

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Efecto de la suplementación alimenticia en la fertilidad de alpacas
machos y hembras por inseminación artificial**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. JUANA LIDIA BARREDA BRAVO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PROMOCIÓN: 2016 - I

PUNO – PERÚ

2017

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Efecto de la suplementación alimenticia en la fertilidad de alpacas
machos y hembras por inseminación artificial**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. JUANA LIDIA BARREDA BRAVO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 04 DE MAYO DEL 2017

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:



PRESIDENTE :
Dr. CEFERINO UBERTO OLARTE DAZA

PRIMER MIEMBRO :
Ph. D. BERNARDO ROQUE HUANCA

SEGUNDO MIEMBRO :
Mg. Sc. NUBIA LILIA CATAORA FLORES

DIRECTOR DE TESIS :
MVZ. JUAN GUIDO MEDINA SUCA

ASESOR :
Ph. D. JOSÉ LUÍS BAUTISTA PAMPA

ASESOR :
Ph. D. PEDRO WALTER BRAVO MATHEUS

ÁREA: Reproducción animal

TEMA: Fertilidad en alpacas

DEDICATORIA

El conocimiento generado es dedicado con amor y cariño a mis queridos padres: EUGENIO y FILOMENA, por darme la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprensido, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi profesión.

A mis queridas hermanitas por su amor y apoyo: PAZ, NILDA, FLOR y SHERYL. Como las ramas de un árbol, crecemos en diferentes direcciones, pero nuestra raíz es una sola. Así la vida de cada una siempre será una parte esencial de la vida de otra.

A la memoria del angelito que guía mi camino con amor, Walter. Sé que donde estés eres feliz, sé que puedes escuchar el latido de mi corazón, sé que sientes como corre por mi sangre este amor que llevo dentro por ti.

A mi Amor Danny Axel. Por su amor, paciencia y apoyo. Aprendí que la persona que te ama, es esa que, sin decirlo, está a tu lado, y lo demuestra sin esperar nada a cambio.

Juana Lidia Barreda Bravo.

AGRADECIMIENTO

Al divino creador Dios, quien guía cada paso, día a día en el sendero de mi vida.

A la Universidad Nacional del Altiplano, por haberme brindado la oportunidad de forjarme un futuro, en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y cuerpo docente por sus conocimientos impartidos durante mi formación profesional.

A los miembros del jurado: Dr. Ceferino Uberto Olarte Daza, Ph. D. Bernardo Roque Huanca y Mg. Sc. Nubia Lilia Catacora Flores. Por el apoyo constante en la culminación del presente trabajo de investigación.

A mi Director Dr. Juan Guido Medina Suca, por sus conocimientos, sus orientaciones, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales.

Al Ph. D. Jose Luis Bautista Pampa, Asesor del presente trabajo de investigación, usted ha sido mi mano derecha y quien me ha guiado en el complicado proceso. Es cierto no ha sido nada fácil, sin embargo, su paciencia y su motivación han sido fundamentales durante la elaboración, ejecución y culminación del presente trabajo.

Al Ph. D. Walter Bravo Matheus, por su ayuda, dedicación y asesoramiento. La generosidad y amabilidad demostrada en cada momento, han sido un gran apoyo durante el tiempo dedicado a su realización del presente trabajo de investigación.

A mi amiga: Marisol, por tu paciencia y gentileza, Dios permitió que hiciéramos este trabajo juntas para aprender y conocer muchas cosas nuevas pero lo más bello de todo es que nos dio la sabiduría para terminar con éxito nuestra carrera.

A mis queridos amigos: Yashmeny, Rut, Gyorgy, Evilio, Guillermo, Norma, Yohonar, Rolando, Jacqueline, Yoel, Abad, Angel, Darwin, Ronnie, Clever, quienes me brindaron su amistad y apoyo incondicional. Un verdadero amigo es alguien que te conoce tal como eres, te acompaña en tus logros y tus fracasos.

Al Dr. Wilber García y a los estudiantes del UNSAAC por su apoyo en el presente trabajo, apoyo moral y confianza brindada.

A los trabajadores del CIP La Raya, por el apoyo y confianza durante la ejecución.

Al personal de Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación, por la confianza y apoyo durante el análisis de las muestras.

Juana Lidia Barreda Bravo.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. MARCO TEÓRICO	3
2.1.1. Alimento y requerimiento de nutrientes.....	3
2.1.2. Proteína y energía en la reproducción.....	3
2.1.3. Balance energético negativo (BEN).....	7
2.1.4. Fisiología reproductiva en alpacas.....	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1. MEDIO EXPERIMENTAL	15
3.1.1. Ubicación	15
3.1.2. Instalaciones	15
3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL	16
3.2.1. Animales	16
3.2.2. Alimentos	16
3.2.3. Materiales y equipos.....	19
3.3. METODOLOGÍA	21
3.3.1. Evaluación de la calidad de semen	21
3.3.2. Determinación de la actividad ovárica (tamaño y número de folículos)	25
3.3.3. Determinación de la tasa de fertilidad.....	26
3.3.4. Determinación de nitrógeno ureico en suero sanguíneo.....	27
3.4. VARIABLES DE MEDICIÓN.....	30
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	30
3.5.1. Calidad de semen.....	30
3.5.2. Actividad ovárica.....	31
3.5.3. Tasa de fertilidad en alpacas hembras.....	32
3.5.4. Nitrógeno ureico en suero sanguíneo.....	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1. CALIDAD DE SEMEN	34
4.1.1. Evaluación macroscópica	34
4.1.2. Evaluación microscópica	34
4.2. ACTIVIDAD OVÁRICA (TAMAÑO Y NÚMERO FOLICULAR)	37
4.2.1. Tamaño folicular	37
4.2.2. Número folicular.	38
4.3. TASA DE FERTILIDAD POR INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (21 DÍAS)	38
4.4. NITRÓGENO UREICO EN SUERO SANGUÍNEO.....	40

V. CONCLUSIONES	42
VI. RECOMENDACIONES	43
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Distribución de los animales experimentales por sexo y alimentación	16
Tabla 2: Composición química en los forrajes – insumos analizados	17
Tabla 3: Fórmula alimenticia del suplemento para alpacas	17
Tabla 4: Distribución de machos y hembras por tipo de alimentación.....	26
Tabla 5: Procedimiento para la determinación de nitrógeno ureico	29
Tabla 6: Volumen de semen por tipo de alimentación, mm ³	34
Tabla 7: Motilidad por tipo de alimentación, %	35
Tabla 8: Concentración espermática por tipo de alimentación esp/mm ³	35
Tabla 9: Vitalidad espermática por tipo de alimentación, %.....	36
Tabla 10: Morfología espermática por tipo de alimentación, %.....	37
Tabla 11: Tamaño folicular (mm) y número folicular por efecto del tipo alimentación.	37
Tabla 12: Tasa de fertilidad de alpacas por inseminación artificial, por efecto de tipo de alimentación, %.....	39
Tabla 13: Niveles de nitrógeno ureico en suero sanguíneo por doble interacción en alpacas machos y hembras.....	40
Tabla 14: Datos para calidad de semen de alpacas machos pasto natural.	53
Tabla 15: Datos para calidad de semen de alpacas machos suplementados.	53
Tabla 16: ANOVA para el tamaño folicular de ovarios de alpacas.....	53
Tabla 17: ANDEVA para número folicular de ovarios de alpacas.....	54
Tabla 18: ANOVA para niveles de nitrógeno ureico en suero sanguíneo de machos y hembras.....	54

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

°C	: Grados Centígrados
B	: Blanco
BEN	: Balance Energético Negativo
BUN	: Nitrógeno ureico en sangre
BN	: Balance de Nitrógeno
CL	: Cuerpo Lúteo
DS	: Dieta Suplementada
EB	: Energía Bruta
EM	: Energía Metabolizable
FSH	: Hormona Folículo Estimulante
g	: gramos
GnRH	: Hormona Liberadora de Gonadotropinas
IA	: Inseminación Artificial
IGF-I	: Factor liberador de Insulina tipo I
Kcal	: Kilocalorías
Kg	: Kilogramos
LH	: Hormona Luteinizante
M	: Muestra
mg	: mili gramos
mL	: mili litros
N	: Nitrógeno
NEFA	: Ácidos grasos no Esterificados
PCDm	: Proteína Cruda Digestible de mantenimiento
PCg	: Proteína Cruda de ganancia o crecimiento
PCm	: Proteína Cruda de mantenimiento
PN	: Pasto natural
PT	: Proteína Total
S	: Desviación Estándar
T1	: Tratamiento uno
T2	: Tratamiento dos
TRIS	: Hidroximetil aminometano

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto de la dieta suplementada en la fertilidad de alpacas machos y hembras por inseminación artificial a los 21 días, previa evaluación de la calidad de semen, la actividad ovárica (tamaño y número de folículos) y la concentración de nitrógeno ureico en suero sanguíneo. Se utilizó 4 machos y 60 hembras al pastoreo en pastos naturales (PN), y 4 machos y 60 hembras alimentadas en PN + dieta suplementada (DS) durante 45 días. La fertilidad se analizó mediante X^2 , el tamaño y número de folículos a través de un arreglo factorial de 2×2 bajo D.C.A. y para comparación de medias se utilizó Prueba Múltiple de Significación de Tukey ($\alpha = 0.05$) y “t” (student). Los resultados de la calidad de semen como volumen, motilidad, vitalidad, concentración espermática y espermatozoides normales, no mostraron diferencias entre PN y PN+DS. El tamaño folicular para PN+DS fue 9.12 ± 3.53 mm y PN fue 6.30 ± 1.99 mm, mostrando diferencias ($P \leq 0.05$). Sin embargo, el número de folículos para PN+DS y PN no mostraron diferencia. La fertilidad de alpacas pos inseminación entre machos y hembras en PN+ DS, y machos y hembras en PN fue 35.71 %; mientras para machos PN y hembras en PN+ DS fue 36.0 %, y para machos en PN+DS y hembras en PN fue 40.74 %, sin diferencia. Los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo para machos PN fue de 32.7mg/dL/alpaca, y machos en PN+DS fue de 27.2mg/dL/alpaca. Así mismo para hembras PN fue de 23.1mg/dL/alpaca y hembras en PN+DS fue de 31.9mg/dL/alpaca, habiendo diferencia ($P \leq 0.05$). Se concluye que la dieta suplementada tiene efecto en la actividad ovárica (tamaño folicular) y en nitrógeno ureico en suero sanguíneo.

Palabras clave: Alpaca, suplementación alimenticia, fertilidad, folículos, nitrógeno ureico.

ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of the diet supplemented on the fertility of male and female alpacas by artificial insemination at 21 days, after evaluation of semen quality, ovarian activity (size and number of follicles) and concentration of Urea nitrogen in blood serum. Four males and 60 females were fed to pasture in natural pastures (NP), and 4 males and 60 females were fed NP + supplemented diet (SD) for 45 days. Fertility was analyzed by X^2 , size and number of follicles through a factorial arrangement of 2 x 2 under D.C.A. Tukey ($\alpha = 0.05$) and "t" (student) were used for the comparison of means. The results of semen quality such as volume, motility, vitality, sperm concentration and normal spermatozoa did not show differences between NP and NP + SD. The follicular size for NP + SD was 9.12 ± 3.53 mm and NP was 6.30 ± 1.99 mm, showing differences ($P \leq 0.05$). However, the number of follicles for NP + SD and NP showed no difference. The fertility of alpacas pos insemination between males and females in NP + SD, and males and females in NP was 35.71%; While for males NP and females in NP + SD it was 36.0%, and for males in NP + SD and females in NP it was 40.74%, with no difference. Blood urea nitrogen levels for NP males were 32.7 mg / dL / alpaca, and males in NP + SD were 27.2 mg / dL / alpaca. Also for NP females was 23.1mg / dL / alpaca and females in NP + SD were 31.9mg / dL / alpaca, with difference ($P \leq 0.05$). The diet supplemented has an effect on ovarian activity (follicular size) and blood ureic notrogen.

Key words: Alpaca, nutritional supplementation, fertility, follicles, ureic nitrogen.

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería es un componente importante de los medios de subsistencia de los pequeños productores para satisfacer sus necesidades alimenticias y económicas (Assan, 2014). En el Perú se cuenta con 4.898.766,000 Alpacas teniendo el mayor porcentaje de alpacas en la región Puno que es de 2.711.726,00 (INEI, 2012).

El conocimiento de la fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos es aún insuficiente, especialmente en lo referido a la fisiología reproductiva del macho que presentan una menor producción de volumen de semen, baja concentración de espermatozoides/mL y menor tamaño testicular. La inseminación artificial es una de las tecnologías que ha contribuido al progreso genético en diversas especies de animales de producción. Sin embargo, existe muy poca información sobre la colección, características, evaluación y conservación del semen en la alpaca, debido a la falta de una metodología confiable y reproducible para la colección de semen (Ferré y Werkmeister, 1996). Las principales limitaciones son la colección de semen, la falta de conocimiento sobre su composición, viscosidad y uso de dilutores.

Existe un déficit de consumo de nutrientes como son proteína, energía principalmente y otros nutrientes esenciales necesarios en la etapa de reproducción (Bustinza, 2001). Los camélidos son considerados como especies de baja tasa de fertilidad en relación a otros mamíferos domésticos debido a que solo el 50% de los servicios entre machos y hembras fértiles terminan en gestación (Fernández Baca et al., 1970^a) las causas de esta baja fertilidad son diversas tales como la alta tasa de mortalidad embrionaria. También la debilidad de los tejidos fetales maternos. El estado reproductivo de las hembras, manifestándose con un bajo rendimiento reproductivo (Olivera et al., 2003; Bravo et al., 2010). La subnutrición de las hembras puede impedir la ovulación o la fertilización, incluso aumentar la incidencia de mortalidad embrionaria (Bondi, 1988). El rol de la

nutrición en la reproducción sugiere la posibilidad de lograr mejores resultados, si se aplica alguna estrategia nutricional sobre los requerimientos proteicos y energéticos en los sistemas de crianza de alpacas, donde las condiciones ambientales son adversas y como consecuencia la poca disponibilidad de alimentos, razones que en el presente trabajo se ha determinado el efecto de la suplementación alimenticia en la fertilidad de alpacas machos y hembras por inseminación artificial, a fin de lograr un incremento en la fertilidad en alpacas machos y hembras, con los siguientes objetivos:

Evaluar la calidad de semen (características macro y microscópicas del semen), determinar la actividad ovárica (tamaño y número de folículos) de las alpacas hembras, determinar la fertilidad de las alpacas hembras inseminadas a los 21 días y determinar el nitrógeno ureico en suero sanguíneo, por efecto de la suplementación alimenticia.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1. Alimento y requerimiento de nutrientes

El alimento es todo material comestible que aporta nutrientes para los animales que son necesarios para el mantenimiento del organismo, crecimiento, trabajo, reproducción y producción (Shimada, 2003). Los requerimientos nutricionales de animales y el aporte de nutrientes del alimento son: energía (glúcidos y lípidos), proteínas (aminoácidos), vitaminas, minerales y agua. Los requerimientos de nutrientes dependen de la edad, sexo, especie, estado fisiológico - reproductivo, nivel de producción, crecimiento, desarrollo y manejo en cada sistema de crianza, donde los requerimientos cambian a lo largo del año (NRC, 2007).

2.1.2. Proteína y energía en la reproducción

2.1.2.1. Proteínas

La nutrición proteica en camélidos es algo de un enigma. En primer lugar, las percepciones sugieren que tienen un bajo requerimiento de proteína; sin embargo, una cuidadosa evaluación de las necesidades de energía y proteínas muestra un mayor requerimiento sobre una base calórica (Van Saun, 2006). Otro asunto no resuelto con los camélidos es la normalmente más alta concentración de nitrógeno de urea en sangre (BUN) en comparación con otros rumiantes (Simons et al., 1993). En los rumiantes, la concentración de BUN refleja el nivel de proteína de la dieta. Las dietas bajas en proteínas resultan bajas en BUN, mientras está asociado con dietas altas en proteínas o la degradación de proteínas en exceso. Concentraciones más altas de BUN en camélidos sugieren que están siendo sobrealimentados

con proteína en relación con los requerimientos (Van Saun, 2006). Se ha planteado la hipótesis de que los camélidos metabolizan aminoácidos para apoyar su estado glucosa en la sangre, lo que explica las concentraciones de BUN son más altas (Van Saun, 2006). En la reproducción de ganado lechero, las concentraciones de BUN elevadas se ha asociado negativamente con las tasas de concepción reducidas y aumento de la muerte embrionaria temprana (Butler, 2000). Las teorías actuales sugieren un efecto negativo de amoniaco directamente en el desarrollo embrionario (Sinclair et al., 2000). O una alteración del ambiente uterino mediante la escisión de la urea (Elrod y Butler, 1993). Estas observaciones pueden ayudar a explicar la mayor prevalencia de muerte embrionaria temprana y repetir la reproducción de camélidos. Concentración de BUN superior también puede exacerbar el balance energético negativo (BEN), ya que se requiere energía para generar urea en excretar el exceso de nitrógeno (Roche, 2006). Este efecto puede resultar del BEN estando alterada la respuesta inmune, o un efecto directo de urea promueve condiciones de crecimiento bacteriano en el lumen uterino. Teniendo en cuenta estos problemas potenciales, en camélidos pueden ser inherentemente más susceptibles a infecciones uterinas como resultado de sus adaptaciones fisiológicas para las concentraciones de BUN más altas. Alimentar con dietas altas en proteínas también aumentará las concentraciones de BUN y pueden contribuir aún más al problema. Es evidente que se necesita más información sobre las necesidades de proteínas de los camélidos y sus posibles efectos sobre el medio ambiente uterino (Roche, 2006).

2.1.2.2. Requerimiento proteico

El primer trabajo de requerimiento de proteína cruda digerible de mantenimiento (PCD_m) en alpaca fue realizado por (Huasasquiche, 1974), mediante el balance de nitrógeno (BN), determinó el requerimiento de nitrógeno digerible y proteína digerible para mantenimiento fue de 0.38 y 2.38 $g/PV^{0.75}$ respectivamente. Posteriormente, (Robinson et al., 2005) utilizando la misma técnica determinó el requerimiento de nitrógeno (N) de mantenimiento de 0.60 $g N/PV^{0.75}$. Recientemente, (Bautista, 2009) determino los requerimientos de proteína cruda de mantenimiento (PC_m) de 3.10 $g/kg W^{0.75}$ y el requerimiento de proteína cruda (PC_g) de ganancia o de crecimiento de 0.40 $g/g GW$, para las alpacas de raza Huacaya de 1.5 años de edad, alimentadas con heno de avena y heno de alfalfa.

La relación de energía y proteína será constante, en consideración a que el requerimiento de proteína está en relación directa al requerimiento de energía, a fin de mantener la estabilidad de los metabolitos sanguíneos, tales como los ácidos grasos no esterificados (NEFA), β -hidroxibutirato, nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) y glucosa (Robinson et al., 2005).

2.1.2.3. Requerimiento energético

El estado de la energía ha sido la entidad nutricional más intensamente estudiado en relación con el desempeño reproductivo. Ambos extremos de estado de energía, reconocida como la condición corporal delgada u obesa, afectan negativamente el ciclo de la fertilidad, de la pubertad a la ciclicidad posparto. Un amplio sistema de alimentación pastoral basada en forrajes nativos es alimentación tradicional (Sumar, 2007).

La nutrición se vincula con la reproducción, principalmente a través del balance de energía (Boland et al., 2001). Aparte del efecto de los nutrientes específicos que actúan independientemente del tal balance de energía (Lucy, 2003).

Por lo tanto, el requerimiento energético de la alpaca, debe atender el crecimiento fetal, la producción de leche y las altas demandas de la actividad ovárica, dado que el tránsito de la gestación, parto y reproducción ocurre en un período relativamente corto, lo cual dependerá del estado nutricional y la lactancia (Skidmore, 2011).

Después del parto, ocurre un rápido incremento de los requerimientos energéticos para atender las funciones productivas, resultado un balance energético negativo, el cual está asociado con la longitud del periodo anovulatorio posparto a través de la atenuación de la frecuencia del pulso LH y los bajos niveles de glucosa sanguínea, insulina y IGF-I que colectivamente limitan la producción de estrógenos por el folículo dominante (Butler, 2003). La concentración intrafolicular de glucosa disminuye alrededor del parto (Leroy et al., 2004).

Su capacidad para la alimentación selectiva y utilizar forrajes de baja calidad permite de manera más eficiente en llamas y alpacas para sobrevivir y prosperar en estas condiciones aparentemente duras. Potencialmente pueden recibir forrajes de alta o de baja calidad durante todo el año, con la disponibilidad solamente limitado por esporádicas condiciones de sequía regionales. En consecuencia, problemas de equilibrio energético van todo el espectro de la malnutrición potencial para la obesidad, con una tendencia hacia una mayor incidencia de la obesidad (Van Saun, 2006). Los

requerimientos energéticos de alpacas para mantenimiento es 75.2 Kcal/W_{Kg}^{0.75} según (Roque, 2009).

2.1.3. Balance energético negativo (BEN)

Después del parto, la demanda de energía (glucosa) del animal supera el consumo de energía en el alimento, resultando en balance energético negativo (BEN). El BEN desencadena un conjunto de cambios en el animal, con efectos en la reproducción. Uno de los efectos del BEN es el largo período anovulatorio posparto a través de la atenuación de la frecuencia de pulso LH, la disminución y los bajos niveles de glucosa sanguínea, insulina y IGF-I que colectivamente limitan la producción de estrógenos por el folículo dominante (Butler, 2003).

Los estudios en vacas lecheras indican que el período de transición se caracteriza por una deficiencia de glucosa que conduce al balance energético negativo (BEN) y movilización de grasa corporal en forma de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y cuerpos cetónicos, siendo el ovocito la estructura que más sufre las consecuencias de esos cambios (Butler et al., 2006). La deficiencia de glucosa pone en peligro la competencia de desarrollo del ovocito, reduce la escisión y el desarrollo del embrión a blastocisto (Leroy et al., 2006), poniendo en peligro la salud y el rendimiento de las crías (Leroy et al., 2011).

El incremento de las concentraciones de NEFA ocasiona cambios en el microambiente del folículo ovárico, con efectos negativos y perjudiciales sobre el ovocito, la granulosa y las células inmunológicas (Bisinotto et al., 2012). Además, la exposición de los ovocitos a elevadas concentraciones

de NEFA durante la maduración afecta la expresión genética y el fenotipo de los subsecuentes embriones (Van Hoeck et al., 2013).

Los estudios en vacas lecheras han mostrado que la actividad ovárica depende del balance de energía. El balance energético negativo (BEN) influye en la ovulación del folículo dominante, suprime la secreción pulsátil de LH, disminuye la respuesta ovárica al estímulo LH, disminuye la secreción de estradiol por el folículo dominante, incrementa la concentración plasmática de NEFA y BHBA y ambos están asociados con la baja fertilidad (Garnsworthy et al., 2008).

Varios estudios han demostrado que el alto valor genético, el balance energético negativo, la movilización de la grasa corporal y bajo nivel de insulina en el plasma están asociados con retraso a la primera ovulación pos parto y una reducción de las tasas de preñez (Garnsworthy y Webb, 1999; Butler, 2003; Pryce et al., 2004; Butler, 2005; Garnsworthy, 2007).

2.1.4. Fisiología reproductiva en alpacas

2.1.4.1. Fisiología reproductiva en el macho

2.1.4.1.1. Espermatogénesis

Es el proceso por el cual se forman los espermatozoides en los túbulos seminíferos del testículo. Estudiando cortes histológicos en alpacas machos prepuberes, señalan que, en promedio, los primeros espermatozoides se observan a los 18 meses edad. Así mismo indican que la espermatogénesis en los adultos no muestra variaciones marcadas (Sorensen, 1982).

La espermatogénesis comprende tres fases: la espermatocitogénesis, fase en la cual las células germinales primordiales se convierten en espermátides, la espermiogénesis, fase en la cual las espermátides redondas se transforman

en espermatozoides y la espermiación, es la liberación de las células germinales al interior de los túbulos seminíferos (Sorensen, 1982; Hafez, 1989). La duración de la espermatogénesis; un ciclo completo de espermatogénesis es determinado por el tiempo de los estadios llamados “ciclos del epitelio seminífero”, el tiempo necesario para completar un ciclo del epitelio seminífero varía según las diferentes especies domesticas: cerca de 9 días en el verraco, 10 días en el carnero, 12 días en el garañón y 14 días en el toro. Según la especie, se requieren de cuatro a cinco ciclos del epitelio seminífero antes de la espermatogonia tipo A del primer ciclo haya completado la metamorfosis de la espermiogénesis, aunque hay diferencias de velocidad de espermatogénesis el proceso es uniforme en cada especie (Galina et al., 1995; Hafez, 1989). La duración de la espermatogénesis se ha estimado en 54 a 63 días en los toros, 64 a 74 días en el hombre, 40 a 49 días en los carneros y 38 a 44 días en el ratón (Salisbury et al., 1982).

2.1.4.2. Fisiología reproductiva de la hembra

2.1.4.2.1. Comportamiento sexual de la hembra

Los camélidos domésticos, al ser especies de ovulación inducida no presentan ciclos estrales definidos, no obstante, existen periodos de receptividad sexual. Estos periodos son bastante prolongados durante la época de apareamiento y en ausencia de machos pueden durar hasta los 36 días presentando breves interrupciones que no sobrepasan de 2 días (Novoa, 1989). Uno de los problemas más frecuentes se debería a ondas foliculares continuas de larga duración con presencia aparente de un folículo estrogénico y su consiguiente secreción de estrógenos, (Novoa, 1989; Fernández Baca, 1993).

La receptividad sexual no siempre está asociada con la presencia de un folículo dominante (Sumar, 1983), mientras que la no receptividad es una característica diferencial entre hembras preñadas y vacías; puesto que se considera que dentro de los 18 a 20 días posteriores a la monta, cuando la receptividad no está presente es debido a la preñez, por el efecto inhibitorio de la progesterona (Fernández Baca, 1971).

2.1.4.2.2. Folículo ovárico

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios. La foliculogénesis, se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular. Abarca desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo pre-ovulatorio (Gigle et al., 2006).

Los folículos se clasifican en primordiales, primarios, secundarios y terciarios de acuerdo a las características histológicas de las células de la granulosa que rodean al ovocito y al grado de maduración del mismo. Durante la vida fetal se produce la diferenciación de los folículos primordiales. Algunos folículos comienzan a diferenciarse en primarios y secundarios debido a que la primera activación folicular es en principio gonadotrófica independiente. La activación de los folículos terciarios ocurre en forma de ondas y es gonadotrófica dependiente. Varios folículos comienzan a crecer simultáneamente hasta que uno de ellos se diferencia en dominante y otros se atresian (Gigle et al., 2006).

2.1.4.2.3. Dinámica folicular

En los camélidos, la hembra al no ser expuesta al macho desarrolla ondas foliculares sucesivas en tres fases de desarrollo, para lo cual un grupo de folículos son reclutados, de ellos es seleccionado uno e inicia su

crecimiento, diferenciándose y alcanzando el tamaño ovulatorio (igual o mayor a 7 mm de diámetro); mientras que los demás regresionan (Bravo et al., 1990; Fernández Baca, 1993; Brown, 2000). Las tres fases o estadios descritos son: crecimiento, estática y regresión (Bravo et al., 1990; Novoa, 1991). En el estadio estático o de maduración el folículo dominante inhibe el desarrollo de los folículos más pequeños (Bravo et al., 1990). La activación y crecimiento simultánea de un grupo de folículos terciarios que en un punto divergen continuando uno de ellos su crecimiento y diferenciación (folículo dominante) mientras que los otros (folículos subordinados) se atresian. A medida que los estudios moleculares fueron avanzando, han permitido determinar que los folículos secundarios ya expresan receptores para FSH y requieren de su estimulación para formar la cavidad antral (Gigli et al., 2006).

La duración de la onda folicular promedio fue de 11.1 ± 1.2 días, en donde la duración de la fase de crecimiento, estática y regresión folicular promedio fue de 4.9 ± 0.9 , 3.6 ± 0.6 y 2.8 ± 0.6 días respectivamente (Hanco, 2014). En estudios reportados por Vaughan et al. (2004) quienes refieren una duración de la onda folicular en promedio de 15.4 ± 0.5 días, siendo la fase de crecimiento, estática y regresión 7.0 ± 1.0 , 4.5 ± 0.5 y 3.0 ± 1.0 días respectivamente.

2.1.4.2.4. Ovulación

Las alpacas presentan ovulación inducida por la monta del macho y un factor de inducción de ovulación en el plasma seminal del macho (England et al., 1968). La ruptura folicular (ovulación), ocurre alrededor de las 26 horas después de la monta, la falla en la respuesta ovulatoria pos monta,

alcanza un valor de 20% en hembras multíparas, y un 74% en hembras juveniles (35kg de peso) y un 33% no ovulan en períodos de lactación (Bravo y Sumar, 1989). En ausencia del macho, las alpacas hembras pueden permanecer en estro hasta más de 30 a 40 días, con periodos ocasionales de anestro que no suelen durar más de 48 horas (Novoa, 1998).

También se sabe que algunas alpacas pueden ovular sin el estímulo coital, cuando han estado inicialmente aisladas del macho y que, al ser expuestas a un macho sin permitir la intromisión del pene, se observó hasta un 5% de ovulaciones llamadas espontáneas (Sumar, 1983).

Para la inducción de ovulación en alpacas también se utilizó hormonas, logrando inducir la ovulación con 1 mg de LH y también con el uso de GnRH en una dosis de 4 a 8 ug para provocar el estímulo adecuado para la ovulación (Hafez, 2002).

Se menciona que con la aplicación de gonadotropina coriónica humana hCG 750 UI provoca la ovulación, así mismo el uso de GnRH en dosis de 4 a 1000 ug resultan ser tan efectivas para la ovulación como el acto de la cópula (Bravo, 2002). Otros autores indican haber utilizado 0.006 mg o 12 pg de GnRH para inducir la ovulación (Cárdenas, 2002).

Existen fallas ovulatorias pos cópula, que no han sido totalmente explicadas, señalándose que podría ser atribuida a una sensibilidad disminuida de los folículos a los niveles circulantes de LH debido a las variaciones en los estadios de maduración folicular (Novoa, 1989).

Ratto et al., (2005) al realizar la comparación de métodos de inducción de ovulación con macho y el uso de 5 mg de LH, 50 ug de GnRH en llamas, encontró 80%, 91% y 80% de ovulación en cada grupo respectivamente

dicho autor indica que no existe diferencia entre los diferentes métodos de inducción de ovulación, así mismo no hubo diferencia en el diámetro máximo de los cuerpos lúteos posteriores a la inducción de ovulación.

2.1.4.3. Ultrasonido o ecografía

La introducción de tecnologías modernas en reproducción animal, como la ultrasonografía, ha permitido mejorar sustancialmente los índices de eficiencia reproductiva en diversas especies domésticas. Los principales avances introducidos por la ultrasonografía, que han tenido impacto sobre la eficiencia reproductiva, son: reconocimiento de la calidad estructural y funcional de las gónadas y tracto reproductivo en muchas especies domésticas con la ultrasonografía transrectal se ha estudiado en camélidos sudamericanos eventos reproductivos tales como el desarrollo de los folículos ováricos, la ovulación, el desarrollo y regresión del CL, la preñez temprana y mortalidad embrionaria, entre otros (Bourke et al., 1992).

La ecografía es el más fiable de los métodos de diagnóstico de la preñez. El diagnóstico precoz y exacto de la gestación es importante para un manejo efectivo de la reproducción. Una ecografía devuelve una "imagen" de los órganos internos y cualquier feto que pueda estar presente. La ecografía transrectal se puede realizar desde 15 a 20 días después del servicio; sin embargo, los operadores muy calificados pueden ser capaces de detectar gestaciones desde los 7-9 días utilizando esta técnica. La ecografía transabdominal puede detectar la preñez desde los 40 días pos servicio (Bustinza, 2001).

En alpacas el método del ultrasonido revela una seguridad del 89% a partir de los 70 días de gestación hasta los 110 días (Alarcón et al., 1989) y de

92% a los 80 días (Ampuero et al., 1989); por el método de la ecografía con un transductor de 5 MHz se puede encontrar la vesícula embrionaria desde el día 17 y la presencia del embrión desde el día 30 (Cárdenas et al., 2003).

2.1.4.4. Fertilidad

La estimación de la fertilidad se hace en base a los animales empadrados o inseminados y los animales fecundados, datos que se puede expresar porcentualmente. La fertilidad de un hato se evalúa en términos de porcentajes de hembras preñadas y el tamaño de las camadas. Estos parámetros aumentan durante algunos años después de la pubertad, alcanzando un máximo y luego disminuye lentamente, (Hafez, 2005).

2.1.4.5. Fecundidad y fertilidad

Estudios hechos en alpacas por Bravo et al. (1996) han demostrado que luego de la cópula, los espermatozoides permanecen en los cuernos uterinos las primeras 12 horas; luego, más del 90% avanza hacia los oviductos, específicamente a la unión útero-tubal y el istmo, siendo la concentración máxima a las 18 horas. Los mismos autores describieron el desarrollo del embrión después de la fecundación en alpacas, observando que el día 4 pos monta el óvulo fecundado aparece en estadio de mórula con 4-8 blastómeros en el oviducto, al día 7 aparece como una mórula compacta todavía en el oviducto y al día 10 el embrión ya se encuentra en el cuerno uterino y de mayor tamaño.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MEDIO EXPERIMENTAL

3.1.1. Ubicación

El trabajo de investigación fue realizado en el Centro de Investigación y Producción “La Raya” de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional del Altiplano ubicado en el distrito de Santa Rosa, Provincia de Melgar, Región Puno a una altura entre 4136 a 5470 m.s.n.m.; localizado en las Coordenadas 14°30’33’’ de Latitud Sur, y a 70°57’12’’ Longitud Oeste; encontrándose en el km 205 de la carretera Puno- Cusco. La temperatura anual promedio fue de 6.20°C (máxima de 14.16°C y mínima de -1.75°C) y una precipitación pluvial de 525.7 mm (SENAMHI 2016).

Las muestras de semen fueron evaluadas en el laboratorio de reproducción del Centro Experimental La Raya de la Universidad Nacional San Antonio Abad de Cusco (UNSAAC).

El análisis de la concentración de proteína total y energía bruta de insumos alimenticios para la suplementación y análisis de las muestras de suero sanguíneo, se realizó en el Laboratorio de Nutrición y Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano.

3.1.2. Instalaciones

El Centro de Investigación y Producción “La Raya” cuenta con corrales implementados (con paneles), comederos lineales (de seq’as) que se adecuaron por corral y bebederos (lavadores) para la alimentación de los animales en tratamiento.

3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL

3.2.1. Animales

Se seleccionaron 8 alpacas machos (reproductores) y 120 alpacas hembras con crías recién nacidas, distribuidos al azar en dos grupos de tratamiento (sin y con dieta suplementada) tabla 1.

Tabla 1: Distribución de los animales experimentales por sexo y alimentación

TRATAMIENTO	Pastos naturales (PN)	Pastos naturales (PN) + Dieta suplementada (DS)	TOTAL
	T1	T2	
MACHOS	4	4	8
HEMBRAS	60	60	120
TOTAL	64	64	128

T1=(n=64) alpacas al pastoreo en pastos naturales.

T2=(n=64) alpacas al pastoreo + dieta suplementada.

Los animales tanto machos y hembras fueron identificados mediante una numeración de 1 a 8 para machos y de 1 a 60 para hembras marcadas en el cuerpo (costillar medio) con pintura de diferentes colores (rojo y verde) respectivamente por grupo experimental, identificación que facilitó la toma de datos.

3.2.2. Alimentos

La dieta suplementada fue elaborada en base a forrajes como heno de avena (*Avena sativa*) y heno de alfalfa (*Medicago sativa*), procesados mecánicamente con un molino/picador forrajero Trapp TRF-800 a 12mm Ø de tamaño de partícula.

Los análisis químicos del alimento, fueron a través de los métodos oficiales de la AOAC (2005), obteniéndose los datos según Tabla 2. El procedimiento de la determinación de EB y EM se encuentra (Anexo 1).

Tabla 2: Composición química en los forrajes – insumos analizados

Forrajes-insumos	Materia	Proteína	EB	EM*
	Seca %	total %	Kcal/kg	Kcal/kg
Alfalfa heno	95	19.0	4271	2334
Avena heno	96	6.9	4110	2246
Minerales-vitaminas	98	-	-	-

*, EMkcal/kg=0.5465(EB), NRC (1984)

El cálculo de la dieta suplementación tanto para alpacas hembras y machos fue realizado en base a las dietas planteadas y composición química de los forrajes – insumos (Tabla 2).

La dieta suplementaria ofrecida, estuvo conformada por una mezcla de heno de avena, heno de alfalfa y minerales- vitaminas (Tabla 3).

Tabla 3: Fórmula alimenticia del suplemento para alpacas

Forrajes – Insumos	Mezcla %	PC%	EM kcal/kg
Alfalfa heno	59	11.21	1377.06
Avena heno	40	2.76	898.40
Minerales-vitaminas	1	-	-
Total	100	13.97	2275.46
Total/ kg	1	0.1397	22.7546

En la preparación de la dieta suplementada, primeramente, se realizó el pesado de las cantidades de forrajes - insumos calculados (Tabla 3), los mismos mezclados manualmente (pala), luego almacenados momentáneamente en sacos hasta el término de suministro y consumo por las alpacas experimentales.

3.2.2.1. Acostumbramiento de animales a la dieta suplementada

El periodo de acostumbramiento se realizó durante 14 días, con la proporción de mezclas de forrajes (heno de alfalfa y avena).

Inicialmente los animales consumieron lo mínimo debido a que mostraron cierto estrés al cambio de ambiente (corrales, comederos y personal), es decir a un manejo diferente donde a poco se fueron acostumbrando al consumo de la dieta suplementada y al cabo de dos semanas todos los animales se iban directamente hacia los corrales consumiendo a plenitud la dieta suplementada.

3.2.2.2. Suministro de la dieta suplementada

Los animales del grupo control (T1) de 4 machos y 60 hembras fueron pastoreados sobre pastos naturales y los animales del grupo (T2) igual de 4 machos y 60 hembras fueron pastoreados en pastos naturales después de haber sido suplementados con 14% Proteína cruda (PC) y 2275.46 de energía metabolizable (EM) en kilocalorías (Kcal)/Kg.

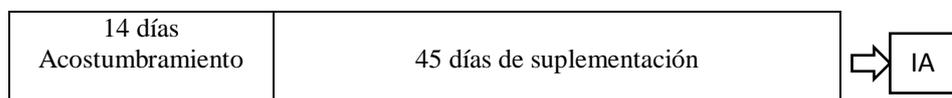
La dieta suplementada inicialmente fue suministrada en la cantidad de 3 Kg (durante la primera semana) por corral para 15 alpacas, lo que es equivalente a 200 g/alpaca, desde las 6.00 a 9.00 horas del día, con la separación previa de las crías en la puerta de los corrales.

La dieta suplementada se incrementó hasta 5 Kg (hasta los 45 días de suministro) por corral, es decir 0.333 Kg/alpaca. El peso de la dieta residual (no consumida o rechazada) fue registrado cada día, para determinar la cantidad de consumo de la dieta suplementaria en grupo o individual.

La dieta suplementada para machos fue suministrada en forma individual en la cantidad de 300g/alpaca (durante la primera semana) y luego se

incrementó a 500 g/alpaca (hasta los 45 días de suministro) en la misma hora que para hembras.

Tanto para machos y hembras la suplementación de la dieta fue suministrada por 45 días, luego se procedió con la inseminación artificial.



Dentro del manejo de animales después del consumo de la dieta suplementada, a partir de las 9.00 horas del día fueron llevadas al campo para su pastoreo sobre pastizales naturales (Bautista et al., 1997) hasta las 17 horas hasta el momento del encierro (dormidero).

3.2.3. Materiales y equipos

3.2.3.1. Para picado de forraje

- Molino/picador forrajero Trapp TRF-800.
- Sacos
- Mantas

3.2.3.2. Para colección de semen

- Espéculo vaginal
- Fuente de luz adecuada
- Tubos colectores de semen de 15 ml

3.2.3.3. Para evaluación de semen

- Láminas porta objetos
- Láminas cubre objetos
- Micro pipetas
- Jeringas de 5 y 10 ml
- Cámara Newbauer
- Papel toalla
- Tips
- Gradilla
- Tubos de ensayo
- Contador de hematocrito

- Microscopio

- Baño maría

3.2.3.4. Para dilución de semen

- TRIS

- Fructosa

- Yema de huevo

3.2.3.5. Reactivos

- Colorante Eosina-Nigrosina

- Cloruro de sodio Cl Na 5%

- Coloración de diff Quick

3.2.3.6. Para ecografía

- Mesa

- Jeringa 10 ml

- Vaso

- Gel

- Ecógrafo ALOKA SSD 500 de un transductor transrectal de 5 MHz.

3.2.3.7. Para inducción de la ovulación

- Conceptase

3.2.3.8. Para muestreo de sangre

- Equipo vacutainer (tubos y agujas)

- Alcohol yodado

- Agujas hipodérmicas N° 18 x 1”1/2

- Torundas de algodón

- Caja de tecnopor

- Hielo

- Gradillas

- Guantes quirúrgicos

- Cinta de papel

- Lápiz, lapicero indeleble

3.2.3.9. Para conservación y análisis de nitrógeno ureico en suero sanguíneo

- Centrífuga

- Viales de plástico

- Tubos de prueba
- Pipetas de 0.5, 1.5 y 10 ml.
- Congeladora
- Cinta de papel
- Lápiz, lapicero indeleble
- Jeringas de 1 ml
- Espectrofotómetro
- Baño María
- Homogeneizador
- Gradillas
- Pipetas automáticas
- Tubos de prueba de 5 y 10 mL.
- Reloj
- Papel absorbente

3.2.3.10. Reactivos para determinación de nitrógeno ureico

- Reactivo 1: Ácido Salicílico y Nitroprusiato.
- Reactivo 2: Hipoclorito e hidróxido de sodio (NaOH).
- Stándar: Solución de urea 66 mg/dL.
- Agua destilada.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Evaluación de la calidad de semen

La evaluación de la calidad de semen se realizó al inicio y final (45 días) de la suplementación alimenticia en ambos grupos experimentales.

3.3.1.1. Colección de semen por aspiración vaginal pos cópula:

La metodología seguida para la colección de semen según Neely y Bravo (1998) comprende los siguientes pasos:

- Para la colección de semen fue necesario que el macho realice la monta hasta su culminación.

- Culminada la monta inmediatamente fue introducido vía vaginal un espéculo debiendo alcanzar hasta la cérvix, simultáneamente fue levantada la parte anterior (tren anterior) del animal a una altura adecuada de tal manera que pueda bajar por gravedad el semen hacia el tubo colector previamente calentado a temperatura adecuada de 25°C.
- Luego fue llevado hacia el microscopio para su evaluación.

3.3.1.2. Evaluación macroscópica

3.3.1.2.1. Volumen

- La cantidad de volumen de semen colectado de cada animal (6 machos), se determinó a la lectura del tubo colector graduado. Cabe indicar que el volumen de semen es variable entre colecciones en el mismo animal ya que el semen contiene flujo vaginal en gran proporción considerado como un volumen relativo.

3.3.1.3. Evaluación microscópica

3.3.1.3.1. Motilidad individual

La determinación de la motilidad espermática de cada animal (6 machos), se realizó inmediata a la colección del semen, con el procedimiento siguiente:

- Se colocó una gota de semen en una lámina portaobjetos, luego se cubrió con una lámina cubreobjetos (ambas precalentadas a 37 °C).
- Se examinó primero a un aumento de 100X y luego a 400X en tres campos como mínimo y se contabilizaron los espermatozoides motiles y a los que no presentaron movimiento hasta un número de 100 espermatozoides.
- Una vez concluida la lectura, se determinó el porcentaje de motilidad individual a través de la fórmula siguiente:

$$MI = \frac{n}{N} \times 100$$

MI = % motilidad individual.

n = Número de espermatozoides motiles.

N = Número total de espermatozoides.

3.3.1.3.2. Concentración

La concentración espermática de cada animal (6 machos), fue determinada por la técnica del hemocitómetro de la siguiente manera:

- Con la utilización de micro pipeta automática, se aspiró 990µl C1Na al 5%, colocándose a los tubos de ensayo.
- De la misma forma, se aspiró 10µl de semen, para colocar en tubos de ensayo con C1Na al 5%.
- Se dejó en reposo durante 5 minutos.
- Posteriormente fue homogenizado y se aspiró 10µl de mezcla.
- Luego se dejó caer una gota en cada extremo de la cámara de Neubauer, estas gotas por capilaridad cubrieron el área determinada de la cámara.
- Se dejó reposar de 3 a 4 minutos antes de proceder con el recuento, en 5 de los 25 cuadrantes. El número de espermatozoides contadas fue multiplicado por el factor 10 000 para denotar el número de espermatozoides por mm³, aplicando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{CI + CII}{2} \times 10,000$$

C = Concentración

CI = Total de la cámara 1

CII = Total de la cámara 2

3.3.1.3.3. Vitalidad

La vitalidad espermática de cada animal (6 machos), se determinó por la técnica de coloración Eosina – Nigrosina aplicando los siguientes pasos:

- Una gota de semen fue mezclada con una gota de colorante sobre una lámina portaobjetos precalentada a 37 °C y luego se dejó reposar por 10 segundos.
- Pasado ese tiempo se realizó el frotis utilizando una lámina portaobjetos limpio colocando a un ángulo de 45 ° y se arrastró hacia adelante.
- Luego del secado se procedió a realizar la lectura de la lámina contando 100 espermatozoides para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos a través de la siguiente fórmula:

$$\% V = \frac{n}{N} \times 100$$

% V = % de espermatozoides vivos

n = Número de espermatozoides vivos

N = Número total de espermatozoides

3.3.1.3.4. Anormalidades

Para determinar las anormalidades espermáticas de cada animal (6 machos), se utilizó la coloración Diff Quick, siendo el procedimiento de la siguiente manera:

- Se utilizó la misma lámina leída para la característica de motilidad (se realizó el frotis sin coloración inmediata a la evaluación).
- La lámina fue colocada en el fijador 1, durante 1 minuto.
- Seguidamente fue colocada en la coloración Eosina, durante 1 minuto.

- Luego fue sometida a la coloración Nigrosina, durante 1 minuto.
- Finalmente se dejó secar durante 5 a 10 minutos y se realizó el conteo de los espermatozoides con anormalidades y según la siguiente fórmula:

$$X = \frac{n \times 100}{N}$$

X = % de anormalidades

n = Número de espermatozoides anormales

N = Número total de espermatozoides

3.3.2. Determinación de la actividad ovárica (tamaño y número de folículos)

Después del descanso pos parto de 15 días se inició con la evaluación por ecografía para ver la actividad ovárica, tamaño y número de folículos al mismo tiempo se diagnosticó si presencia o no metritis para su tratamiento. El tamaño y número de folículos fueron evaluados en 30 alpacas hembras de PN y 30 alpacas de PN + DS una vez por semana desde el inicio de la dieta suplementada hasta los 45 días, (momento de la inseminación artificial). La evaluación de la actividad ovárica se realizó de la siguiente forma:

- Se identificó a los animales previos a la ecografía.
- Se colocó Gel a la entrada del recto de la alpaca mediante una jeringa (10ml).
- Se introdujo el transductor lineal rígido por el recto de la alpaca
- Ambos ovarios de cada alpaca fueron explorados ultrasonográficamente para la medición del tamaño y número folicular.
- Las imágenes fueron tomadas con una cámara fotográfica.

3.3.3. Determinación de la tasa de fertilidad

3.3.3.1. Distribución de animales por tipo de alimentación para la inseminación artificial

Los animales fueron distribuidos según la tabla 4 siguiente:

Tabla 4: Distribución de machos y hembras por tipo de alimentación

N° de machos PN		N° de machos PN+DS	
4		4	
N° de hembras PN	N° de hembras PN+DS	N° de hembras PN	N° de hembras PN+DS
28	25	27	28

PN= pasto natural, PN+DS= pasto natural + dieta suplementada

3.3.3.2. Inducción de la ovulación

A los 45 días de suplementación alimenticia, se procedió con la inseminación artificial previa inducción de la ovulación de las 30 hembras (24 horas) mediante GnRH (conceptase) a dosis de 1mL vía intramuscular (Bravo, 2002).

3.3.3.3. Inseminación artificial

Según la metodología utilizada por Bravo et al., (2008):

- Se colectó semen de machos pos cópula, seguidamente se evaluó la motilidad y luego se realizó la dilución (TRIS, fructosa, yema de huevo).
- Para la inseminación artificial se armó la pipeta de plástico adosados a una jeringa de 3 ml.
- Con la ayuda de 3 personas se realizó la sujeción para luego separar los labios vulvares e introducir el espéculo adaptado con fuente de luz lo que facilitó la observación de la cérvix introduciendo la pipeta hasta llegar a la parte craneal de la vagina próximo a la cérvix en el cual la pipeta fue dirigida hasta la cérvix donde se depositó la dosis de espermatozoides,

luego fue retirada la pipeta, procediéndose a realizar un ligero masaje a nivel de la zona del clítoris.

- Las hembras inseminadas fueron identificadas y registradas para la posterior determinación de la fertilidad por ecografía y seguimiento de la misma.

3.3.3.4. Evaluación de la fertilidad pos inseminación artificial

La fertilidad fue evaluada en ambos grupos de animales (con y sin dieta suplementada), a los 21 días pos inseminación artificial, para esta actividad las alpacas hembras fueron llevadas a un corral para su evaluación de la fertilidad con el uso de un ecógrafo (transductor lineal de 5MHZ).

A la ecografía se determinó la presencia de vesícula embrionaria con lo cual se confirmó la fertilidad de la hembra y en las hembras que no se observó la presencia de vesícula embrionaria se consideró como vacía.

Luego se determinó la tasa de fertilidad con la siguiente fórmula:

$$TF = \frac{\text{Número de hembras fertilizadas}}{\text{Número de hembras inseminadas}} \times 100\%$$

3.3.4. Determinación de nitrógeno ureico en suero sanguíneo

3.3.4.1. Muestreo de Sangre

La toma de muestras, se realizó antes y después de los 45 días de la dieta suplementada, estando los animales en ayunas, por diferentes grupos experimentales, con utilización del equipo vacutainer; para lo que fue necesario la sujeción de los animales previa desinfección a nivel de la vena yugular, luego por venipunción yugular se recogió la muestra en tubos vacutainer en la cantidad suficiente de 5 ml, las mismas debidamente identificadas fueron acondicionados y colocados en una caja de tecnopor con hielo para su envío al laboratorio.

3.3.4.2. Obtención de Suero sanguíneo

Las muestras obtenidas de 9 machos y 28 hembras de PN, 9 machos y 28 hembras en PN+DS, fueron centrifugadas a 3000 r.p.m., por un tiempo de 15 min. El suero obtenido se depositó en viales de plástico debidamente identificados que fueron conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, siendo enviados posteriormente al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

3.3.4.3. Análisis de suero sanguíneo

Se determinó la concentración de urea en las muestras de suero sanguíneo, mediante el método enzimático.

3.3.4.3.1. Método enzimático específico para la determinación

cuantitativa de urea en suero sanguíneo

La ureasa descompone específicamente a la urea produciendo dióxido de carbono y amoníaco, esta reacción con el salicilato e hipoclorito en medio alcalino, formándose un complejo de color verde. La intensidad del color producido es directamente proporcional a la cantidad de urea presente en la muestra, y su absorbancia.

3.3.4.3.2. Uso de Reactivos.

Según las instrucciones del protocolo indicado (Wiener lab., 2000).

- **Reactivo 1:** Disolver el contenido del frasco con agua destilada de acuerdo con las indicaciones del rotulo. Mezclar por inversión hasta la disolución completa.
- **Reactivo 2:** Diluir el contenido del frasco con agua destilada de acuerdo con las indicaciones del rótulo y mezclar por inversión.
- **Estándar:** Listo para usar.

- Muestra: Suero sanguíneo.

3.3.4.3.3. Condiciones de reacción

- Longitud de onda: 540 nm
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 20 min.
- Volumen de reacción: 12 mL.
- Volumen de muestra. 20uL.

El procedimiento del método enzimático es según la siguiente Tabla 5.

Tabla 5: Procedimiento para la determinación de nitrógeno ureico

	Blanco (B)	Estándar (S)	Muestra (M)
Estándar	-	20 uL	-
Suero	-	-	20 uL
Ureasa	1 gota	1 gota	1 gota
Mezclar por agitación suave e incubar 5 minutos a 37°C luego agregar:			
Reactivo 1	1 mL	1 mL	1 mL
Reactivo 2	1 mL	1 mL	1 mL
Mezclar por agitación suave e incubar 5 minutos a 37°C luego agregar:			
Agua destilada	10 mL	10 mL	10 mL
Mezclar por inversión y retirar del baño. Después de 10 minutos leer en espectrofotómetro a 540 nm, llevando a cero con el blanco			

Wiener lab., (2000).

Medir la absorbancia de blanco (reactivos).

Medir la absorbancia neta de estándar (ANE):

$$\text{ANE} = \text{Absorbancia de estándar} - \text{absorbancia de blanco.}$$

Medir la Absorbancia neta de muestras de suero sanguíneo (ANM):

$$\text{ANM} = \text{Absorbancia muestras} - \text{absorbancia de blanco.}$$

3.3.4.3.4. Cálculo de resultados

La concentración de urea en las diferentes muestras de suero sanguíneo, se determinaron utilizando las siguientes fórmulas:

Cálculo de Factores:

$$\text{Factor BUN} = (30 \text{ mg/dL}) / \text{ANE}$$

Cálculo de concentración:

$$\text{Nitrógeno Ureico (BUN) mg/dL} = \text{Factor BUN} * \text{ANM}$$

3.4. VARIABLES DE MEDICIÓN

- Características seminales (volumen, motilidad, concentración espermática, vitalidad espermática, y anomalías espermáticas).
- Actividad ovárica (tamaño y número de folículos).
- Tasa de fertilidad a los 21 días pos inseminación artificial.
- Concentración de nitrógeno ureico mg/100 mL en suero sanguíneo de alpacas machos y hembras.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

3.5.1. Calidad de semen

3.5.1.1. Volumen, Motilidad, concentración espermática, vitalidad y morfología espermática

Los datos porcentuales para su comparación a través de las pruebas de comparación de medias, fueron primeramente transformados a valores angulares, para luego ser analizado a través de la prueba estadística de “t” (Student); mediante la fórmula siguiente:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{Sc \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \rightarrow t_{\alpha, n - 2gl}$$

Dónde:

t : Valor de la prueba t

\bar{X}_1 : Promedio del grupo N° 1

\bar{X}_2 : Promedio del grupo N° 2

n_1 : Número de repeticiones del grupo N° 1

n_2 : Número de repeticiones del grupo N° 2

S_c : Varianza común

$t_{\alpha, n - 2gl}$: Valor tabular de t con n-2 grados de libertad

3.5.2. Actividad ovárica

El tamaño y número folicular fue determinado bajo un arreglo factorial de 2 x 2 conducido bajo Diseño Completamente al Azar utilizando el programa estadístico SAS, cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$X_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$$

$i = 2$ tipos de alimentos (Pasto natural y pasto natural + suplementada)

$j = 2$ lados de ovario (derecho e izquierdo)

$k = 1, 2, 3 \dots 30$ repeticiones

Dónde:

X_{ijk} = Variable respuesta (Tamaño folicular y número folicular)

μ = Promedio general del experimento

A_i = Efecto de las dietas (pasto natural y pasto natural + suplementada)

B_j = Efecto de los lados de ovario (Derecho e izquierdo)

AB_{ij} = Efecto de interacción tipo de alimentación y lado de ovario

E_{ijk} = Efecto del error experimental

Para contrastar las diferencias estadísticas entre promedios se utilizó la Prueba de Significancia de Tukey a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

3.5.3. Tasa de fertilidad en alpacas hembras

Los datos de la variable de tasa de fertilidad se procesaron mediante la prueba estadística de “Ji – cuadrado”, cuya fórmula fue el siguiente:

$$\chi^2 = \sum \sum \frac{(o_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}}$$

Dónde:

χ^2_c = Ji – Cuadrado calculado.

O_i = Valores observados de la i-ésima clase

E_i = Valores esperados en la i-ésima clase

$\Sigma\Sigma$ = Sumatoria

3.5.4. Nitrógeno ureico en suero sanguíneo

La determinación de nitrógeno ureico fue analizada mediante el arreglo factorial de 2 x 2 conducido bajo Diseño Completamente al Azar utilizando el programa estadístico SAS, cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$X_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + E_{ijk}$$

i = 2 tipos de alimentos (pasto natural y pasto natural + suplementada)

j = 2 sexo (machos y hembras)

k = 1, 2, 3... 30 repeticiones

Dónde:

X_{ijk} = variable respuesta

μ = Promedio general del experimento

A_i = Efecto de las dietas (Pasto natural y pasto natural + suplementada)

B_j = Efecto sexo (Macho y hembra)

AB_{ij} = Efecto de interacción tipo de alimento y sexo

E_{ijk} = Efecto del error experimental

Para contrastar las diferencias estadísticas entre promedios se utilizó la

Prueba de Significancia de Tukey a un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CALIDAD DE SEMEN

4.1.1. Evaluación macroscópica

4.1.1.1. Volumen

El volumen de semen (Tabla 6) por efecto de tipo de alimentación, al final del trabajo a los 45 días en alpacas con alimentación en pastos naturales fue de 3.67 ± 1.89 mL y en animales en pastos naturales + dieta suplementada fue 1.83 ± 1.26 mL, no habiendo diferencia, entre grupos de animales.

Tabla 6: Volumen de semen por tipo de alimentación, mm³.

Tipo de alimentación	n	Inicio		45 días	
		\bar{X}	$\pm S$	\bar{X}	$\pm S$
Pastos naturales	3	0.87	± 0.55	3.67	± 1.89
Pastos naturales +Dieta suplementada	3	1.37	± 0.32	1.83	± 1.26

($P > 0.05$)

El método con la que fue colectada el semen (Aspiración vaginal pos coital) no permitió obtener un volumen real, considerando que el semen fue diluido con secreciones del tracto genital de la hembra, observándose de un color rosado a rojizo por efecto de la monta.

4.1.2. Evaluación microscópica

4.1.2.1. Motilidad

La motilidad espermática por efecto de tipo de alimentación, a los 45 días en alpacas pastoreados en pastos naturales fue 80.0% y en pastos naturales + dieta suplementada fue 83.3%, resultados sin diferencia estadística. Por tanto, concluimos que la suplementación alimenticia no tuvo influencia en los valores de motilidad espermática.

Tabla 7: Motilidad por tipo de alimentación, %.

Tipo de alimentación	n	Inicio	45 días
Pastos naturales	3	80.0	80.0
Pastos naturales + Dieta suplementada	3	63.3	83.3

(P>0.05)

Los resultados encontrados en el presente estudio (Tabla 7) son superiores al estudio de Bravo y Alarcón (2015), quienes proporcionaron suplementos nutritivos obteniendo una motilidad de 50% en machos suplementados con Preñatec, 33% en machos suplementados con Catosal y 24.4% en machos control. Los mismos alimentados en pasturas naturales y la suplementación nutritiva fue vía intramuscular con 4 mL de suplemento cada semana por 6 semanas, antes del empadre. Diferencias que se deberían al tipo del suplemento que recibieron.

4.1.2.2. Concentración espermática

La concentración espermática (Tabla 8) en alpacas por efecto del tipo de alimentación, al final del trabajo a los 45 días en alpacas pastoreados en pastos naturales fue 13'333,333 esp/mm³ y en pastos naturales + dieta suplementada fue 54'000,000 esp/mm³, resultados sin diferencia estadística.

Tabla 8: Concentración espermática por tipo de alimentación esp/mm³

Tipo de alimentación	n	Inicio	45 días
Pastos naturales	3	15'000,000	13'333,333
Pastos naturales + Dieta suplementada	3	7'333,333	54'000,000

(P>0.05)

Los resultados obtenidos en el estudio son inferiores a los estudios realizados con suplementos nutritivos (Bravo y Alarcón, 2015) quienes obtuvieron una

concentración de 192 millones en machos suplementados con Preñatec, 82 millones en machos suplementados con Catosal y 60 millones en machos control, mantenidas sobre pastos naturales y la suplementación nutritiva antes del empadre; diferencia expectante a los resultados del presente estudio que se deberían al tipo del suplemento que recibieron.

4.1.2.3. Vitalidad espermática

La vitalidad espermática en alpacas por efecto del tipo de alimentación, a los 45 días de alimentación en pastos naturales fue de 89% y en pastos naturales + dieta suplementada fue de 96%, no habiendo diferencia.

Tabla 9: Vitalidad espermática por tipo de alimentación, %.

Tipo de alimentación	n	Inicio	45 días
Pastos naturales	3	95	89
Pastos naturales + Dieta suplementada	3	86	96

($P > 0.05$)

Los resultados del trabajo de investigación (Tabla 9) son similares al estudio realizado (Bravo y Alarcón, 2015) con suplementos nutritivos donde obtuvieron una vitalidad de 86% en machos suplementados con Preñatec, 80% en machos suplementados con Catosal y 88.8% en machos control, siendo mantenidas sobre pastos naturales y la suplementación nutritiva antes del empadre. Similitud que sería debido a la suplementación alimenticia.

4.1.2.4. Morfología espermática

La morfología espermática observada fue referido a espermatozoides normales y anormales en alpacas por efecto del tipo de alimentación, a los 45 días de alimentación en alpacas en pastos naturales fue de 81% y en pastos naturales + dieta suplementada fue de 86%, no habiendo diferencia.

Tabla 10: Morfología espermática por tipo de alimentación, %.

Tipo de alimentación	Variables	n	Inicio	45 días
Pastos naturales	Normales	3	88	81
Pastos naturales + Dieta Suplementada	Normales	3	88	86

(P>0.05)

Los resultados del estudio (Tabla 10) son similares al estudio de Bravo y Alarcón, (2015) realizado con suplementos nutritivos donde obtuvieron espermatozoides normales de 72 % en machos suplementados con Preñatec, 70.2 % en machos suplementados con Catosal y 69.1% en machos control, mantenidas en pastura natural y la suplementación nutritiva antes del empadre.

4.2. ACTIVIDAD OVÁRICA (TAMAÑO Y NÚMERO FOLICULAR)

4.2.1. Tamaño folicular

En alpacas al pastoreo en pastos naturales + dieta suplementada (Tabla 11) se encontró mayor tamaño folicular de 9.12 ± 3.53 mm de diámetro comparado con las alpacas alimentadas en pastos naturales que mostraron 6.30 ± 1.99 mm, existiendo diferencia ($P \leq 0.05$).

Tabla 11: Tamaño folicular (mm) y número folicular por efecto del tipo alimentación.

Variable de medición	n	Pastos naturales + dieta suplementada	Pastos naturales
		$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$
Tamaño de folículos por ovario	60	$9.12^a \pm 3.53$	$6.30^b \pm 1.99$
Número de folículos por ovario	60	$1.19^a \pm 0.28$	$1.11^a \pm 0.27$

Los resultados encontrados en el estudio son similares a los resultados obtenidos por Llacsá, (2012), quien realizó estudios en alpacas alimentadas

con suplementación energética dónde tuvieron un mayor tamaño folicular de 9.14 ± 1.95 y las que no tuvieron suplementación 8.14 ± 1.59 mm de diámetro ($P=0.0123$). Sin embargo, los resultados del estudio son superiores al reporte de Machaca et al. (2015), quienes evaluó mediante ecógrafo registrando el tamaño máximo del folículo dominante de 7.3 ± 0.67 y 7.1 ± 0.4 mm en animales con y sin suplementación respectivamente. En estudios recientes indican que el diámetro del folículo dominante en alpacas es de 10.3 ± 1.6 mm con una alimentación sobre pastos naturales y suplementados con heno de avena y alfalfa durante 60 días (Hanco, 2014). Diferencias que se deberían a diversos factores, como la misma dieta suplementaria, tiempo de la suplementación, lugar de estudio y la metodología empleada.

4.2.2. Número folicular.

Se evidencia que las alpacas (Tabla 11) al pastoreo en pastos naturales + dieta suplementada mostraron 1.19 ± 0.28 folículos comparado a la de alpacas alimentadas a base de pastos naturales que lograron desarrollar 1.11 ± 0.27 folículos, no habiendo diferencia.

Los resultados encontrados en el estudio (Tabla 11) son inferiores a los encontrados por Llacsá, (2012) con valores de 1.52 ± 0.43 y 1.31 ± 0.29 folículos dominantes para alpacas con y sin suplemento energético ($P=0.021$) respectivamente, diferencias que se deberían a la dieta suplementada, tiempo de la suplementación, lugar de estudio y metodología empleada.

4.3. TASA DE FERTILIDAD POR INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (21 DÍAS)

La fertilidad de alpacas pos inseminación artificial (Tabla 13), donde los grupos machos y hembras al pastoreo en pastos naturales + dieta suplementada, asimismo machos y hembras al pastoreo en pastos naturales fueron similares,

coincidentalmente ambos grupos con 35.71%; mientras el grupo de machos en pastos naturales y hembras al pastoreo en pastos naturales+ dieta suplementada alcanzaron un 36.0%, y los machos en pastos naturales + dieta suplementada y hembras sobre pastos naturales mostraron 40.74%; los mismos a un análisis estadístico no mostraron diferencias.

Tabla 12: Tasa de fertilidad de alpacas por inseminación artificial, por efecto de tipo de alimentación, %.

Tratamientos (alimentación)	Nº de hembras inseminadas	% de hembras fertilizadas
Machos y hembras PN	28	35.71
Machos PN y hembras PN+ SD	25	36.00
Machos PN + DS y hembras PN	27	40.74
Machos y hembras DS	28	35.71

$X^2_c = 0.22$ $X^2_{t0.05,3} = 7.81$ (P>0.05)

En la actualidad no existe información disponible sobre el efecto de la suplementación alimenticia en la fertilidad de alpacas por inseminación artificial. Los resultados obtenidos (tabla 13) en el estudio son similares al estudio realizado por Pérez et al., (2008) quienes en 11 alpacas inseminadas con semen colectado de los conductos deferentes y diluido, obtuvieron 36.36 % de gestación a los 30 días pos inseminación.

Aller et al., (2003) en un estudio con 38 llamas, tratadas con un análogo de GnRH para inducir la ovulación, las mismas inseminadas artificialmente a las 24 horas con semen fresco diluido en yema de huevo citrato glucosa glicerol DMSO a una dosis de 25 millones de espermatozoides por pajilla; realizado el diagnóstico de gestación mediante palpación transrectal a los 60 días post inseminación artificial, encontró 21.70% de gestación.

4.4. NITRÓGENO UREICO EN SUERO SANGUÍNEO

En la Tabla 14, se observa los niveles de nitrógeno ureico en suero sanguíneo por tipo de alimento y sexo, dónde los machos alimentados sobre pastos naturales el nivel de nitrógeno ureico en suero sanguíneo fue de 32.7mg/dL/alpaca, siendo diferente a los resultados de machos en pastos naturales + dieta suplementada de 27.2mg/dL/alpaca. Así mismo las hembras alimentadas sobre pastos naturales mostraron 23.1mg/dL/alpaca y las hembras en pastos naturales + dieta suplementada mostraron un 31.9mg/dL/alpaca, resultados superiores a las hembras alimentadas sobre pastos naturales, mostrando diferencias ($P \leq 0.05$).

Tabla 13: Niveles de nitrógeno ureico en suero sanguíneo por doble interacción en alpacas machos y hembras

Factores	n	Pastos naturales + dieta suplementada	Pastos naturales
Macho	9	27.2 ^b	32.7 ^a
Hembra	28	31.9 ^a	23.1 ^b

($P \leq 0.05$)

Los resultados obtenidos en el estudio (machos y hembras) se encuentran dentro los resultados obtenidos por Fowler, (1998) con valores que varían desde 9 a 34 mg/dL de concentración de urea en plasma sanguíneo de llamas y alpacas adultas.

Los resultados obtenidos en el estudio para hembras (pastos naturales y pastos naturales + dieta suplementada) son superiores a los valores obtenidos por Rodrigo (2016) donde los niveles de nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) para alpacas madres fue de 9.33 ± 0.38 mg/dL, con una variación desde 8.50 a 10.16mg/dL. La diferencia entre dieta suplementada y pasto natural sería influenciada por el tipo de alimento.

En un estudio realizado por Sánchez, (2007) demuestra que no son influenciados por el factor sexo, los resultados obtenidos de BUN para hembras en promedio fue

de 8.87mg/dL con valores que varían desde 5.69 a 11.05mg/dL, y en machos un promedio de 8.79mg/dL con valores desde 5.69 a 11.05mg/dL.

Siguas et al., (2007) indican que la estación seca conduce a la obtención de bajos niveles de nitrógeno ureico sérico (de 3.5-30.9 y promedio 18.3 ± 5.8 mg/dL) originados por la reducida disponibilidad y baja de ingestión de proteína. La estación húmeda muestra niveles de BUN elevados (de 15.0 a 42.1 y promedio 29.0 ± 6.4 mg/dL) atribuible a la alta solubilidad de los componentes proteicos y a la mayor disponibilidad de proteína en la dieta.

V. CONCLUSIONES

- Bajo las condiciones en las que se realizó el trabajo, se determinó que la suplementación con la dieta suplementada (heno de alfalfa + heno de avena + vitaminas) no tiene efecto sobre la calidad de semen: con respecto al volumen, motilidad, concentración, vitalidad y morfología espermática en alpacas.
- La actividad ovárica fue mayor en alpacas con suplementación con la dieta suplementada, el tamaño folicular fue de 9.12 mm y en pastos naturales 6.30 mm ($P \leq 0.05$). Sin embargo, en el número de folículos no tuvo efecto la dieta suplementada.
- El efecto de la dieta suplementada no influyó en la tasa de fertilidad a los 21 días pos inseminación artificial de las alpacas.
- El efecto de la dieta suplementada sobre el nitrógeno ureico en suero sanguíneo para machos y hembras fue de 27.2 y 31.9mg/dL/alpaca, respectivamente ($P \leq 0.05$).

VI. RECOMENDACIONES

- Para tener mejores resultados se recomienda la evaluación de la actividad ovárica (tamaño y número folicular) se realice de acuerdo a onda folicular en alpacas.
- Los resultados bajos de la tasa de fertilidad pos inseminación artificial sugieren la utilización de otras técnicas como la transferencia de embriones.
- Realizar trabajos de investigación con suplementación proteica durante la época seca.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcon, V., A. Plasencia, J. Sumar. 1989. Diagnóstico de Gestación por ultrasonido en la Alpaca. (*Lama pacos*) y la Llama (*Lama glama*). Resúmenes de Investigación 1980-1989. Dirección de Investigación. FMVZ-UNA Puno Perú.
- Aller, J.; A. Cancino, G. Rebuffi, y R. Alberio. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, vitalidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*lama glama*). Revista de argentina de producción animal.
- Ampuero, E.; V. Alarcon, y J. Alpaca. 1989. Evaluación de diferentes métodos de diagnóstico de gestación en alpacas. Bol. Div. N°02 cer-unsac. Cusco-Perú.
- Aoac. 2005. International. Official methods of analysis, 17th edition.
- Assan, N. 2014. Micro-livestock farming and food security in sub Saharan Africa. J. Anim. Prod. Adv., 4: 374-387.
- Bautista, J. L. 2009. Determinación de los requerimientos de proteína de mantenimiento y crecimiento de alpaca (*Lama pacos*) mediante la técnica de sacrificio comparativo. Tesis doctoral. Escuela de post grado programa doctoral en ciencia animal. Universidad nacional agraria. Lima Perú.
- Bautista, J., G. Medina, y G. Mamani. 1997. Selectividad y degradabilidad in situ de pastizales nativos en alpacas y llamas al pastoreo en puna húmeda. Allpaka revista de investigación sobre camélidos sudamericanos IIPC Fmvz UNA- Puno.
- Bisinotto, R. S., L. F. Greco, E. S. Ribeiro, N. Martinez, F. S. Lima, C. R. Staples, W. Thatcher, and J. E. P. Santos. 2012. Influences of nutrition and metabolism on fertility of dairy cows. Animreprod. 9(3):260-272.
- Boland, M. P., P. Lonergan, and D. O'callaghan. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development," theriogenology, 55(6):1323-1340.
- Bondi, A. A. 1988. Nutrición animal. Editorial acriba, S.A. Zaragoza – España. 420.
- Bourke, D.A., C.L. Adam. and C.E. Kyle. 1992. Ultrasonography as an aid controlled breeding in the llama (*lama glama*). Vet. Rec., 130: 424-428.
- Bravo P.W. 2002. The reproductive process of south american camelids. Salt Lake City, ut: seagull printing.
- Bravo, W. M, y J. Sumar. 1989. Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. Animal reproduction science.
- Bravo, W., Stabenfeld, H., Fowler, E., Lasley, B. 1990. Ovarian follicular dynamics in the llama. Biology of reproduction, 43:579-585.

- Bravo, W.; Moscoso, J.; Ordoñez, C. and Alarcón, V. 1996. Transport of spermatozoa and ova in female alpaca. *Anim. Reprod, Sci.* 43: 173-179.
- Bravo W, Alarcon V, Ordoñez C. 2008. Experiences in artificial insemination of llamas and alpacas. *Icar 2008 satellite meeting on camelid reproduction. Budapest, hungary: icar.* P 23-27.
- Bravo, P. W., D. Diaz, V. Alarcón, and C. Ordoñez. 2010. Effect of the reproductive state of female alpacas on embryonic mortality rate. *Am. J. Vet. Res.* 71: 1096-1099
- Bravo W. y V. Alarcón. 2015. La influencia de suplementos nutritivos en la calidad de semen y fertilidad de la alpaca. VII congreso mundial en camélidos sudamericanos, Puno-Perú pag. 623.
- Brown, B. 2000. A review on reproduction in south american camelids. *Animal reproduction science*, 58:169-195.
- Bustanza, V. 2001. La alpaca. Conocimiento del gran potencial andino. Libro 1. Instituto de investigación y promoción de camélidos sudamericanos. Fmvz, UNA Puno – Perú.
- Butler, W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim reprod sci* 2000; 60–61:449–57.
- Butler, W. R. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock production science.* 83:211-218.
- Butler, W. R. 2005. Inhibition of ovulation in the postpartum cow and the lactating sow. *Livest. Prod. Sci.* 98:5-12.
- Butler, S. T., S. H. Pelton, and W. R. Butler. 2006. Energy balance, metabolic status, and the first postpartum ovarian follicle wave in cows administered propylene glycol. *J. Dairy sci.* 89:2938-2951.
- Caparó, Y. 2009. Inseminación artificial en alpacas con semen diluido. Tesis Fmvz -UNA – Puno.
- Cardenas, N. 2002. Inseminación artificial con espermatozoides colectados de los conductos deferentes de alpacas. Tesis Fmvz – UNA – Puno.
- Cárdenas, O., Ratto, M., Cordero, A., Huanca, W., 2003. Evaluación de pérdida fetal temprana en llamas mediante ultrasonografía. Libro de resúmenes del III congreso mundial sobre camélidos. Potosí Bolivia.
- Elrod C.C. and W.R. Butler.1993. Reduction of fertility and alteration of uterine ph in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J anim sci* 1993; 71:694–70.

- England, B., W., Foot, D., Matthews, A. Cardozo, and S. Riera. 1968. Ovulation and corpus luteum function in the llama (lama glama). *Journal endocrinology*, 45:505-513.
- Fernández Baca, S., W. Hansel, and C. Novoa. 1970a. Embryonic mortality in the alpaca. *Biol reprod.*, 3: 243-251.
- Fernández Baca, S. 1971. “la alpaca reproducción y crianza”. Volumen n° 7, ivita UNMSM, Lima - Perú.
- Fernández Baca, S. 1993. Manipulation of reproductive functions in male and female new world camelids. *Animal reproduction science*. 33:307-323.
- Ferre, L. y A. Werkneister. 1996. Desarrollo de la vagina artificial termo eléctrica para la colecta de semen en camélidos (resultados preliminares). *Revista Argentina de producción animal*. Vol 16, pp 363 - 366.
- Fowler, M. E. 1998. Feeding and nutrition. In: *medicine and surgery of south american camelids*. Llama, alpaca, vicuña, guanaco. Second edition. Iowa. State university press. Ames, iowa. Usa. Pag. 549.
- Galina, C.; A. Saltiel; J. Valencia; J. Becerril; G. Bustamante; A. Calderon; A. Duchateau; S. Fermin; A. Oler; R. Acina y L. Zarco. 1995. *Reproducción de los animales domésticos*. Editorial luminosa. México.
- Garnsworthy, P. C., and R. Webb. 1999. The influence of nutrition on fertility in dairy cows. Pages 39–58 in *recent advances in animal nutrition*.
- Garnsworthy, P. C. 2007. Body condition score in dairy cows: targets for production and fertility. In *recent advances in animal nutrition – 2006* (ed. Pc garnsworthy and j wiseman), pp. 61–86. nottingham university press, nottingham, uk.
- Garnsworthy, P. C., A. Lock, G. E. Mann, K. D. Sinclair, and R. Webb. 2008. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 1. Dietary energy source and ovarian function.
- Gigli, I., A. Russo y A. 2006. *Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Chorroarin 280. 1427. Ciudad autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Hafez E. 1989. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 5ta edición editora Interamericana Mc Graw Hill. México.
- Hafez, E. 2002. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7° edic. Editorial Interamericana. México.

- Hafez, E. 2005. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7º edición en español. Editorial Interamericana. México.
- Hanco, E. 2014. Ondas foliculares en alpacas por ultrasonografía en relación a la secreción de estrógenos. Tesis Fmvz-UNA, Puno-Perú.
- Huassaquiche, A. 1974. Balance de nitrógeno y digestibilidad en alpacas y ovinos. Tesis MV. Universidad Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 75 p.
- INEI (instituto nacional de estadística e informática) 2012. Censo agrario, población de alpacas. www.inei.gov.pe/estadistica/censos/30/03/17.
- Leroy, J. L. M. R., T. Vanholder, J. R. Delanghe, G. Opsomer, A. Van Soom, P. E. J. Bols, J. Dewulf, and A. De Kruif. 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early postpartum. *Theriogenology*. 62:1131-1143.
- Leroy, J. L.; M. R., T. Vanholder, G. Opsomer, A. Van Soom, and A. De Kruif. 2006. The in vitro development of bovine oocytes after maturation in glucose and β -hydroxybutyrate concentrations associated with negative energy balance in dairy cows. *Reprod dom anim*, 41:119-123.
- Leroy, J. L., D. Rizos, R. Sturmey, P. Bossaert, A. Gutierrez-adan, S. Valckx, and P. E. Bols. 2011. Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 24(1):1-12.
- Llacsá, J., 2012. Efecto de la suplementación energética sobre eficiencia reproductiva en alpacas huacayas (*Vicugna pacos*) con empadre controlado. Tesis maestría scientiea. Escuela de post grado. UNA. Puno, Perú.
- Lucy, M. C. 2003. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction* 61:415-427.
- Machaca, M., J. Asencio, C. Mamani, T. Huanca, G. Arroyo, O. Cárdenas y W. Huanca. 2015. Efecto de una suplementación alimenticia sobre la actividad ovárica y tasa de concepción en alpacas (*Vicugna pacos*). VII congreso mundial en camélidos sudamericanos, Puno, Perú, vol. 7, pag 48.
- NRC. National Research Council 1984. Nutrient requeriments of beef cattle. (6.ed.) Washington d.c. Usa. National academy press.
- NRC. National Research Council 2007. Nutrient requirements of smal ruminant's sheep, goats, cervids, and new world camelids. National academy press. Washington d.c. Usa.

- Neely, M. y W. Bravo.1998. Clinical semen assessment of semen of llamas and alpacas. In: theriogenology of domestic animals. 2nd. Edition.
- Novoa, C. 1989. Reproducción. In: simposio de producción de alpacas y llamas. XII reunión científica anual. Appa. Perú.
- Novoa, C. 1991. Fisiología de la reproducción de la hembra. En: Fernández Baca, (eds.). Avances y perspectivas del comportamiento de los camélidos sudamericanos, FAO, oficina regional de la FAO para américa latina y el caribe, Santiago-Chile.
- Novoa, C. 1998. Evaluación reproductiva de camélidos sudamericanos. En: Ruiz, M.; Rivera, B.; Ruiz, A. (eds.), reproducción animal: métodos de estudio en sistemas. Red de investigación en sistemas sostenibles pecuarios de América latina – Rispal, San José, Costa Rica.
- Olivera, L. V. M., D. A. Zago, J. P. Jones, and E. Bevilacqua. 2003. Developmental changes at the materno-embryonic interface in early pregnancy of the alpaca, *Lama pacos*. *Anat. Embryo.*, 207: 317-331.
- Perez, G., T. Quispe, L. Olivera, U. Perez. 2008. Gestación en alpacas inseminadas artificialmente con espermatozoides frescos o congelados-descongelados procedentes del conducto deferente. Symposium internacional en camélidos sudamericanos, Cusco – Perú.
- Pryce, J. E., M. D. Royal, P. C. Garnsworthy, and I. L. Mao. 2004. Fertility in the high producing dairy cow. *Livestock production science* 86, 125–135.
- Ratto, M., W. Huanca, J. Singh, y G. Adams. 2005. Comparison of the effect natural mating, lh, and gnrh on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Animal reproduction science*. 91.
- Robinson, T. F., B. L. Roeder, G. B. Schaalje, J. D. Hammer, S. Burton, and M. Christensen. 2005. Nitrogen balance and blood metabolites of alpaca (*lama pacos*) fed three forages of different protein content. *Small ruminant research*. 58:123-133.
- Roche, J. F. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim reprod sci* 2006; 96:282–96.
- Rodrigo, Y. 2016. Niveles de nitrógeno ureico en la sangre y leche de alpacas madre y cria. Tesis Fmvz-UNA, Puno-Perú.
- Roque, H. B. 2009. Determinación de los requerimientos energéticos de mantenimiento y ganancia de peso de alpacas (*vicugna pacos*) en crecimiento mediante la técnica de sacrificio comparativo. Tesis de programa doctoral en ciencia animal. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

- Salisbury, G.; L. Van Dernark y J. Lodge. 1982. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. 2da. Edición. Editorial Acribia, Zaragoza – España.
- Sanchez, A. V. 2007. Influencia del sexo sobre algunos parámetros bioquímicos en alpacas (*Lama pacos*) a condiciones de Huancavelica. Maestría en producción animal. Epg – Universidad Nacional de Huancavelica.
- SENAMHI. 2016. Servicio nacional de meteorología e hidrografía Puno - Perú.
- Shimada, A. 2003. Nutrición animal. Primera edición. Editorial trillas S.A. México.
- Siguas, O., R. Paucar, J. Olazabal, F. San martin, y V. Velez. 2007. Valores bioquímicos sanguíneos en alpacas en dos épocas del año en condiciones de huancavelica: aportes al perfil metabólico de la especie. APPA - Alpa – Cusco.
- Simons, J. A., D. L. Waldron, and D.P. Hennessy. 1993. Clinical biochemical reference ranges for female alpacas (*Lama pacos*). *Comp biochem physiol* 1993; 105b: 603-8.
- Sinclair, K. D., M. Kuran., F. E. Gebbie., R. Webb and T. G. McEvoy. 2000. Nitrogen metabolism and fertility in cattle. II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J anim sci* 2000;78: 2670–80.
- Skidmore, J. A. 2011. Reproductive physiology in female old world camelids. *Anim. Reprod. Sci.* 124(3-4):148-154.
- Sorensen, J. 1982. Reproducción animal principios y prácticas. Editorial interamericana mc graw hill. México.
- Sumar, J. 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. Msc thesis, department of obstetrics and gynecology, veterinary medicine faculty, swedish university of agrarian sciences, uppsala, sweden. 90p.
- Sumar, J. 2007. Demographics and herd management practices in south america. In: youngquist R, threlfallw, editors. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed., st. Louis, mo: saunders/ elsevier; 2007. P. 845–51.
- Van Hoeck, V., J. L. Leroy, M. Arias alvarez, D. Rizos, A. Gutierrez-adan, K. Schnorbusch, P. E. Bols, H. J. Leese, and R. G. Sturmey. 2013. Oocyte developmental failure in response to elevated nonesterified fatty acid concentrations: mechanistic insights. *Reproduction*. 145(1):33-44.
- Van Saun, R. J. 2006. Nutrient requirements of south american camelids: a factorial approach. *Small rumin res* 2006; 61:165–86.

Vaughan, J. L., Kl. Macmillan and Mj. D'ochhio. 2004. Ovarian follicular wave characteristics in alpacas. *Anim. Reprod sci.* 80(3-4):353-361.

Wiener, 2000. Protocolos para determinación de nitrógeno ureico, glucosa, colesterol y triacilglicéridos en suero sanguíneo. Wiener – Lab. Rosario – Argentina.

ANEXOS

ANEXO 1

Procedimiento de Calorimetría de bomba:

1. Preparación de la muestra: pesar aproximadamente 1.2g
2. Colocar la muestra (pellets) dentro de la bomba, conectar alambre fusible 10cm entre los polos de la bomba al cerrar la bomba, cargar con oxígeno.
3. Pesar 2 kg de agua destilada 15-16°C en Bucket, medir la T° debe haber una diferencia de 1°C entre el Bucket y T° ambiente. Colocar la bomba en Bucket dentro de agua de calorímetro, cerrar Bucket, colocar polea y conectar corriente eléctrica.
4. Encendido de pantalla: registrar nombre de la muestra y empezar el quemado de la muestra. Esperar 15'aproximadamente luego registrar el reporte de resultado (quemado de la muestra): elevación de T°.
5. Titulación de las disoluciones residuales de la bomba, con carbonato de sodio (Na₂CO₃) y registrar el gasto (mL) de Na₂CO₃.
6. Registro de alambre fusible residual, cm.
7. Fórmula de la determinación de la energía bruta (EB)

$$EB_{cal/g} = \frac{(AT^{\circ}C) (2430) - (Na_2CO_3) + (cm \text{ alambre fusible}) \times (2.3 \text{ cal/cm})}{\text{muestra gramos}}$$

Dónde:

Cal/g = caloría por gramo de forraje – alimento.

AT°C = elevación de T°C en la pantalla de calorímetro.

Energía estandarizada de calorímetro = 2430 calorías.

Na₂CO₃ = Carbonato de Sodio para titulación.

Alambre fusible = longitud de alambre residual, cm.

2.3 cal/cm = es la energía de alambre fusible por cada cm.

EM = Energía metabolizable

EB = Energía bruta de forrajes

EM = 0.5465 EB (NRC, 1984)

ANEXO 2

Tabla 14: Datos para calidad de semen de alpacas machos pasto natural.

PASTO NATURAL										
Macroscópicos					Microscópicos					
n°	Volumen		Motilidad		Concentración		Vitalidad		Morfología	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
1	1.5	5	80	80	16000000	7000000	95	93	89	77
2	0.6	4.5	80	80	4000000	26000000	93	89	88	81
3	0.5	1.5	80	80	25000000	7000000	97	86	88	84

ANEXO 3

Tabla 15: Datos para calidad de semen de alpacas machos suplementados.

CON DIETA SUPLEMENTADA										
Macroscópicos					Microscópicos					
n°	Volumen		motilidad		Concentración		Vitalidad		Morfología	
	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final	Inicio	Final
1	1	2	70	90	3000000	82000000	91	95	87	91
2	1.6	0.5	70	80	15000000	62000000	86	97	88	86
3	1.5	3	50	80	4000000	18000000	81	97	89	81

ANEXO 4

Tabla 16: ANOVA para el tamaño folicular de ovarios de alpacas

FV	GL	SC	CM	Fc	Pr>F	Ft($\alpha=0.05$)
Tipo de alimento	1	238	238	72.8**	< 0.0001	3,51
Lado de ovario	1	178,6	178,6	54.62**	< 0.0001	3,51
Alim* Lado ovárica	1	410,49	410,49	125.5**	< 0.0001	3,51
Error aleatorio	116	379,69	3,27			
Total	119	1206,78				

CV = 23.48 %

ANEXO 5

Tabla 17: ANDEVA para número folicular de ovarios de alpacas

FV	GL	SC	CM	Fc	Pr>F	Ft($\alpha=0.05$)
Tipo – Alimento	1	0,2	0,2	2,5	0,1201	3,51
Lado – Ovario	1	0,001	0,001	0,013	0,4625	3,51
Int. Alimen/Lado	1	0,052	0,052	0,65	0,6322	3,51
Error aleatorio	116	8,727	0,08000			
Total	119	3,5				

CV = 24.59 %

ANEXO 6

Tabla 18: ANOVA para niveles de nitrógeno ureico en suero sanguíneo de machos y hembras

FV	GL	SC	CM	Fc	Pr>F	Ft($\alpha=0.05$)
Alimento	1	529.7838	529.7838	15.73**	0.0002	3.99
Sexo	1	80.2085	80.2085	2.38	0.1273	3.99
Alimento*Sexo	1	693.0515	693.0515	20.57**	<0.0001	3.99
Error aleatorio	70	2358.0913	33.6870			
Total	73	3661.1351				

CV = 20.65 %

 $R^2 = 0.36$

NUS = Nitrógeno ureico en sangre (español) y BUN (Ingles).

ANEXO 7

Imágenes sobre el procedimiento y elaboración de la suplementación, evaluación de calidad de semen, actividad ovárica, determinación de la fertilidad y nitrógeno ureico en la sangre en el presente trabajo de investigación.



Imagen 1. Preparación de suplemento



Imagen 2. Suministro de la Dieta S.



Imagen 3. Consumo de la dieta machos



Imagen 4. Consumo de la dieta hembras



Imagen 5. Empadre de monta



Imagen 6. Colección de semen pos cópula



Imagen 7. Evaluacion del volumen de semen



Imagen 8. Evaluacion de la motilidad

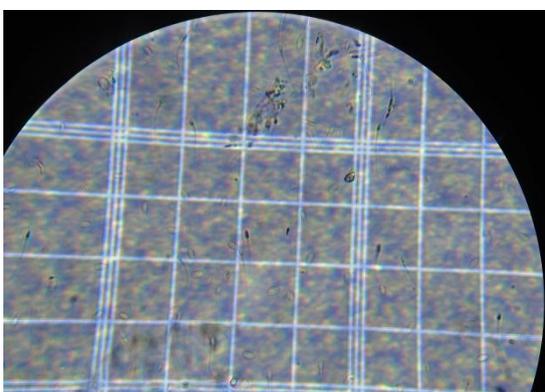


Imagen 9. Evaluación de la concentración espermática - cámara Newbauer

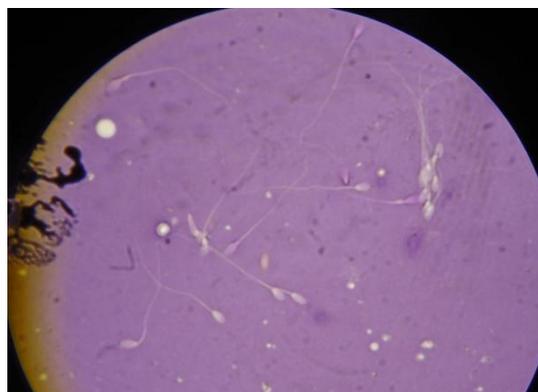


Imagen 10. Evaluación de la vitalidad espermática

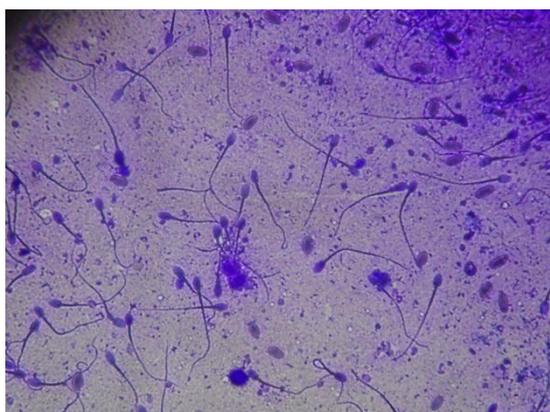


Imagen 11. Evaluación de la morfología espermática



Imagen 12. Evaluación de la actividad ovárica



Imagen 13. Tamaño folicular a la ecografía



Imagen 14. Sincronización de ovulación



Imagen 15. Ubicación de la cervix



Imagen 16. Inseminación artificial



Imagen 17. Diagnóstico de fertilidad



Imagen 18. Observación de la Vesícula embrionaria



Imagen 19. Muestreo de sangre

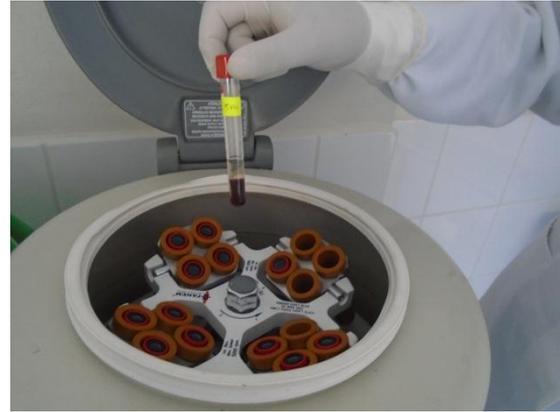


Imagen 20. Centrifugación

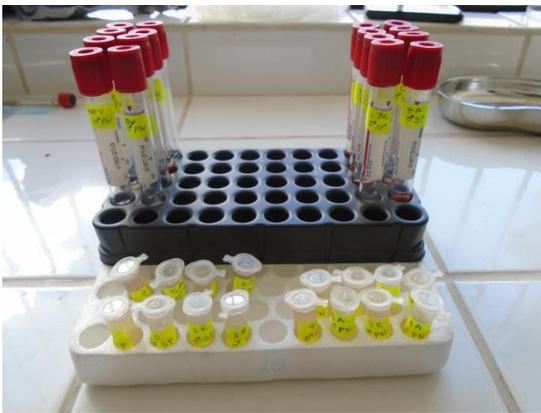


Imagen 21. Suero sanguíneo en viales



Imagen 22. Análisis de muestras