA DE RECEPCIÓN	20/02/20

#### RESULTADOS

Bacterias:	
MUESTRA	INTERPRETACIÓN
Alpaca macho N° 1	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp.

Bacterias:	
MUESTRA	INTERPRETACIÓN
Alpaca macho N° 2	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Escherichia coli</i>

Bacterias:	
MUESTRA	INTERPRETACIÓN
Alpaca macho N° 3	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp.

Bacterias:	
MUESTRA	INTERPRETACIÓN
Alpaca macho N° 4	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus</i> sp.

\*Se observó también crecimiento de levaduras inespecíficas.

Bacterias:	
MUESTRA	INTERPRETACIÓN
Alpaca macho N° 5	<i>Citrobacter</i> sp. <i>Streptococcus</i> sp.

San Borja, 11 de agosto del 2020.

.....  
**Dra. Sonia Calle Espinoza**  
 Responsable de la Sección





Anexo 2

Identificación de bacterias aerobias de vagina de alpacas huacaya



Av. Circunvalación 2800 – San Borja. Telef.: 4353349, Anexo 221 / 619-7000. Fax: 6197000 Anexo: 5030  
E-mail: bacterio.fmv@unmsm.edu.pe / http://www.veterinaria.unmsm.edu.pe

“Año de la universalización de la salud”  
**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, Decana de América  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA VETERINARIA**  
SECCIÓN DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA

<b>Nº CASO</b>	<b>319-20</b>
REMITENTE/ PROCEDENCIA	Wilber García / IVITA Marangani
MUESTRA	Hisopado de conducto vaginal
ESPECIE	Alpacas
Nº MUESTRAS/ANIMALES	06/06
ANÁLISIS SOLICITADO	Cultivo e identificación de bacterias aerobias
FECHA DE RECEPCIÓN	20/02/20

**RESULTADOS**

<b>Bacterias:</b>	
<b>MUESTRA</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Alpaca hembra N° 1	<i>Escherichia coli</i>

<b>Bacterias:</b>	
<b>MUESTRA</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Alpaca hembra N° 2	<i>Escherichia coli</i>

<b>Bacterias:</b>	
<b>MUESTRA</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Alpaca hembra N° 3	<i>Staphylococcus sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i>

<b>Bacterias:</b>	
<b>MUESTRA</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Alpaca hembra N° 4	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter sp.</i>

<b>Bacterias:</b>	
<b>MUESTRA</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Alpaca hembra N° 5	<i>Enterobacter sp.</i> <i>Providencia sp.</i> <i>Streptococcus sp.</i>

<b>Bacterias:</b>	
<b>MUESTRA</b>	<b>INTERPRETACIÓN</b>
Alpaca hembra N° 6	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus sp.</i>

San Borja, 11 de agosto del 2020.

.....  
*Sonia Calle Espinoza*  
**Dra. Sonia Calle Espinoza**  
Responsable de la Sección



Anexo 3

*Recuento de bacterias del semen colectado por el método poscópula en alpacas huacaya*



Av. Circunvalación 2800 – San Borja. Telef.: 4353349, Anexo 221 / 619-7000. Fax: 6197000 Anexo: 5030  
E-mail: bacterio.fmv@unmsm.edu.pe/ http://www.veterinaria.unmsm.edu.pe

“Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad”  
**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, Decana de América  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA VETERINARIA**  
**SECCIÓN DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA**

<b>N° CASO</b>	<b>319-20</b>
Profesional a cargo	Wilber García
MUESTRA	Semen recolectado pos cópula (vagina)
ESPECIE	Camélido sudamericano
N° DE MUESTRAS/ANIMALES	06/06
ANÁLISIS SOLICITADO	Recuento de bacterias y hongos
FECHA DE RECEPCIÓN	19/02/2020

**RESULTADOS**

	<b>BACT MESÓFILAS</b>	<b>BACT COLIFORMES</b>	<b>HONGOS</b>
<b>MUESTRA N°1</b> (0.8mL)	3 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	2 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	0 UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°2</b>	5 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	6 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	0 UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°3</b>	2 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	1 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	0 UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°4</b>	3 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	5 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	0 UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°5</b>	4 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	2 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	0 UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°6</b> (0.4mL)	6 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	1 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	0 UFC/uL de muestra

San Borja, 10 de junio de 2020.

.....  
**Dra. Sonia Calle Espinoza**  
Responsable de la sección



“Hagamos uso adecuado de los antibióticos, evitemos la resistencia antimicrobiana  
“OMS-OPS”

Anexo 4

*Recuento de bacterias del semen colectado por el método vagina artificial en alpacas huacaya*



  
 Av. Circunvalación 2800 – San Borja. Telef.: 4353349, Anexo 221 / 619-7000. Fax: 6197000 Anexo: 5030  
 E-mail: bacterio.fmv@unmsm.edu.pe/ http://www.veterinaria.unmsm.edu.pe

“Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad”  
**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
 Universidad del Perú, Decana de América  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA VETERINARIA**  
**SECCIÓN DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA**

<b>N° CASO</b>	<b>319-20</b>
Profesional a cargo	Wilber García
MUESTRA	Semen recolectado de vagina artificial
ESPECIE	Camélido sudamericano
N° DE MUESTRAS/ANIMALES	05/05
ANÁLISIS SOLICITADO	Recuento de bacterias y hongos
FECHA DE RECEPCIÓN	28/02/2020

**RESULTADOS**

	<b>BACT MESÓFILAS</b>	<b>BACT COLIFORMES</b>	<b>HONGOS</b>
<b>MUESTRA N°1</b>	8 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	2 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	3 x 10 <sup>1</sup> UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°2</b> (0.35mL)	7 x 10 <sup>2</sup> UFC/uL de muestra	4 x 10 <sup>2</sup> UFC/uL de muestra	1 x 10 <sup>2</sup> UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°3</b>	6 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	3 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	1 x 10 <sup>1</sup> UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°4</b>	5 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	2 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	2 x 10 <sup>1</sup> UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°5</b> (0.5mL)	2 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	5 x 10 <sup>2</sup> UFC/uL de muestra	4 x 10 <sup>1</sup> UFC/uL de muestra

San Borja, 10 de junio de 2020.

  
 .....  
**Dra. Sonia Calle Espinoza**  
 Responsable de la sección



“Hagamos uso adecuado de los antibióticos, evitemos la resistencia antimicrobiana  
 ”OMS-OPS”

Anexo 5

*Recuento de bacterias del semen colectado por el método electroeyaculación en alpacas huacaya*



Av. Circunvalación 2800 – San Borja. Telef.: 4353349, Anexo 221 / 619-7000. Fax: 6197000 Anexo: 5030  
E-mail: bacterio.fmv@unmsm.edu.pe/ http://www.veterinaria.unmsm.edu.pe

“Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad”  
**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, Decana de América  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA**  
**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA VETERINARIA**  
**SECCIÓN DE BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA**

<b>N° CASO</b>	<b>319-20</b>
Profesional a cargo	Wilber García
MUESTRA	Semen recolectado por electro eyaculación
ESPECIE	Camélido sudamericano
N° DE MUESTRAS/ANIMALES	06/06
ANÁLISIS SOLICITADO	Recuento de bacterias y hongos
FECHA DE RECEPCIÓN	05/03/2020

**RESULTADOS**

	<b>BACT MESÓFILAS</b>	<b>BACT COLIFORMES</b>	<b>HONGOS</b>
<b>MUESTRA N°1</b> (0.5mL)	2 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	1 x 10 <sup>2</sup> UFC/uL de muestra	1 x 10 <sup>1</sup> UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°2</b> (0.9mL)	2 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	3 x 10 <sup>2</sup> UFC/uL de muestra	3 x 10 <sup>1</sup> UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°3</b>	2 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	2 x 10 <sup>3</sup> UFC/uL de muestra	1 x 10 <sup>2</sup> UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°4</b>	3 x 10 <sup>5</sup> UFC/uL de muestra	4 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	2 x 10 <sup>2</sup> UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°5</b>	2 x 10 <sup>5</sup> UFC/uL de muestra	2 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	4 x 10 <sup>1</sup> UFC/uL de muestra
<b>MUESTRA N°6</b> (0.8mL)	3 x 10 <sup>5</sup> UFC/uL de muestra	8 x 10 <sup>4</sup> UFC/uL de muestra	1 x 10 <sup>2</sup> UFC/uL de muestra

San Borja, 10 de junio de 2020.

.....  
**Dra. Sonia Calle Espinoza**  
 Responsable de la sección



“Hagamos uso adecuado de los antibióticos, evitemos la resistencia antimicrobiana  
“OMS-OPS”

Anexo 6

*Inseminación artificial en alpacas a 24 horas post inducción de ovulación*

Arete/Hembra		Edad (Años)	Folículo (mm)		Día/Hora Inducción	Día/Hora Inseminación	Horas post inducción	Diagnóstico Preñez
Nº	Fecha		D	I				
H0743	1-06	15	8.3		12-01-21/7:55	13-01-21/7:55	24	P
S0051	12-06	14		7.5	12-01-21/8:20	13-01-21/8:20	24	P
H3343	1-10	11		13	12-01-21/8:23	13-01-21/8:23	24	V
H3488	1-10	11	11		12-01-21/8:09	13-01-21/8:09	24	P
H4023	1-11	10	7		12-01-21/7:56	13-01-21/7:56	24	V
H4832	1-12	9	10.2		12-01-21/8:25	13-01-21/8:25	24	V
H6187	1-14	7		7.1	12-01-21/8:12	13-01-21/8:12	24	P
H6318	1-14	7		9.2	12-01-21/8:02	13-01-21/8:02	24	V
H7274	2-15	6	11		12-01-21/8:10	13-01-21/8:10	24	V
H8040	2-16	5		7.1	12-01-21/8:05	13-01-21/8:05	24	P
H8168	2-16	5	7		12-01-21/9:05	13-01-21/9:05	24	V
H8713	1-17	4		9.3	12-01-21/7:47	13-01-21/7:47	24	P
H9112	12-17	3	8		12-01-21/8:07	13-01-21/8:07	24	V
H9105	12-17	3		8.4	12-01-21/8:03	13-01-21/8:03	24	V
H9146	12-17	3		10	12-01-21/7:51	13-01-21/7:51	24	V
H9196	12-17	3		6	12-01-21/7:46	13-01-21/7:46	24	V
H9271	1-18	3	8.3		12-01-21/7:43	13-01-21/7:43	24	P
H9314	1-18	3		10.4	12-01-21/7:49	13-01-21/7:49	24	V
H9688	2-18	3		8	12-01-21/7:58	13-01-21/7:58	24	P
H9690	2-18	3		7	12-01-21/8:00	13-01-21/8:00	24	P

D = Derecho  
I = Izquierdo  
P = Preñada  
V = Vacía

Anexo 7

*Inseminación artificial en alpacas a 26 horas post inducción de ovulación*

Arete/Hembra		Edad (Años)	Folículo (mm)		Día/Hora Inducción	Día/Hora Inseminación	Horas post inducción	Diagnóstico Preñez
Nº	Fecha		D	I				
H1057	12-06	14	6		12-01-21/8:13	13-01-21/10:13	26	P
H1195	12-06	14		10	12-01-21/8:07	13-01-21/10:07	26	V
H2839	1-09	12	10.1		12-02-21/7:37	13-02-21/9:37	26	P
H3506	1-10	11		7	12-02-21/7:33	13-02-21/9:33	26	V
H3657	2-10	11	7		12-01-21/8:05	13-01-21/10:05	26	P
H5248	2-12	9		7	12-01-21/8:00	13-01-21/10:00	26	V
H6298	1-14	7		6	12-01-21/8:06	13-01-21/10:06	26	P
H6353	1-14	7		7	12-01-21/8:02	13-01-21/10:02	26	V
H6160	1-14	7		7	12-02-21/7:27	13-02-21/9:27	26	V
H7562	12-15	5	6		12-01-21/8:01	13-01-21/10:01	26	P
H8029	2-16	5		7	12-01-21/7:59	13-01-21/9:59	26	V
H8336	12-16	4		7	12-02-21/7:36	13-02-21/11:36	26	P
H8798	2-17	4		6	12-01-21/8:09	13-01-21/10:09	26	V
H8677	1-17	4		8	12-02-21/7:05	13-02-21/11:05	26	P
H9174	12-17	3	7		12-02-21/7:22	13-02-21/9:22	26	V
H9253	1-18	3		7	12-02-21/7:39	13-02-21/9:39	26	V
H9302	1-18	3	10		12-02-21/7:24	13-02-21/9:24	26	P
H9895	3-18	3	8		12-02-21/7:30	13-02-21/9:30	26	P
H9792	2-18	3	8		12-02-21/7:31	13-02-21/9:31	26	V
H9541	2-18	3		8	12-02-21/7:40	13-02-21/9:40	26	P

D = Derecho  
I = Izquierdo  
P = Preñada  
V = Vacía

Anexo 8

*Inseminación artificial en alpacas a 28 horas post inducción de ovulación*

Arete/Hembra		Edad (Años)	Folículo (mm)		Día/Hora Inducción	Día/Hora Inseminación	Horas post inducción	Diagnóstico Preñez
Nº	Fecha		D	I				
H0055	12-04	17		8	12-01-21/7:38	13-01-21/11:38	28	V
H3669	2-10	11	7		12-01-21/7:09	13-01-21/11:09	28	P
H3501	1-10	11		6	12-01-21/7:22	13-01-21/11:22	28	V
H4558	3-11	10	6		12-01-21/7:37	13-01-21/11:37	28	P
H4492	2-11	10		6	12-01-21/7:20	13-01-21/11:20	28	V
H4289	2-11	10		8	12-01-21/7:13	13-01-21/11:13	28	V
H4159	1-11	10	8		12-01-21/7:43	13-01-21/11:43	28	P
H4991	1-12	9		8	12-01-21/7:26	13-01-21/11:26	28	V
H6004	3-13	8		7	12-01-21/7:06	13-01-21/11:06	28	V
H5641	1-13	8		12	12-01-21/7:28	13-01-21/11:28	28	V
H5535	12-12	8		8	12-01-21/7:35	13-01-21/11:35	28	P
H6555	3-14	7		6	12-01-21/7:31	13-01-21/11:31	28	P
H6536	2-14	7		12	12-01-21/7:05	13-01-21/11:05	28	V
H6673	12-14	6	6		12-01-21/7:25	13-01-21/11:25	28	V
H6656	12-14	6		6	12-01-21/7:41	13-01-21/11:41	28	V
H6874	1-15	6		7	12-01-21/7:10	13-01-21/11:10	28	P
H7728	1-16	5		6	12-01-21/7:33	13-01-21/11:33	28	V
H7716	1-16	5		6	12-01-21/7:41	13-01-21/11:41	28	V
H8485	1-17	4		6	12-01-21/7:12	13-01-21/11:12	28	V
H8773	2-17	4	6		12-01-21/7:36	13-01-21/11:36	28	P

D = Derecho  
I = Izquierdo  
P = Preñada  
V = Vacía



## Anexo 9

### *Inseminación artificial en alpacas a 30 horas post inducción de ovulación*

Arete/Hembra		Edad (Años)	Folículo (mm)		Día/Hora Inducción	Día/Hora Inseminación	Horas post inducción	Diagnóstico Preñez
N°	Fecha		D	I				
H2386	2-08	13	7		12-01-21/7:01	13-01-21/13:01	30	V
H2333	2-08	13	6		12-01-21/6:45	13-01-21/12:45	30	V
H2895	1-09	12	8		12-01-21/6:43	13-01-21/12:43	30	V
H3123	3-09	12		7	12-01-21/7:04	13-01-21/13:04	30	V
H3903	12-10	10	7.5		12-02-21/6:08	13-02-21/12:08	30	V
H4413	2-11	10		7	12-01-21/6:55	13-01-21/12:55	30	V
H4484	2-11	10		6	12-01-21/7:00	13-01-21/13:00	30	P
H4335	3-11	10		7	12-01-21/7:03	13-01-21/13:03	30	P
H5421	3-12	9	8		12-02-21/6:14	13-02-21/12:14	30	V
H5869	2-13	8		7	12-01-21/6:33	13-01-21/12:33	30	P
H6270	1-14	7		11.8	12-02-21/6:28	13-02-21/12:28	30	V
H6690	12-14	6		6	12-01-21/6:43	13-01-21/12:43	30	V
H7155	2-15	6		7	12-02-21/6:29	13-02-21/12:29	30	V
H8258	3-15	6		7	12-01-21/6:37	13-01-21/12:37	30	V
H7799	1-16	5		12	12-01-21/6:50	13-01-21/12:50	30	P
H8225	3-16	5	7		12-01-21/6:16	13-01-21/12:16	30	V
H7734	1-16	5	7		12-02-21/6:19	13-02-21/12:19	30	P
H8437	1-17	4		8	12-02-21/6:24	13-02-21/12:24	30	V
H8406	12-16	4		7	12-02-21/6:11	13-02-21/12:11	30	V
H9820	2-18	3		9.9	12-02-21/6:26	13-02-21/12:26	30	P

D = Derecho  
I = Izquierdo  
P = Preñada  
V = Vacía



## Anexo 10

### *Materiales de colección de semen para el método electroeyaculación*



1. Electroeyaculador portátil, 2. Papel toalla, 3. Gel para lubricar el recto, 4. Tubo colector graduado, 5. Guantes quirúrgicos de látex, 6. Algodón, 7. Tranquilizantes, 8. Jeringas.

## Anexo 11

### *Materiales de colección de semen para el método vagina artificial*



1. Maniquí de alpaca, 2. Frazadilla eléctrica, 3. Vagina artificial, 4. Funda de látex, 5. Tubo colector graduado

## Anexo 12

### *Materiales de colección de semen para el método poscópula*



1. Tubo colector graduado, 2. Proctoscopio, 3. Toalla de papel



Anexo 13

*Evaluación ecográfica del útero, ovarios y tamaño folicular*





Anexo 14

*Evaluación ecográfica del tamaño y ubicación del folículo preovulatorio*



## Anexo 15

Limpieza y desinfección del prepucio para la colección de semen del método electroeyaculación





## Anexo 16

### *Colección de semen por el método electroeyaculación.*



a. Desenvaine del pene con guantes de quirúrgicos, b. Aplicación con gel del transductor, c. Introducción del transductor por el recto has la altura de la próstata y aplicación de golpes eléctricos que estimula la eyaculación de espermatozoides y la colección en un tubo colector.

## Anexo 17

### *Evaluación de los parámetros reproductivos del semen con el Sis. CASA CA®*





## Anexo 18

### *Inseminación artificial en alpacas con semen fresco*







Universidad Nacional  
del Altiplano Puno



Vicerrectorado  
de Investigación



Repositorio  
Institucional

## DECLARACIÓN JURADA DE AUTENTICIDAD DE TESIS

Por el presente documento, Yo Nilton Marcial Cardenas Suarez  
identificado con DNI 24711639 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado  
Ciencia Animal

informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:  
"CALIDAD SEMINAL, BACTERIOLÓGICA Y FERTILIDAD DEL SEMEN FRESCO COLECTADO POR EL  
MÉTODO POSCÓPULA EN ALPACAS HUACAYA (VICUGNA PACOS)"

Es un tema original.

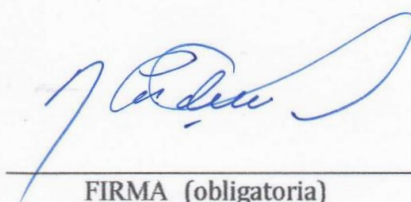
Declaro que el presente trabajo de tesis es elaborado por mi persona y **no existe plagio/copia** de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por persona natural o jurídica alguna ante instituciones académicas, profesionales, de investigación o similares, en el país o en el extranjero.

Dejo constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no asumiré como tuyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o Internet.

Asimismo, ratifico que soy plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asumo la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento, así como de las connotaciones éticas y legales involucradas.

En caso de incumplimiento de esta declaración, me someto a las disposiciones legales vigentes y a las sanciones correspondientes de igual forma me someto a las sanciones establecidas en las Directivas y otras normas internas, así como las que me alcancen del Código Civil y Normas Legales conexas por el incumplimiento del presente compromiso

Puno 24 de Noviembre del 2023



FIRMA (obligatoria)



Huella



Universidad Nacional  
del Altiplano Puno



Vicerrectorado  
de Investigación



Repositorio  
Institucional

## AUTORIZACIÓN PARA EL DEPÓSITO DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Por el presente documento, Yo Nilton Marcial Cardenas Suarez  
identificado con DNI 24711639 en mi condición de egresado de:

Escuela Profesional,  Programa de Segunda Especialidad,  Programa de Maestría o Doctorado  
Ciencia Animal

informo que he elaborado el/la  Tesis o  Trabajo de Investigación denominada:

“ CALIDAD SEMINAL, BACTERIOLÓGICA Y FERTILIDAD DEL SEMEN FRESCO COLECTADO POR EL MÉTODO POSCÓPULA EN ALPACAS HUACAYA (VICUGNA PACOS) ”

para la obtención de  Grado,  Título Profesional o  Segunda Especialidad.

Por medio del presente documento, afirmo y garantizo ser el legítimo, único y exclusivo titular de todos los derechos de propiedad intelectual sobre los documentos arriba mencionados, las obras, los contenidos, los productos y/o las creaciones en general (en adelante, los “Contenidos”) que serán incluidos en el repositorio institucional de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno.

También, doy seguridad de que los contenidos entregados se encuentran libres de toda contraseña, restricción o medida tecnológica de protección, con la finalidad de permitir que se puedan leer, descargar, reproducir, distribuir, imprimir, buscar y enlazar los textos completos, sin limitación alguna.

Autorizo a la Universidad Nacional del Altiplano de Puno a publicar los Contenidos en el Repositorio Institucional y, en consecuencia, en el Repositorio Nacional Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto, sobre la base de lo establecido en la Ley N° 30035, sus normas reglamentarias, modificatorias, sustitutorias y conexas, y de acuerdo con las políticas de acceso abierto que la Universidad aplique en relación con sus Repositorios Institucionales. Autorizo expresamente toda consulta y uso de los Contenidos, por parte de cualquier persona, por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales de autor y derechos conexos, a título gratuito y a nivel mundial.

En consecuencia, la Universidad tendrá la posibilidad de divulgar y difundir los Contenidos, de manera total o parcial, sin limitación alguna y sin derecho a pago de contraprestación, remuneración ni regalía alguna a favor mío; en los medios, canales y plataformas que la Universidad y/o el Estado de la República del Perú determinen, a nivel mundial, sin restricción geográfica alguna y de manera indefinida, pudiendo crear y/o extraer los metadatos sobre los Contenidos, e incluir los Contenidos en los índices y buscadores que estimen necesarios para promover su difusión.

Autorizo que los Contenidos sean puestos a disposición del público a través de la siguiente licencia:

Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Para ver una copia de esta licencia, visita: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

En señal de conformidad, suscribo el presente documento.

Puno 24 de Noviembre del 2023

FIRMA (obligatoria)



Huella