

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Evaluación de las características bioquímicas del plasma
seminal de alpacas, fresco y post descongelamiento**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Hugo Díaz Villegas

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

A mis padres, por estar siempre unidos, que me educaron en un ambiente familiar de respeto con principios y valores, porque me tuvieron mucha paciencia y por todo el apoyo incondicional que me brindaron.

A mis hermanos, por mantenernos siempre juntos y por todo el apoyo que me brindaron.

A mi sobrinito David, desde que nació lleno de mucha alegría nuestro hogar.

A mi abuelita María, por todo el cariño que me brindo y a mi tío Isaac, que ya no están con nosotros pero siempre me brindaron sus consejos.

A Claudia, por todo el tiempo compartido, quien a pesar de estar muy lejos, me acompañó en las buenas y malas, siempre me recordaba que tenía que terminar la tesis.

A todas las personas que participaron en mi formación personal y profesional.

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que contribuyeron a realizar y terminar la tesis, me demore mucho pero lo logre.

A todos los profesores que participaron en mi formación profesional, quienes compartieron sus experiencias.

A todos mis compañeros de aula, con quienes compartimos muchas horas juntos e influyeron en mi desarrollo personal y profesional.

A todos los amigos con quienes compartimos momentos de diversión, cuantas semanas veterinaria, cachimbadas y demás reuniones compartidas, me rio solo recordando.

Al personal de la facultad, quienes nos apoyaron durante los años de estudio.

Gracias FMV – UNMSM.

ÍNDICE

RESUMEN.....	ii
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE CUADROS.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Camélidos sudamericanos.....	2
2.2. Reproducción en alpacas.....	3
2.3. Fisiología del sistema reproductivo en alpacas machos.....	5
2.4. Plasma seminal.....	5
2.5. Componentes bioquímicos del plasma seminal.....	7
2.5.1. Glucosa.....	7
2.5.2. Lípidos.....	8
2.5.3. Proteínas.....	11
2.5.4. Albúmina.....	12
2.5.5 Calcio.....	12
2.5. 6 Enzimas del plasma seminal.....	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Lugar de estudio.....	15
3.2. Animales y muestras.....	15
3.3. Materiales.....	16

3.3.1. Equipos y materiales para el procesamiento de muestras mediante Análisis cinético y fotolorimétrico.....	16
3.3.1.1 Sustancias y reactivos.....	16
3.3.1.2 Equipos de laboratorio.....	16
3.4. Metodología.....	16
3.4.1 Toma de muestras de semen por electroeyaculación.....	16
3.4.2 Obtención de muestras de plasma seminal	17
3.4.3 Análisis bioquímico cinético y fotolorimétrico.....	17
3.5. Análisis de la información.....	18
IV. RESULTADOS.....	19
V. DISCUSIÓN.....	22
VI. CONCLUSIONES.....	24
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25

RESUMEN

El semen de alpaca post-descongelación ha sido usado para inseminación artificial sin el éxito esperado, a pesar de usar diversos protocolos de criopreservación y criopreservantes para mantenerlo viable por un tiempo prolongado. Sin embargo, para elaborar un buen criopreservante es necesario conocer que parámetros bioquímicos del plasma seminal se ven afectados tras su descongelación. De allí que el objetivo del estudio fue determinar y comparar las características bioquímicas del plasma seminal de alpacas en fresco y post-descongelado. Se realizó en los laboratorios de Farmacología y Toxicología Veterinaria y Reproducción Animal de la FMV-UNMSM. Se realizó en 4 alpacas adultas, bajo las mismas condiciones de crianza. Se usó un electroeyaculador digital (Electrojac) y se colectó en tubos Falcón de 10 ml, se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos, para la separación del plasma seminal. Una parte se analizó en fresco y la otra parte se almacenó en nitrógeno líquido por 1 mes para su posterior descongelamiento y análisis bioquímico. Se hizo análisis cinético y fotolorimétrico de niveles de glucosa, colesterol-total, colesterol-HDL, triglicéridos, proteínas-totales, albúmina, calcio, fosfatasa alcalina, ALT y γ -GT, usándose kits específicos (FAR, Italia), y un analizador bioquímico (SINOWA, China). Este procedimiento se realizó 1 vez por semana por 4 semanas. Las diferencias entre los valores bioquímicos en fresco y post-descongelado fueron evaluadas por T-Student pareado con un nivel de confianza del 95%. Sólo los valores de triglicéridos en plasma seminal de alpacas se modificaron debido al proceso de congelación/descongelación lo que se debería a la labilidad de estas moléculas a dichos procesos, los valores de triglicéridos (**mg/dL**) fueron 44.12 ± 7.38 y 27.31 ± 4.65 en fresco y postdescongelación, respectivamente. Se concluye que tras la descongelación del plasma seminal, únicamente los niveles de triglicéridos en plasma seminal se modifican, lo que supondría tomar en consideración este componente cuando se realice la formulación de criopreservantes.

Palabras clave: bioquímica, plasma seminal, alpacas

ABSTRACT

Alpaca semen post-thawing has been used for artificial insemination without the expected success, despite using different cryopreservation protocols and cryopreservatives to keep it viable for a long time. However, it is necessary to know what biochemical parameters from the seminal plasma are affected after thawing for the preparation of a good cryopreservative. Therefore, the aim of the study was to determine and compare the biochemical characteristics of the seminal plasma from alpacas in fresh and post-thawing. The study was performed at the Pharmacology and Toxicology Veterinary Laboratories and Animal Reproduction, at FMV-San Marcos. It was performed in 4 adult alpacas under the same rearing conditions. A digital electroejaculator (Electrojac) was used and the semen was collected in Falcon tubes of 10 ml, this was centrifuged at 3000 rpm for 30 minutes for separation of seminal plasma. One part was analyzed fresh and the other part was stored in liquid nitrogen for 1 month for subsequent thawing and biochemical analysis. Kinetic analysis and photolorimetric glucose levels, total-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, proteins, albumin, calcium, alkaline phosphatase, ALT and γ -GT, were performed using specific kits (FAR, Italy), and a biochemical analyzer (SINOWA, China). This procedure was performed 1 time per week for 4 weeks. The differences between the biochemical values in fresh and post-thaw were evaluated by paired t-Student with a confidence level of 95%. Only triglyceride levels in seminal plasma of alpacas were modified by the process of freeze-thawing what is due to the lability of these molecules in these processes, triglyceride levels (mg / dL) were 44.12 ± 7.38 and 27.31 ± 4.65 fresh and post-thawing, respectively. It is concluded that after thawing of seminal plasma, only triglyceride levels are modified in seminal plasma, which would take into consideration when formulating the component is made of cryopreservatives. r diversos protocolos de criopreservación y criopreservantes para mantenerlo

Keywords: biochemistry, seminal plasma, alpaca.

LISTA DE CUADROS

CUADRO N° 1	Comparación bioquímica del plasma seminal fresco y descongelado en cada alpaca.....20
CUADRO N° 2	Comparación del promedio de la bioquímica del plasma seminal fresco y descongelado21

I. INTRODUCCIÓN

En la región altoandina del país la principal fuente de ingresos económicos para el poblador es la producción de camélidos sudamericanos, especialmente la alpaca, por el alto valor de su fibra y en menor medida su carne. De allí que desde hace mucho tiempo se han venido haciendo múltiples intentos por hacer mejoras en el área reproductiva que permitan incrementar el número de animales y hacer un adecuado mejoramiento genético y obtener animales de alto valor, que le permitan al poblador altoandino incrementar sus ingresos y mejorar su calidad de vida; sin embargo, hasta el momento no se han obtenido resultados favorables en una las técnicas reproductivas mas usadas en diferentes especies animales como es la inseminación artificial, la cual muestra resultados poco alentadores en camélidos sudamericanos; posiblemente por el método de criopreservación, el cual no necesariamente puede ser el más adecuado para las alpacas, especialmente en los compuestos del criopreservante.

En la actualidad, los diferentes métodos de criopreservación seminal en camélidos sudamericanos, especialmente en alpacas, tienen como objetivo primordial mantener la calidad fecundante de los espermatozoides, post descongelamiento; sin obtenerse los resultados esperados. Es por estos motivos que el presente estudio pretendió evaluar las posibles variaciones de los componentes bioquímicos del plasma seminal de alpacas afectados por el proceso de congelado/descongelado, y que dicha información pueda contribuir a la formulación de criopreservantes que consignent dichas alteraciones bioquímicas, permitiendo la formulación de dilutores que permitan una mejor criopreservación de semen de alpacas y su utilización en la técnica de inseminación artificial.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CAMÉLIDOS SUDAMERICANOS

La población de Camélidos Sudamericanos (CSA) en el Perú es de aproximadamente 4 313 381 animales, representando el 56% de la población mundial de CSA. En alpacas, el Perú cuenta con 3 026 087 animales los cuales representan 87% de la población mundial, siguiéndole Bolivia y Chile con el 9% y 0.9%, respectivamente (Bustinza, 2001). Las alpacas en el territorio peruano producen 91% de la producción mundial de fibra de esta especie (Villaruel, 1991). En el Perú, 90% de las alpacas y la totalidad de las llamas se encuentran en manos de pequeños criadores (CONCYTEC, 2006). Se estima que en los Andes Sudamericanos unas 150 000 familias están involucradas en las diferentes etapas de la producción, comercialización y procesamiento de la fibra de CSA y de otros productos derivados de su crianza (Hoffman, 2002).

El principal objetivo de la crianza de alpacas es la producción de fibra, cuyas características de finura, elasticidad, resistencia, uniformidad, lustre, entre otras, le han permitido ganar un sustancial mercado en el extranjero. Sin embargo, apesar de tener un importante y creciente mercado, la producción de vellón es muy baja (1.6 kg por animal; E. Franco, 2004 comunicación personal), siendo necesario implementar efectivos programas genéticos y de manejo para incrementar esta productividad.

Muchos factores afectan la producción y la calidad de la fibra en alpacas, así tenemos el factor ambiental (estación, fotoperiodo, temperatura, altitud); el genético

(individuo, raza, edad); el hormonal y fisiológico (lactancia, preñez). En nuestro medio uno de los factores importantes que afectan el rendimiento de fibra, es el estado de subnutrición en ciertos periodos del año. Así, las praderas, base de la alimentación de los CSA, presentan al inicio del periodo de lluvias deficiencia de energía, al inicio del periodo seco deficiencia de proteína y en la época seca propiamente dicha, deficiencia de energía y proteína (San Martín, 1996). Estos periodos de subnutrición son seguidos por periodos de relativa abundancia de alimento los cuales ejercen un efecto marcado sobre la producción y calidad de la fibra.

Las investigaciones acerca del efecto de la nutrición sobre el crecimiento y calidad de la fibra en alpacas son escasas (Agramonte, 1988), comparando rebaños alimentados en pastos cultivados y en praderas, observó una mayor producción y mayor diámetro de fibra en los animales alimentados en pasturas cultivadas (Russel y Redden, 1997), sometiendo a un mismo grupo de alpacas a dos regímenes nutricionales, uno a un nivel de submantenimiento (0.7M) y el otro a un nivel de sobremantenimiento (2M), encontraron que la alpaca es altamente sensible a la manipulación nutricional y que su efecto sobre la producción de fibra se ejerce más a través de cambios en el largo de la fibra que en el diámetro; en contraste con lo hallado en ovinos (Reis y Sahlu, 1994).

2.2 REPRODUCCIÓN EN ALPACAS

La historia evolutiva de la alpaca (*Lama pacos*) se inicia con la aparición de los camélidos ancestrales en América del Norte al final del Plioceno, hace tres millones de años. Luego de su migración a través del estrecho de Bering hacia África y Asia, evolucionaron para formar la tribu de los Camelini, que comprende al camello Bactriano Moderno (el cual habita en Asia y presenta dos jorobas) y al Dromedario o camello con una joroba (que se encuentra en el Cercano Oriente y Norte de África). Asimismo, otro grupo migró hacia el sur a través del Istmo de Panamá y se distribuyó en América del Sur, donde surgió la tribu de los Lamini. Finalmente, los camélidos ancestrales desaparecieron de América del Norte.

La alpaca y la llama pertenecen al orden Artiodactyla, suborden Tylapoda (callos y almohadillas en las patas) y a la familia Camelidae (cuello largo con cabeza

pequeña, con 2 dedos en cada pata). Existen 2 grupos de camélidos: los camélidos del Viejo Mundo (camélidos con jorobas) y los del Nuevo Mundo (camélidos sin jorobas) que pertenecen al género *Lama* e incluyen a *Lama glama* (Llama), *Lama pacos* (Alpaca), *Lama guanicoe* (Guanaco) y *Lama vicugna* (Vicuña). Las primeras 2 especies del género *Lama* son animales domesticados, mientras que las últimas son especies silvestres. Todos los miembros de la familia tienen 37 cromosomas y se ha reportado que las 2 especies del Viejo Mundo pueden cruzarse entre ellas y producir descendencia fértil. Similares observaciones han sido realizadas entre las especies de camélidos del Nuevo Mundo (Escobar, 1984; Sumar, 1983 y Wheeler, 1988).

Las alpacas son animales pequeños, de orejas cortas y paradas, usadas por los pobladores de las regiones alto-andinas principalmente por su fibra, sin embargo cobran importancia socio-económica por el aprovechamiento de su carne y productos derivados como el cuero (Escobar, 1984; Sumar, 1983). La alpaca hembra tiene un peso promedio de 55 kg y el macho de 60 a 80 kg y poseen una fibra muy fina con colores que varían entre el blanco, negro y marrón.

La fisiología reproductiva de las alpacas difiere de la de otros animales domésticos y queda pobremente entendida, por ello se busca establecer tecnologías para el manejo y preservación de sus gametos.

Poseen una estacionalidad reproductiva, incluyendo el apareamiento y el parto los cuales se producen durante los meses de Diciembre a Marzo, coincidiendo con los periodos de lluvias abundantes y presencia de forraje (Smith, 1994). Las técnicas de reproducción asistida como la criopreservación de gametos y embriones son una herramienta clave para el manejo sostenible y estudio a nivel molecular del comportamiento de éstas células, con la finalidad de la producción, manejo y mejoramiento de esta especie. En los últimos años se han venido realizando trabajos sobre el manejo de semen para su preservación, pero las características que presenta este tipo demuestra son muy desalentadoras, ya que la técnica de extracción seminal no ha sido estandarizada y sólo se obtienen eyaculados con bajo volumen, alta viscosidad y una baja concentración de espermatozoides. Una alternativa que se ha presentado es el uso de espermatozoides del epidídimo ya que estos espermatozoides se encuentran en

un nivel de maduración notable y su manejo en el laboratorio es muy satisfactorio. El uso de estos espermatozoides es principalmente para establecer un protocolo de preservación que sea manejable y el cual permita la obtención de espermatozoides postdescongelamiento que presenten una alta tasa de fecundación.

2.3 FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA REPRODUCTIVO EN ALPACAS MACHOS

El conocimiento de la biología reproductiva de los camélidos sudamericanos es aún insuficiente, especialmente en lo referido a la fisiología reproductiva del macho. La inseminación artificial es una de las tecnologías que ha contribuido al progreso genético en diversas especies de animales de producción, especialmente en el bovino; sin embargo, existe muy poca información sobre la colección, características, evaluación y conservación del semen de 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 (Bustanza, 2001).

2.4 PLASMA SEMINAL

El plasma seminal consiste en una compleja mezcla de secreciones que se originan principalmente en el epidídimo y las glándulas sexuales accesorias del macho (Töpfer – Petersen *et al.*, 2005). Este cumple un rol protector de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra: modula la respuesta inflamatoria tras la monta (suprime la activación del sistema del complemento, la quimiotaxis de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) y la fagocitosis) (Troedsson *et al.*, 2005), sus proteínas protegen selectivamente a los espermatozoides vivos para no ser fagocitados por los PMN presentes en el útero y juega un rol importante en el transporte y eliminación de espermatozoides muertos (Loomis, 2006). Participa de manera importante en la maduración final del espermatozoide a través de cambios hormonales, enzimáticos y modificación de la superficie de membrana espermática; además de servir como vehículo para los espermatozoides eyaculados (Muiño – Blanco *et al.*, 2008). La enorme variación que existe entre distintos machos de una misma especie en la calidad espermática del semen refrigerado puede atribuirse en parte a diferencias en la composición de su plasma seminal (Muiño – Blanco *et al.*, 2008).

La eyaculación del macho se lleva a cabo en distintas fracciones, que varían de seis a ocho, siendo su composición determinada por el aporte en distintos momentos de las glándulas sexuales anexas. Las distintas fracciones de este eyaculado pueden ser más o menos dañinas para la preservación del semen refrigerado. Las secreciones pre seminales son las que tendrían un mayor efecto nocivo sobre la calidad espermática, siendo la tercera fracción la que ofrece una mejor protección a los espermatozoides (Katila *et al.*, 2001). Esta variación en la composición del eyaculado dada por los distintos aportes de las glándulas sexuales anexas sería una de las causas existentes para la gran variabilidad en la preservación de semen que existe entre los distintos machos de una misma especie (Muiño – Blanco *et al.*, 2008).

La centrifugación y remoción de todo el plasma seminal resulta en una reducción significativa en la motilidad de los espermatozoides almacenados en refrigeración cuando se utilizan diluyentes estándar. La centrifugación y remoción parcial del plasma seminal previo a su almacenamiento a 5°C resulta en una mejoría en las características de motilidad. Esto sugiere que es esencial una baja concentración de plasma seminal, o el uso de un sustituto de éste, para mantener las características de motilidad espermática (Rigby *et al.*, 2001; Akcay, 2006). No se describen diferencias en motilidad total ni integridad de membrana espermática al separar el plasma seminal de las distintas fracciones de un mismo eyaculado, por lo que todas las fracciones de plasma seminal tienen un efecto similar sobre los espermatozoides tras almacenarlos durante 24 horas a 5°C (Kareskoski *et al.*, 2006).

En los últimos 20 años se determinó que el plasma seminal bovino (BSP: *bovine seminal plasma*) contiene una familia de proteínas que son secretadas por las vesículas seminales. Se han descrito homólogos de estas proteínas presentes en el semen de todos los mamíferos, variando sus concentraciones entre las distintas especies. En el toro, estas proteínas del plasma seminal representan el 65% del total de proteínas del semen y en el potro el 1,1% (Bergeron y Manjunath, 2006). En el potro se han caracterizado 8 proteínas de plasma seminal (HSP – 1 a HSP – 8), siendo las más abundantes HSP – 1 y HSP – 2, (renombradas SP1 y SP2) que representan entre un 70 y un 80% del total de proteínas BSP presentes en el plasma seminal (Kareskoski y Katila, 2008). Ha sido demostrado que estas BSP se involucran en el establecimiento del reservorio

espermático a nivel oviductal, modulan la capacitación (Thérien *et al.*, 1997) y participan en algunos eventos centrales dentro de la fertilización (por ejemplo en la fusión entre el espermatozoide y el ovocito) (Töpfer – Petersen *et al.*, 2005).

El semen de la alpaca es altamente viscoso, lo que hace difícil su manejo en el laboratorio. Así mismo, la viscosidad del semen influye para que no exista la motilidad masal; además, la motilidad individual es de tipo oscilatoria y muy lenta (Sumar, 1997). Las características físicas del semen son muy semejantes a las de la llama (Garnica y Achata, 1998).

La dificultad en la colección del semen es atribuido entre otras causas, a las características peculiares de monta (posición de cúbito ventral), que dura entre 20 a 30 minutos, aproximadamente. Además los animales son de temperamento nervioso, lo que dificulta su manejo (Fernández-Baca y Calderón, 1965). La conservación de las células espermáticas se basa, esencialmente, en el uso de dilutores que proporcionen los nutrientes adecuados, que neutralicen los cambios de pH producido por el metabolismo de los azúcares (efecto tampón), y que protejan a los espermatozoides del descenso de temperatura durante el proceso de congelación (Herrera, 1986).

2.5 COMPONENTES BIOQUÍMICOS DEL PLASMA SEMINAL

2.5.1 GLUCOSA

En el metabolismo del semen, el proceso respiratorio sigue los mismos pasos del ciclo de Krebs en presencia de oxígeno utilizando para ello azúcares (glucosa, fructosa y manosa en el toro) y en el semen humano también se observa la utilización de glucógeno y maltosa (De Alba, 1985)

En la fisiología reproductiva el producto de secreción de la vesícula seminal contiene hexosas de gran importancia (glucosa entre otros) para la conservación de la motilidad de los espermatozoides. La secreción prostática también contiene hexosas, y entre ellas la glucosa (Kolb, 1979).

La glucosa puede tener una acción estimuladora o inhibitoria en la capacitación, este es un punto controversial y aparentemente independiente de las especies. El efecto inhibitorio en la capacitación es por el aumento de la fosforilación de la proteína cinasa observado en los espermatozoides al ser incubados en presencia de heparina (Villanueva, 2000)

Las concentraciones de glucosa en plasma seminal de alpacas de 3 años es significativamente superior a las de alpacas de 6 años (7.0 ± 0.4 y 5.0 ± 0.3 mg/dl. respectivamente) (Garnica *et al.*, 1993).

Dentro de los constituyentes carbohidratos del plasma seminal se encuentra trazas de glucosa. La glucosa sanguínea es precursor de la fructosa seminal. (Dukes y Swenson, 1981).

2.5.2 LÍPIDOS

La síntesis del colesterol ocurre virtualmente en todas las células siendo esta capacidad mucho mayor en el hígado, intestino, corteza suprarrenal y tejidos de reproducción que incluyen los ovarios, testículos y la placenta (Villavicencio, 1996).

El colesterol es una sustancia de muy baja solubilidad en el agua, y de alta solubilidad en el plasma sanguíneo gracias a la presencia de lipoproteínas (principalmente LDL y VLDL) que se unen al colesterol y que la concentración en plasma es de 150 a 200 mg/dl. (Murray y col., 1988).

El colesterol es importante por presentarse en diferentes procesos biológicos, como precursor de ácidos biliares, precursor de hormonas esteroideas, tales como la progesterona, testosterona, estrógeno, cortisol, corticosterona y aldosterona pero su principal función es ser parte constituyente de todas las membranas celulares e intracelulares (Bohinski, 1998).

Los lípidos tienen la característica de promover el flujo de la membrana celular, la permeabilidad y la difusión. La presencia de altos niveles de colesterol en la membrana durante la capacitación es probablemente requerida en la prevención de la capacitación prematura y para promover la reacción acrosomal en un tiempo apropiado. (James, 1999; Wolfe, 1998).

El colesterol puede actuar para sensibilizar a la membrana haciéndola menos permeable, con menos flujo y susceptible a la fusión. En suma, estos efectos directos sobre la bicapa lipídica y alteración en las propiedades físicas de la membrana, pueden influir en la movilidad, conformación y activación de las enzimas de la membrana y el transporte molecular. (Cross, 1998).

Se ha puesto atención en el colesterol de la membrana del espermatozoide, ya que ocasiona una variedad de efectos profundos en las características biológicas de la membrana (por ejemplo, la permeabilidad iónica activa y pasiva) por la orientación reguladora y en el flujo de la membrana lipídica (Cross, 1998).

Se ha propuesto una eliminación gradual del colesterol por medio de la albúmina u otros componentes del fluido del tracto genital femenino, ácidos grasos y lisofosfolípidos (Marin-Briggiler, 1999). El producto de la secreción de la vesícula seminal contiene lípidos de gran importancia para la motilidad y conservación de los espermatozoides (Kolb, 1979).

Las células pierden lípidos en el plasma seminal como consecuencia de su almacenamiento prolongado en la cola del epidídimo y ampolla del conducto deferente (McDonald, 1981).

El paso de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la hembra es acompañado por una pérdida de colesterol de la membrana del espermatozoide. Este proceso está involucrado en la capacitación espermática, la cual toma varias horas. El colesterol también media la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal (Davis y Hungund, 1976). (Sebastián *et al* 1987) demostró que la infertilidad esta mediada por la asociación con el metabolismo lipídico alterado en el plasma seminal. A pesar que diversos reportes han evaluado el efecto de la hipercolesterolemia sobre el mecanismo de modulación de la capacidad funcional espermática (Diaz-Fontdevila *et al.*, 1992), no hay reportes concernientes a la influencia de una dieta rica en colesterol sobre los parámetros espermáticos, proceso de maduración espermática y capacidad fertilizante (Yamamoto *et al.*, 1999).

Además, (Kulka *et al.*, 1984) examinaron si un eyaculado normal o anormal muestra una correlación con concentraciones de triglicéridos o fosfolípidos. Sus resultados no muestran conexión entre las concentraciones de triglicéridos y parámetros espermáticos de concentración, motilidad y morfología. En otros estudios, niveles elevados de lípidos mostraron ser común en machos azoospermicos (Padron *et al.*, 1989). (Vignon *et al.*, 1989) también encontró que un aumento de triglicéridos tiene efectos negativos en la espermatogénesis.

La hipercolesterolemia así como la hipertriglicerolemia en conejos está involucrada con la disminución de la capacidad espermática y la reacción del acrosoma (Diaz-Fontdevilla *et al.*, 1993). (Erqun *et al.*, 2007) investigaron la correlación de los niveles lipídicos y los parámetros del semen en humanos. Sus resultados mostraron que el incremento de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y triglicéridos son significativamente correlacionados con la disminución de las características de motilidad del espermatozoide. El objetivo de este estudio fue estimar la correlación entre los niveles séricos de lípidos (colesterol, triglicéridos, LDL, and HDL) con los parámetros espermáticos en 120 hombres con infertilidad. Este trabajo pudo adicionar algunos alcances para el diagnóstico de infertilidad, especialmente en casos con etiología desconocida.

Ha sido reportado que la composición de fosfolípidos y ácidos grasos de espermatozoides están alterados en la infertilidad (Gulaya *et al.*, 2001). Ha sido muy difícil determinar específicamente una correlación fuerte entre los lípidos séricos y la variación en los parámetros del plasma seminal. (Padron *et al.* 1989) examinó la composición lipídica y la función testicular en mamíferos. Sus resultados muestran que niveles lipídicos elevados ejercen efectos adversos en los niveles testiculares. Esta situación puede alterar el proceso de maduración espermática en tracto reproductivo de los machos. Otros hallazgos de sus estudios fue que los niveles lipídicos altos son comunes en pacientes con azoospermia. (Ramírez-Torres *et al.*, 2000) estudiaron la incidencia de hipercolesterolemia e hipertriglicerolemia entre hombres infértiles. Sus hallazgos muestran que el 65% de sus casos tuvieron defectos lipídicos anteriormente mencionados. (Padron *et al.* 1989) evaluaron los niveles de lípidos involucrados en fertilidad e infertilidad, sus resultados muestran que la alteración lipídica fue más

común en individuos azoospermicos. Hubo una correlación entre la calidad anormal del semen con los niveles elevados de colesterol y triglicéridos.

Los niveles normales de triglicéridos no se relacionan con la alta calidad de los parámetros espermáticos. Sin embargo, eso puede interferir con la relación entre la función espermática/capacidad de fertilización. (Diaz-Fontdevila *et al.*, 1993) hallaron que la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia estuvieron relacionados con la disminución de la capacidad de la reacción del acrosoma del espermatozoide en conejos. La hipercolesterolemia también puede tener un efecto de detrimento sobre la capacidad espermática para penetrar y fertilizar los ovocitos en conejos (Yamamoto *et al.*, 1999). Esto ha sido demostrado en la disfunción epididimal en animales hipèrcolesterolémicos, pues tiene efectos de detrimento sobre la modificación de la citoestructura y cambios bioquímicos que ocurren durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo y pueden tener resultados en la disminución de la motilidad y la morfometría anormal del espermatozoide (Glander *et al.*, 2002). Además, los niveles de LDL y HDL estuvieron dentro del rango normal en la mayoría de los individuos de los estudios mencionados anteriormente. Niveles anormales de LDL y HDL están involucrados con alteraciones en los parámetros espermáticos. Además, (Yamamoto *et al.*, 1999) encontraron que los únicos niveles elevados de efectos del colesterol afectan la motilidad espermática en conejos, sus hallazgos son similares a los hallados en humanos. Además, (Brinsko *et al.*, 2007) observaron que la motilidad espermática entre sementales fértiles e infértiles fue similar, pero el rango de colesterol y fosfolípidos en los sementales infértiles fue de 2.5 veces mayor que los fértiles en el plasma seminal, lo que interfiere con la capacidad del espermatozoide con respecto a la reacción acrosomal (Calvo *et al.*, 1994).

2.5.3 PROTEINAS

Las proteínas y aminoácidos del plasma seminal ejercen acción protectora sobre los espermatozoides, neutralizando el efecto perjudicial de los metales pesados y previniendo la aglutinación de sus células. El semen de toro y carnero contiene niveles relativamente altos de proteínas y aminoácidos libres (Derivaux, 1982). Los valores de

proteína en el semen de toro son de 7.3 (6.3-8.4) g/dl y en el carnero de 4.9 (4.1-6.2) g/dl. (Dukes y Swenson, 1981).

"Por lo menos del 30 al 39 % de las proteínas del plasma seminal son distintas a cualquiera de los presentes en la sangre" (Salisbury y col., 1978). La remoción y adsorción de proteínas de la superficie espermática es generalmente reconocida como un prerrequisito para la capacitación. La unión de ciertas proteínas a la superficie se ha asociado con la maduración epididimal o a la eyaculación, y ocurre durante la capacitación. *In vivo* estas sustancias pueden prevenir la capacitación, pre maduración y la hiperactivación en la movilidad y/o que la reacción acrosomal ocurra sin estar en contacto con el ovocito. Existen datos de que en la capacitación *in vitro* con los lavados solo remueven una parte de estas proteínas, por lo que solo se logra una disminución. (Rivera, Villanueva, 2000).

2.5.4 ALBUMINA

Las albúminas son sintetizadas en el hígado y están constituidas por una sola cadena de 610 aminoácidos. Contribuye a la presión osmótica coloidal, actúa como molécula transportadora para bilirrubina, ácidos grasos, oligoelementos y numerosos medicamentos. (Murray y col., 1988).

Se cree que la función de las albúminas séricas durante la capacitación *in Vitro* es la eliminación del colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide. Algunos experimentos han demostrado que el colesterol unido a otras proteínas de transferencia de lípidos que están presentes en el líquido folicular o los fluidos de las trompas de Falopio, pueden ser reemplazados por las albúminas en la fertilización *in Vitro*; estos resultados sugieren el desarrollo en la activación en el colesterol (Dragilva, 1999).

2.5.5 CALCIO

El rol del calcio en la iniciación y/o regulación de la capacitación es un punto controversial. Se observa que no hay un cambio intracelular de calcio en los eventos de la maduración. En los espermatozoides de ratón se ha visto al calcio como un

requerimiento en la capacitación, sin embargo no se han medido la concentración intracelular de calcio.

La acción del calcio en los niveles de enzimas efectores desarrollan en el espermatozoide una señal de transducción (por ejemplo adenilciclase, nucleótido fosfodiesterasa cíclica) (Dragilva, 1999).

El calcio y los iones bicarbonatos tienen una forma común de activación en la estimulación de iones de la adenilciclase del espermatozoide maduro, dado que posee enzimas con propiedades únicas. (Herrero, 1999; Mandal, 1999; Viscont, 1998).

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

En particular, el calcio y el pH son involucrados en la capacitación y en la reacción acrosomal. El aumento del calcio y de protones en la capacitación, tienen como resultado un decremento en la longevidad con reacción acrosomal prematura (Rivera, y col., 2000).

La concentración anormal de calcio, pH y/o AMPc pueden inhibir la fertilización por alteración de la capacitación y la reacción acrosomal, ocasionando defectos intracelulares en la movilidad espermática, (Mortimer, 1998; Zabludovsky, 1999).

2.5.6 ENZIMAS DEL PLASMA SEMINAL

Gamma glutamiltransferasa (γ -GT) en el líquido seminal es secretada principalmente desde la glándula de la próstata, y es aproximadamente 200 veces mayor que la de la sangre (Heite, 1977; Uchijima, 1986)

Estudios recientes han demostrado que la enzima γ -GT en sí misma no es necesaria para la función reproductiva, pero juega un papel importante en el sistema de

glutación peroxidasa que está implicado en la protección de los espermatozoides contra los radicales libres de oxígeno (Zalata, 1995; Kumar, 2000).

Una gran variedad de enzimas está presente en el plasma seminal, pero en muchos casos no se ha identificado la glándula responsable de su producción. Los niveles de las enzimas en plasma seminal son muy importantes para el metabolismo del esperma, así como la función del esperma (Brooks, 1990).

La Fosfatasa alcalina es una enzima que se encuentra en una gran cantidad de tejidos y órganos, incluyendo los huesos, hígado, riñón, intestino, pulmón y placenta (Hoffmann *et al.*, 1989).

También se han detectado niveles variables de fosfatasa alcalina en el fluido seminal de algunos mamíferos, incluyendo el de gallo y el pavo (Bell y Lake, 1962).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

El presente estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Farmacología y Toxicología Veterinaria, Reproducción Animal y de Fisiología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM) en el departamento de Lima, distrito de San Borja.

3.2 Animales y muestras.

En el presente estudio se han utilizado 4 alpacas machos de 3-5 años de edad, los cuales fueron criados bajo las mismas condiciones de manejo alimenticio (se les alimentó con paca de alfalfa y agua ad-libitum) y bajo las mismas condiciones de crianza, en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Reproductiva (parte del Laboratorio de Reproducción). De los 4 animales experimentales, se tomarán muestras de semen fresco a la misma hora (8 - 9 a.m.) y con los animales en ayunas. La extracción de semen se hizo por electro-eyaculación 1 vez por semana durante 4 semanas y parte de estas muestras fueron almacenadas en un tanque que contenía nitrógeno líquido.

3.3 Materiales

3.3.1 Equipos y materiales para el procesamiento de muestras mediante análisis cinético y fotocolorimétrico.

3.3.1.1 Sustancias y reactivos

- Alcohol 96°
- Nitrógeno líquido
- Agua destilada con un pH de 7,1
- Suero fisiológico
- Kit de glucosa
- Kit de colesterol total
- Kit colesterol HDL
- Kit de triglicéridos
- Kit de proteínas totales
- Kit de albumina
- Kit de calcio
- Kit de alaninoaminotrasnferasa
- Kit de fosfatasa alcalina
- Kit de gamma glutamiltranspeptidasa

3.3.1.2 Equipos de laboratorio:

- Estufa.
- Analizador bioquímico
- Electroeyaculador
- Centrífuga
- Tanque de nitrógeno líquido
- Refrigeradora

3.4 Metodología

3.4.1 Toma de muestras de semen por electro-eyaculación

Se realizó la toma de muestras de semen por electro-eyaculación, 1 vez por semana por un período de 4 semanas. Para tal efecto de colección de semen se procedió con los protocolos descritos por Director *et al.*, 2007, donde los animales fueron sometidos a un protocolo de anestesia general con 0.2 mg/kg de Xilacina y 1.5 mg/Kg de Ketamina por vía endovenosa (vena yugular). Una vez anestesiados, se procedió a la

limpieza del recto, a fin de evitar interferencia al momento del procedimiento. Luego, los animales fueron sometidos a la aplicación de un electrodo de un electroeyaculador digital modelo Electrojac (USA) en forma seriada, hasta la obtención de semen, el cual fue colectado en tubos Falcon de 10 ml. En cada animal la muestra de semen obtenida fue de aproximadamente 3-5 ml.

3.4.2 Obtención de muestras de plasma seminal

Las muestras de semen fresco obtenidas fueron centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos, en una centrifuga automática (GEMMY, Taiwan) para la separación del plasma seminal. El sobrenadante obtenido fue evaluado para determinar la ausencia de espermatozoides. Se obtuvo un aproximado de entre 1-2 ml de plasma seminal. Una parte del cual fue inmediatamente analizada (50% del plasma obtenido) y la otra parte (el otro 50%) fueron almacenadas por congelación en tanque de nitrógeno líquido (**GEMMY, Taiwán**) a una temperatura de -180 °C. Después de 1 mes de almacenamiento las muestras de plasma seminal fueron descongeladas para su análisis bioquímico.

3.4.3 Análisis bioquímico cinético y fotolorimétrico

Se determinó mediante análisis bioquímico del plasma seminal de alpacas, evaluando los siguientes parámetros: niveles de glucosa, colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, proteínas totales, albúmina, calcio, alaninoaminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma glutamiltranspeptidasa, para lo cual se usaron los kits específicos para cada determinación (FAR Diagnostics, Italia), siguiendo las especificaciones del fabricante, y por medio de un analizador bioquímico semiautomático (SINOWA, China).

Después de un período de 1 mes, las muestras congeladas fueron descongeladas y se procedió a determinar los parámetros antes mencionados mediante análisis cinético y fotolorimétrico y se evaluó las posibles variaciones que hayan sufrido producto de la congelación.

3.5 Análisis de la información:

Los resultados se expresarán como medias y sus errores estándar. Las diferencias estadísticas entre los valores fueron evaluadas por la prueba de T-Student pareado con un nivel de significancia de $P < 0,05$.

IV. RESULTADOS

En el cuadro 1, se pueden observar los valores bioquímicos del plasma seminal de las 4 repeticiones para cada alpaca macho del estudio, donde se han podido encontrar diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) únicamente en los niveles de triglicéridos (mg/dL), entre el plasma seminal fresco y postdescongelado: 47.33 ± 5.44 y 24.84 ± 4.92 respectivamente para el animal 1, y 49.57 ± 5.48 y 27.83 ± 3.80 respectivamente para el animal 2.

En el cuadro 2, se pueden observar los valores bioquímicos del plasma seminal promedios del total de las repeticiones de los 4 animales, encontrándose únicamente diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de triglicéridos (mg/dL) entre el plasma seminal fresco y postdescongelado: 44.12 ± 7.38 y 27.31 ± 4.65 respectivamente.

Cuadro 1. Comparación bioquímica del plasma seminal fresco y descongelado en cada alpaca.

	PLASMA SEMINAL															
	ANIMAL 1				ANIMAL 2				ANIMAL 3				ANIMAL 4			
	F		C/DC		F		C/DC		F		C/DC		F		C/DC	
	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE	Prom	DE
Glucosa (mg/dL)	9.07	1.15	7.37	1.69	7.49	0.27	8.67	1.16	8.43	1.07	9.45	0.97	7.88	0.60	8.64	1.05
Colesterol (mg/dL)	81.13	6.71	81.39	6.83	78.97	3.86	80.15	3.64	77.67	3.96	84.80	0.95	81.35	8.03	80.64	3.74
Triglicéridos (mg/dL)	47.33	5.44	24.84	4.92	49.57	5.48	27.83	3.80	40.61	8.58	29.41	4.54	38.97	10.02	27.17	5.31
HDL colesterol (mg/dL)	4.56	0.29	4.64	0.15	4.91	0.32	4.96	0.20	4.79	0.28	5.17	0.46	4.67	0.31	5.09	0.61
Proteína total (g/dL)	2.30	0.13	2.16	0.33	2.50	0.13	2.41	0.23	2.27	0.18	2.16	0.21	2.37	0.15	2.42	0.16
Albumina (g/dL)	1.09	0.60	0.74	0.06	1.13	0.65	0.85	0.10	0.82	0.03	0.81	0.06	0.86	0.03	0.84	0.04
Calcio (mg/dL)	11.66	0.73	11.04	0.55	11.27	1.53	11.71	0.29	11.83	2.85	11.10	0.87	12.31	1.86	11.91	0.48
ALT (U/L)	12.22	10.44	6.05	2.07	20.31	7.72	16.80	6.12	18.62	6.69	12.74	9.37	20.54	11.51	33.72	48.51
Fosfatasa alcalina (U/L)	319.15	413.37	59.36	43.79	230.59	307.10	481.82	489.54	328.64	175.91	265.39	104.11	276.65	221.96	312.86	165.60
γ -GT (U/L)	95.65	55.93	54.86	27.64	81.62	54.57	150.24	91.10	102.64	10.36	172.82	17.94	78.56	35.47	80.83	16.84

F: plasma seminal fresco; C/DC: plasma seminal congelado/descongelado

Cuadro 2. Comparación del promedio de la bioquímica del plasma seminal fresco y descongelado

Características bioquímicas	PLASMA SEMINAL			
	Fresco		C/DC	
	Prom	DE	Prom	DE
Glucosa (mg/dL)	8.22	0.77	8.53	1.22
Colesterol (mg/dL)	79.79	5.64	81.74	3.79
Triglicéridos (mg/dL)	44.12^a	7.38	27.31^b	4.65
HDL colesterol (mg/dL)	4.73	0.30	4.96	0.36
Proteína total (g/dL)	2.36	0.15	2.29	0.23
Albumina (g/dL)	0.97	0.33	0.81	0.06
Calcio (mg/dL)	11.77	1.74	11.44	0.55
ALT (U/L)	17.92	9.09	17.33	16.57
Fosfatasa alcalina (U/L)	288.76	279.59	279.86	200.76
γ -GT (U/L)	89.62	39.09	114.69	38.38

a, b letras diferentes significativamente (p<0.05)

F: plasma seminal fresco; C/DC: plasma seminal congelado/descongelado

V. DISCUSIÓN

Nuestro estudio muestra que los diversos componentes bioquímicos del plasma seminal que fueron objeto de este trabajo y que cumplen diversas funciones que permiten la estabilidad y funcionalidad del espermatozoide como la glucosa, colesterol total, colesterol HDL, proteínas totales, albúmina, calcio, alaninoaminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma glutamiltranspeptidasa, no evidenciaron diferencias significativas al determinar sus niveles en fresco y después de descongelar las muestras de plasma seminal.

Por su parte, el único componente que sí mostró tener modificaciones en su concentración en el plasma seminal fueron los niveles de triglicéridos, los cuales disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) de 44.12 en plasma seminal fresco a 27.31 en plasma seminal descongelado, lo que sugiere que habría una labilidad de este componente después de un periodo de congelación-descongelación, lo que podría ser explicado en cierta forma por estudios donde después de 10 a 20 ciclos del proceso de congelación-descongelación de plasma sanguíneo el elemento que mostró reducción significativa en sus niveles fueron los triglicéridos, sin embargo los ciclos de dichos estudios fueron después de una hora (Paltiel *et al.*, 2008), sin embargo en nuestro estudio se utilizó un sólo ciclo de congelación-descongelación en un mes.

Por otra parte, tal vez los triglicéridos sean más lábiles en un medio como el plasma seminal al disminuir significativamente en un mes después de su almacenamiento en nitrógeno líquido a $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$, pues en el plasma sanguíneo se sabe que su estabilidad sin interferencias de ningún tipo puede mantenerse estable 7 días a

4°C y hasta 3 meses a -20°C (Henry *et al.*, 1991; Burtis y Ashwood, 1994; Tietz, 1994)

La función de los triglicéridos esta relacionada a la energía que estos donan a los espermatozoides durante el proceso de inmovilidad durante su almacenamiento y durante la fase de regeneración después de la motilidad (Lahnsteiner *et al.*, 1993), otros estudios han podido demostrar que los bajos niveles de triglicéridos durante la fase de almacenamiento ocasionan disminución de los recursos energéticos necesarios para la fecundidad, pues el espermatozoide será incapaz de movilizarse adecuadamente (Faramarzi, 2012; Tekin *et al.*, 2003)

Los niveles normales de triglicéridos no se relacionan con la alta calidad de los parámetros espermáticos. Sin embargo, eso puede interferir con la relación entre la función espermática/capacidad de fertilización. (Diaz-Fontdevila *et al.*, 1993) hallaron que la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia estuvieron relacionadas con la disminución de la capacidad de la reacción del acrosoma del espermatozoide en conejos.

En nuestro estudio se reporta que los triglicéridos son el único componente que disminuyó en el plasma seminal, producto del proceso de congelación-descongelación, por lo que podría inferirse que posiblemente la poca presencia de este elemento sería una de las causas que la inseminación artificial pueda estar fallando, este tipo de biotecnología usa necesariamente la criopreservación. Así mismo se han reportado que bajos niveles de triglicéridos en el plasma seminal están asociados a alteraciones espermáticas como a la oligoastenozoospermia en toros, al que no permite que la fecundación tenga éxito (Çevk *et al.*, 2007); sin embargo, los niveles normales de triglicéridos no se relacionan con la alta calidad de los parámetros espermáticos, pues hasta tal vez podría interferir con la relación entre la función espermática/capacidad de fertilización, pues estudios de Diaz-Fontdevila *et al* (1993) hallaron que la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia estuvo relacionada con la disminución de la capacidad de la reacción del acrosoma del espermatozoide en conejos.

VI. CONCLUSIONES

- La única diferencia significativa ($p < 0.05$) encontrada entre la comparación de las características bioquímicas del plasma seminal fresco y postdescongelado se dieron en los niveles de triglicéridos.
- Los triglicéridos se muestran disminuidos tras el efecto del proceso de congelado / descongelado, siendo importante para ser tomado en cuenta cuando se formulen los criopreservantes para el semen de alpacas.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Agramonte MV. 1988. Incremento del peso corporal de crías y ritmo de crecimiento de la fibra de alpacas en dos sistemas de producción. Tesis de Ing. Zootecnista. Cusco: Univ. Nac. San Antonio Abad del Cusco. Perú.
2. Akcay E, Reilas T, Andersson M, Katila T. 2006. Effect of seminal plasma fractions on stallion sperm survival after cooled storage. *J Vet Med A Physiol Pathol. Clin. Med* 53: 481-485.
3. Bell DJ, Lake PE. 1962. A comparison of phosphomonoesterase activities in the seminal plasmas of the domestic cock, turkey tom, boar, bull, buck, rabbit and man. *J Reprod. Fertil.* 3: 262-268.
4. Bergeron A, Manjunath P. 2006. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Develop* 73 : 1338–1344
5. Bohinski RC. 1998. *Bioquímica*. 5ª ed. México: Addison Wesley Longman. 739 p.
6. Brinsko SP, Love CC, Bauer JE, Macpherson ML, Varner DD. 2007. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. *Animal Reproduction Science* 99: 65- 71.
7. Brooks DE.1990. Marshall's physiology of reproduction. En: Lamming GE, ed. *Biochemistry of the male accessory glands*. 4ª ed. Edimburgo: Churchill Livingstone. p 569-690.

8. Bustinza AV. 1991. Mejoramiento Genético. En producción de Rumiantes Menores: Alpacas. Flores A. y Novoa C. Ed. RESUMEN Lima Perú. p 113-126.
9. Bustinza AV. 2001. La alpaca: crianza, manejo y mejoramiento. Tomo II. Puno: Oficina de Recursos del Aprendizaje, Universidad Nacional del Altiplano. 343 p.
10. Calvo L, Dennison-Lagos L, Banks SM, Sherins RJ. 1994. Characterization and frequency of acrosome reaction among normal and infertile men. *Hum Reprod* 9: 1875-1879.
11. Burtis C, Ashwood E. 1994. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2^a ed. Philadelphia: Saunders. p 1030-1058, 1073-1080.
12. Çevk M, Tuncer P, Tafidem U, Özgürta T. 2007. Comparison of Spermatological Characteristics and Biochemical Seminal Plasma Parameters of Normozoospermic and Oligoasthenozoospermic Bulls of Two Breeds. *Turk J Vet Anim Sci* 31: 381-387
13. [CONCYTEC] Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología. 2006. PROCAM: Doc. de trabajo.
14. Cross NL. 1998. Role of Cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 7-11.
15. Davis BK, Hungund BJ. 1976. Effect of modified membrane vesicles from seminal plasma on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *BiochemBiophys Res Commun.* 69: 1004-1010.
16. De Alba J. 1985. *Reproducción Animal*. 1^{ra} ed. México: Editorial Copilco S.A. 437 p.
17. Derivaux J. 1982. *Reproducción de los animales domésticos*. 2^{da} ed. España: Editorial Acribia. 464 p.
18. Diaz-Fontdevilla M, Bustos-Obregon E, Fornes M. 1992. Distribution of filipin-sterol complexes in sperm membranes from hypercholesterolaemic rabbits. *Andrologia* 24: 279-283.
19. Diaz-Fontdevilla M, Bustos-Obregon E. 1993. Cholestrol and polyunsaturated acid enriched diet: Effects on kinetics of the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Mol Reprod.* 35: 176-180.

20. Director A, Giuliano S, Carretero M, Pinto M, Trasorras V, Miragaya M. 2007. Journal of Camel Practice and Research 14 (n° 2): 203- 206.
21. Dragilva E, Rubinstein S, Breitbart H. 1999. Intracellular Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATPasa regulates calcium influx and acrosomale exocytosis in bull and ram spermatozoa. Biol Reprod. 61: 1226.
22. Dukes H, Swenson M. 1981. Fisiología de los animales domésticos. 4^a ed. México: Aguijar S.A. 806 p.
23. Erqun A, Kose SK, Aydos K, Ata A, Avci A. 2007. Correlation of seminal parameters with serum lipid profile and sex hormones. Arch Androl 53: 21-23.
24. Escobar RC. 1984. The Llama, Animal Breeding and Production of American Camelids. Lima – Perú: Talleres Graficos de ABRIL. 358 p.
25. Faramarzi M. 2012. Assessment of Reproductive Parameters in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). World Journal of Fish and Marine Sciences 4 (3): 244-248.
26. Fernández Baca S, Calderón W. 1965. Métodos de colección de semen de alpaca. Bol. IVITA. Lima. 12 p.
27. Ferré L, Werkmeister A. 1996. Desarrollo de una vagina artificial termoeléctrica para la colecta de semen. Rev. Agr. Prod. Anim. 16: 363-365.
28. Frase L. 1998. Sperm capacitation and acrosoma reaction. Hum Reprod. 13 (Suppl. 1): 9 – 12.
29. Garnica J, Achata R, Bravo PW. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. Animal Reproduction Science 32: 85-90.
30. Garnica J, Achata R. 1998. Constituyentes químicos del plasma seminal de la alpaca. En: XII Reunión APPA. Lima: Asociación Peruana de Producción Animal.
31. Glander HJ, Schiller J, Süßn R, Paasch U, Grunewald S, Amhold J. 2002. Detorioration of spermatozoal plasma membrane is associated with an increase of sperm lysophosphatidylcholines. Andrología 34: 360 – 366.
32. Gulaya NM, Margitch VM, Calcada L. 2001. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. Arch Andro 146: 169-175.
33. Heite HJ, Wetterauer U. 1997. Unusually high gamma-glutamyltransferase level in the semen and its diagnostic significance. Hautarzt 28: 364-5.

34. Henry JB. 1991. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 18^{ava} ed. Philadelphia. p 204-211.
35. Herrera E. 1986. Evaluación de dilutores para la conservación de semen en ovinos. Tesis de Bachiller. Puno: Univ. Nacional del Altiplano. 72 p.
36. Herrero M, Laminande E, Gagnon C. 1999. Nitric oxide regulates human reproduction sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation in vitro. Biol. Reprod. 61: 575.
37. Hoffman, E. 2002. The Complete Alpaca Book. USA: Bonny Doon Publishing. 620 p.
38. Hoffmann WE, Kramer J, Main AR, Loch WF, Quimby FW. 1989. The clinical chemistry of laboratory animals. New York: Pergamon Press. p 237-278.
39. James PS, Wolfe CA, Maquie A, Ladha A, Prentice A, Jones R. 1999. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved. Hum Reprod 14: 1827 – 32.
40. Kareskoski AM, Reilas T, Andersson M. 2006. Motility and plasma membrane integrity of spermatozoa in fractionated stallion ejaculates after storage. Reprod. Domest. Anim. 4: 133-138
41. Kareskoski M, Katila T. 2008. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. Anim. Reprod. Sci. 107: 249-256.
42. Katila T, Karlsson M, Reilas T, Andersson M, Kaikkonen R, Koskinen E. 2001. Motility and viability of fractionated stallion ejaculates after cooled storage for 24 h Proc. 2nd Meeting of European Equine Gamete Group Havemeyer Foundation 5: 3-5.
43. Kolb E. 1979. Fisiología Veterinaria. 2^{da} ed. España: Editorial Acribia Zaragoza. 576 p.
44. Kulka P, Nissen HP, Kreysel HW. 1984. Triglycerides and phospholipids-relation to fertility. Andrologia 16: 48-51.
45. Kumar TR, Wiseman AL, Kala G. 2000. Reproductive defects in gamma-glutamyltranspeptidase-deficient mice. Endocrinology 141: 4270-7.
46. Lahnsteiner F, Patzne RA, Weismann T. 1993. Energy resources of spermatozoa of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. (Pisces: Teleostei). Reprod. Nutr. Dev. 33: 349-360.

47. Loomis PR. 2006. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am Equine Pract.* 22 (3): 663-676.
48. Mandal A, Naciby – Hasen S, Wolkwicz M, Klotz S, Retief J. 1999. A testis specific 95 – Kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitation human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 61: 1184 – 97.
49. Marin – Briggiler CJ, Vazquez – Levin MH, Gonzalez – Echevarría F, Bloquer JA, Tezon JG, Miranda PV. 1999. Strontion supports human sperm capacitation but not follicular fluid – induced acrosome reaction. *Biol. Reprod.* 61: 673 - 80.
50. Mc Donald L. 1978. *Reproducción y Endocrinología Veterinaria.* 2^{da} ed. México: Ed. Interamericana. 466 p.
51. Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod. Domes. Anim.* 43 (Suppl.4): 18-31.
52. Murray R, Mayes P, Rodwell V, Granner D. 1988. *Bioquímica de Harper.* 11^{ava} ed. México: Editorial el Manual Moderno. 713 p.
53. Padron RS, Mas I, Boston P. 1989. Lipid and testicular function. *Int. Urol. Nephrol.* 21: 515-519.
54. Paltiel L, Rønningen K, Meltzer H, Baker S, Hoppin J. 2008. Evaluation of Freeze Thaw Cycles on stored plasma in the Biobank of the Norwegian Mother and Child Cohort Study. *Cell Preserv. Technol.* 6(3): 223–230.
55. Ramirez-Torres MA, Carrera A, Zambrana M. 2000. High incidence of hyperestrogenemia and dyslipidemia in a group of infertile men. *Ginecol Obstet Mex* 68: 224-229.
56. Reis PJ, Sahlu T. 1994. The Nutritional control of the Growth and Properties of Mohair and Wool Fibers: A Comparative Review *J Anim Sci* 72:1899-1907.
57. Rigby SL, Brinsko SP, Cochran M, Blanchard TL, Love CC, Varner DD. 2001. Advances in cooled semen technologies. Seminal plasma and semen extender. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 171-180.
58. Russel AJF, Redden HL. 1997. The Effect of Nutrition on Fibre Growth in the Alpaca. *J Anim. Sci.* 64: 509-512.
59. Salisbury G, Van Demark J, Loodge J. 1978. *Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Bóvidos.* 2^{da} ed. España: Editorial Acribia. 831 p.

60. San Martín F. 1996. Nutrición en alpacas y llamas. Fondo contravalor Perú-Suiza, CISA/IVITA, Fac. Med. Vet., Univ. Nac. Mayor San Marcos Pub. Cient. IVITA N° 27:28.
61. Sebastian SM, Selvaraj S, Aruldas M. 1987. Pattern of neutral phospholipids in the semen of normospermic, oligospermic and azoospermic men. *Reprod. Fertil.* 79: 373–378.
62. Smith CL, Peter AT, Pugh DG. 1994. Reproduction in llamas and alpacas. *Theriogenology* 41: 573-596.
63. Sumar J. 1983. Studies on Reproductive Pathology in alpacas. Masters Thesis. Swedish University of Agriculture Sciences, Uppsala and Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 103 p.
64. Sumar J. 1997. Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. I Symposium Internacional Avances en Reproducción de Rumiantes. Lima. 30 p.
65. Tekin N, Secer S, Akcay E, Bozkurt Y, Kayam S. 2003. The effect of age on spermatological properties in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Turk J Vet. Anim. Sci.* 27: 37-44.
66. Therien I, Soubeyrand S, Manjunath P. 1997. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by highdensity lipoprotein. *Biol. Reprod.* 57: 1080-1088.
67. Tietz NW. 1994. *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 2^a ed. Philadelphia. p 1073-1091.
68. Töpfer – Petersen E, Ekhlasi – Hundrieser M, Tsolova M, Leeb T, Kirchhoff C, Müller P. 2005. Structure and function of secretory proteins of the male genital tract. *Andrología* 37: 202 – 204.
69. Topfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 89: 159-170.
70. Troedsson MH, Desvouses A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi WC. 2005. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science* 89: 171-186.

71. Uchijima Y, Yoshida K, Hiraga S. 1986. Studies on gamma-glutamyltranspeptidase (gamma-GTP) in seminal plasma. *Acta Urologica Japonica* 32: 553-9.
72. Vignon F, Koll-Back MH, Clavert A, Cranz C. 1989. Lipid composition of human seminal plasma. *Arch. Androl.* 22: 49-53.
73. Villarroel J. 1991. Las fibras. En: *Avances y perspectivas del conocimiento de los CSA*. Edi. Fernández Baca FAO Santiago Chile. p 363 - 386.
74. Villavicencio M. 1996. *Bioquímica*. 1^{ra}ed. Lima – Perú: Edit. CONCYTEC. 451 p
75. Viscont P, Kopf G. 1998. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. *Biol. Reprod.* 59: 1 – 6.
76. Wheeler, J.C. 1988. Origin and Evolution of the South American Camelidae. *Llamas* 2(3): 123- 133.
77. Yamamoto Y, Shimamoto K, Sofikitis N, Miyagawa I. 1999. Effects of hypercholesterolaemia on leydig and sertoli cell secretory function and the overall sperm fertilizing capacity in the rabbit. *Hum Reprod.* 14: 1516-1521.
78. Zabludovsky N, Eltes F, Har – Even D, Geva E, Berkovitz E, Amit A, Barak Y, Bartoov B. 1999. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. *Andrología* 31: 91 – 8.
79. Zalata A, Hafez T, Mahmoud A. 1995. Relationship between resazurin reduction test, reactive oxygen species generation, and γ -glutamyltransferase. *Hum. Reprod.* 10:1136-40.