

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

COMPARAR EL EFECTO DE LAS ENZIMAS NATURALES (BROMELINA Y PAPAÍNA) Y ENZIMAS ARTIFICIALES (TRIPSINA Y HIALURONIDASA), EN LA DILUCIÓN DE SEMEN FRESCO DE ALPACA (*Vicugna pacos*) DE LA RAZA HUACAYA ACLIMATADOS A LA ZONA COSTA DE TACNA - 2019

TESIS

Presentada por:

Bach. JOSSELIM LUCERO HUALLIPE ROJAS

Para optar el título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

TACNA – PERÚ

2021

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias Agropecuarias

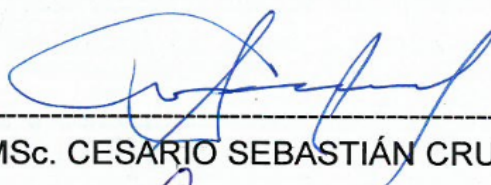
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia

TESIS

COMPARAR EL EFECTO DE LAS ENZIMAS NATURALES (BROMELINA Y PAPAÍNA) Y ENZIMAS ARTIFICIALES (TRIPSINA Y HIALURONIDASA), EN LA DILUCIÓN DE SEMEN FRESCO DE ALPACA (*Vicugna pacos*) DE LA RAZA HUACAYA ACLIMATADOS A LA ZONA COSTA DE TACNA - 2019

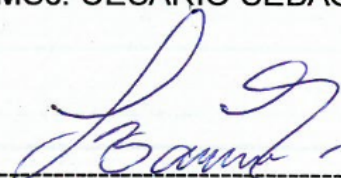
TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 12 DE ENERO DEL 2021,
SIENDO EL JURADO CALIFICADOR:

PRESIDENTE:



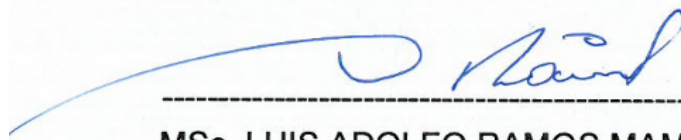
MSc. CESARIO SEBASTIÁN CRUZ ANCHAPURI

SECRETARIO:



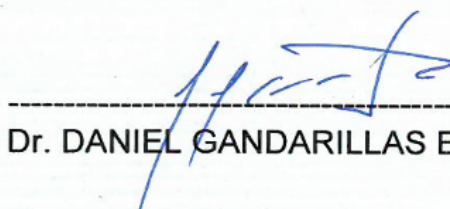
MSc. LUIS ALBERTO BARRIOS MOQUILLAZA

VOCAL:



MSc. LUIS ADOLFO RAMOS MAMANI

ASESOR:



Dr. DANIEL GANDARILLAS ESPEZÚA

DEDICATORIA

A Dios porque ha estado conmigo, cuidándome y dándome fortaleza para continuar.

A mi abuelo, por ser la fuerza y luz que me acompaña día a día.

A mi mamita Angélica y mi papá Alberto, por su apoyo constante y ser el motivo y mi motor más grande para cumplir todas mis metas.

AGRADECIMIENTO

A mi alma mater, la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, por todos los conocimientos y experiencias adquiridas en el transcurso de mi vida universitaria.

A mi Asesor el Dr. Daniel Gandarillas Espezúa por sus enseñanzas, confianza, su apoyo y brindarme todas las oportunidades para la ejecución de esta investigación.

Al Proyecto de investigación “Uso de biotecnología para el mejoramiento genético y desarrollo de capacidades en el manejo de alpacas en la zona alto andina de Tacna” por brindarme su apoyo para el desarrollo de esta tesis.

A mi gran compañero de vida que me impulsó en todo momento a seguir en el fascinante mundo de la veterinaria.

A mis amigos y compañeros, que han formado parte de mi vida profesional.

A los miembros del Jurado de Tesis, que me motivaron y ayudaron en la corrección del proyecto de tesis.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Justificación.....	4
1.2 Objetivos.....	6
1.2.1 Objetivo General.....	6
1.2.2 Objetivos Específicos.....	7
1.3 Hipótesis.....	7
1.3.1 Hipótesis de investigación	7
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes.....	8
2.1.1 Nacional.....	8

2.1.2	Internacional	10
2.2	Bases Teóricas.....	14
2.3	Marco Conceptual	27
CAPÍTULO III MATERIAL Y MÉTODO		29
3.1	Material.....	29
3.1.1	Ubicación Geográfica y Temporal.....	29
3.1.2	Población y Muestra	29
3.1.3	Materiales	30
3.2	Método	32
3.2.1	Tipo y Diseño de Investigación	32
3.2.2	Diseño Procedimental.....	32
3.2.3	Análisis de Datos	40
CAPÍTULO IV RESULTADOS		42
4.1	Resultados.....	42
4.2	Contrastación de hipótesis.....	47
CAPÍTULO V DISCUSIÓN.....		49
5.1	Filancia.....	49
5.2	Motilidad.....	52
5.3	Viabilidad espermática	54
CONCLUSIONES		57
RECOMENDACIONES.....		58

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
ANEXOS.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de muestras de semen para evaluación.....	30
Tabla 2. Valoración de la motilidad total para semen	34
Tabla 3. Filancia de semen de alpaca (cm) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos.....	42
Tabla 4. Motilidad de espermatozoides (%) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos.....	44
Tabla 5. Viabilidad de espermatozoides (%) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma para la extracción de la enzima bromelina	35
Figura 2. Flujograma para la extracción de la enzima papaína.....	36
Figura 3. Filancia de semen de alpaca (cm) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos.....	43
Figura 4. Motilidad de espermatozoides (%) antes y después de la dilución con los tratamientos enzimáticos	45
Figura 5. Viabilidad de espermatozoides (%) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos.....	47

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Valores iniciales de volumen, filancia, motilidad y viabilidad por animal	70
Anexo 2. Filancia, motilidad y viabilidad en relación a la enzima utilizada.....	70
Anexo 3. Prueba de Friedman para filancia.	71
Anexo 4. Estadística de grupo para filancia total después de la dilución del semen con tratamientos enzimáticos: Bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa	71
Anexo 5. Prueba de Friedman para motilidad	71
Anexo 6. Estadística de grupo para motilidad total después de la dilución del semen con tratamientos enzimáticos: Bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa.....	72
Anexo 7. Prueba de Friedman para viabilidad.	72
Anexo 8. Estadística de grupo para viabilidad total después de la dilución del semen con tratamientos enzimáticos: Bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa.....	72
Anexo 9. Registro de colecta diaria de alpacas, valores antes y después de la dilución del semen con tratamientos enzimático.	73

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Proyecto de Investigación: “Uso de biotecnología para el mejoramiento genético y desarrollo de capacidades en el manejo de alpacas (*Vicugna pacos*) en la zona alto andina de Tacna”, en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, ubicado en la sede los Pichones Sur. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento del semen a la dilución con enzimas naturales (bromelina y papaína) y enzimas artificiales (tripsina y hialuronidasa) en alpaca de la raza Huacaya aclimatados a la zona Costa de Tacna. Se colectaron muestras de semen de 4 alpacas macho de los cuales se obtuvieron 40 eyaculados; los parámetros espermáticos evaluados en fresco fueron filancia, motilidad total y viabilidad espermática; posteriormente fueron divididas en cuatro fracciones, cada fracción diluida con T1 (bromelina), T2 (papaína), T3 (tripsina) y T4 (hialuronidasa), estas se mantuvieron en baño maría por un período de 1 minuto para el T1, 5 minutos para el T3 y T4 y 15 minutos para el T2, finalizado estos tiempos se evaluó el efecto enzimático en la filancia, motilidad total y viabilidad espermática. Los resultados obtenidos en la evaluación en fresco en filancia fue de $1,94 \pm 0,32$ cm; con el T1 fue de $0,04 \pm 0,03$ cm, con el T2 fue de $0,24 \pm 0,19$ cm, con el T3 fue de $0,37 \pm 0,18$ cm y en el T4 fue de

0,64±0,20 cm ($p<0,05$); el resultado obtenido en la evaluación en fresco en motilidad total fue de 38±7.26 %; con el T1 fue de 35,25±5,68 %, con el T2 fue de 29,23±8,85 %, con el T3 fue de 24,60±11,25 % y en el T4 fue de 25,38±7,85 % ($p<0,05$); a la evaluación de la viabilidad espermática en fresco fue de 49,15±2,97 %; con el T1 fue de 48,98±2,39 %, con el T2 fue de 49,15±4,60 %, con el T3 fue de 47,38±4,62 % y con el T4 fue de 47,38±3,99 % ($p>0,05$). En conclusión, se encontró que las características espermáticas evaluadas post-tratamiento enzimático fueron afectadas por el proceso enzimático; habiéndose hallado diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a filancia y motilidad espermática, mas no así en viabilidad espermática. Obteniendo como mejores resultados las enzimas naturales (bromelina) para filancia y motilidad y en cuanto a viabilidad no se observó ningún efecto sobre los 4 tratamientos.

Palabras Clave: Bromelina, Enzima, Filancia, Hialuronidasa, Motilidad, Papaína, Semen, Tripsina, Viabilidad.

ABSTRACT

This research work was carried out in the Research Project: "Use of biotechnology for genetic improvement and capacity development in the management of alpacas (*Vicugna pacos*) in the high Andean area of Tacna", at the National University Jorge Basadre Grohmann, located at the headquarters of Los Pichones Sur. The objective of this work was to evaluate the behavior of semen at dilution with natural enzymes (bromelain and papain) and artificial enzymes (trypsin and hyaluronidase) in alpaca of the Huacaya race acclimatized to the Costa de Tacna area. Semen samples were collected from 4 male alpacas, of which 40 ejaculates were obtained; the sperm parameters evaluated in fresh were filament, total motility and sperm viability; subsequently they were divided into four fractions, each fraction diluted with T1 (bromelain), T2 (papain), T3 (trypsin) and T4 (hyaluronidase), these were kept in a water bath for a period of 1 minute for T1, 5 minutes for T3 and T4 and 15 minutes for T2, at the end of these times the enzymatic effect on the filament, total motility and sperm viability was evaluated. The results obtained in the evaluation in fresh filament was $1,94 \pm 0,32$ cm; with T1 it was $0,04 \pm 0,03$ cm, with T2 it was $0,24 \pm 0,19$ cm, with the T3 it was $0,37 \pm 0,18$ cm and in T4 it was $0,64 \pm 0,20$ cm ($p < 0,05$); the result obtained in the evaluation in fresh in

total motility was $38 \pm 7,26$ %; with T1 it was $35,25 \pm 5,68$ %, with T2 it was $29,23 \pm 8,85$ %, with the T3 it was $24,60 \pm 11,25$ % and in T4 it was $25,38 \pm 7,85$ % ($p < 0,05$); The evaluation of fresh sperm viability was $49,15 \pm 2,97$ %; with T1 it was $48,98 \pm 2,39$ %, with T2 it was $49,15 \pm 4,60$ %, with T3 it was $47,38 \pm 4,62$ % and with the T4 it was $47,38 \pm 3,99$ % ($p > 0,05$). In conclusion, it was found that the spermatic characteristics evaluated after enzymatic treatment were affected by the enzymatic process; having found significant differences between treatments with respect to sperm filament and motility, but not in sperm viability. Obtaining as best results the natural enzymes (bromelain) for filancia and motility and in terms of viability there is no effect on the 4 treatments.

Keywords: Bromelain, Enzyme, Filament, Hyaluronidase, Motility, Papain, Semen, Trypsin, Viability.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de gametos es una técnica reproductiva que se difunde y se desarrolla ampliamente en todo el mundo, en donde el material genético se difunde a través del tiempo y espacio mediante su uso en las técnicas de biotecnología reproductiva. En donde las dificultades en el manejo de las muestras seminales, debido a su alta viscosidad, y el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados para el semen de Camélidos sudamericanos (CSA) se constituye en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de biotecnología (Bravo et al., 1997).

El semen de las alpacas se caracteriza por presentar la viscosidad que aporta el plasma seminal; esta característica dificulta el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida, como es el caso de la inseminación artificial (Bravo et al., 2000).

En estudios anteriores se determinó que la presencia de espermatozoides inmóviles o con poca movilidad sería una condición inherente o propia de esta especie y que, por lo tanto, el porcentaje de movilidad en semen fresco no sería un parámetro indicativo de la calidad del eyaculado. Se puede promover la movilidad espermática progresiva y facilitar las evaluaciones microscópicas mediante la incubación enzimática con: bromelina, papaína,

tripsina y hialuronidasa, los cuales diluyen la filancia del semen, obteniendo una movilidad progresiva y así también nos facilita las evaluaciones del eyaculado (Bravo et al.,2000).

El resultado de esta investigación aporta datos para futuras investigaciones sobre la evaluación de la fisiología de semen de alpacas y la degelificación de la viscosidad del semen con enzimas naturales como la papaína y la bromelina.

El objetivo del presente estudio fue determinar el tiempo de dilución de la filancia, y el efecto de la bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa, sobre la filancia, motilidad, viabilidad del semen en alpacas, de este modo se podría aplicar las técnicas reproductivas asistidas en el campo de esta especie, como es el caso de la inseminación artificial como técnica para acelerar la difusión del material genético en poblaciones aún mayores de nuestra región.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las características del semen en alpacas es la viscosidad y filancia que aporta el plasma seminal; esta característica dificulta el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida, como es el caso de la inseminación artificial (Bravo et al., 2000). En tal sentido la filancia es un factor que afecta la dilución de semen de alpacas, la cual se puede tratar con métodos enzimáticos naturales y artificiales, que diluyan la filancia del semen; logrando así una mayor facilidad en la manipulación del semen, donde en las evaluaciones del eyaculado se observa una movilidad progresiva.

El desarrollo de la inseminación artificial (IA) sería muy valiosa en alpacas y llamas para contribuir en el avance genético para mejorar los rebaños (Novoa y Leyva, 1996); sin embargo, está pobremente desarrollada debido a la dificultad para coleccionar semen de buena calidad y, por otro lado, la alta filancia propia del semen (Morton et al., 2006). El primer paso en el manejo del semen es la dilución de la filancia, permitiendo así simplificar la manipulación y permitir la dilución, extensión y congelación del semen, logrando así establecer una técnica reproductiva como lo es la Inseminación artificial con semen congelado, la cual difunde material

genético en una mayor población; aumentando las tasas de preñez (Zirena N., 2014).

Existen diversos métodos para el manejo de la filancia del semen de alpaca; uno es a través del manejo físico de las muestras: pipeteo continuo de las muestras de incubación en baño maría. Siendo estos los más accesibles al operario y en donde la integridad de la membrana del espermatozoide es menos alterada. Existen otros métodos enzimáticos donde el semen es sometido al proceso de degradación de su filancia, mediante la dilución con enzimas como: bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa, tripsina (Bravo et al., 2000).

La investigación pretendió generar procedimientos enzimáticos naturales (bromelina y papaína) y artificiales (tripsina y hialuronidasa), que rompan la filancia espermática, para obtener la dilución de semen para la reproducción en alpacas.

1.1 Justificación

El trabajo de investigación tiene como finalidad identificar factores que intervienen en la eficiencia reproductiva de la alpaca; por lo cual esta investigación se enfocó en la evaluación de la calidad del semen de machos reproductores.

En el aspecto fisiológico, el semen de los Camélidos sudamericanos presentan características limitantes particulares propia de la especie, tales como baja concentración de espermatozoides, alto porcentaje de espermatozoides anormales y un plasma seminal con alta filancia que es la capacidad de formación de hilo y es, por lo tanto, una característica reológica diferente a la viscosidad, siendo independiente una de la otra la que dificulta el desplazamiento normal de los espermatozoides (Banda et al., 2010; Casaretto et al., 2012). Estas limitaciones dificultan la implementación de biotecnologías reproductivas tan básicas como la inseminación artificial con semen congelado.

El estudio tiene como objetivo evaluar el efecto de las enzimas artificiales y naturales en la dilución de semen fresco, para romper la filancia, preservando la motilidad y viabilidad espermática. Además, el estudio brindó nuevos conocimientos sobre el comportamiento de las enzimas naturales y artificiales sobre la viscosidad e integridad espermática en semen de alpaca. Dicho efecto enzimático permite el fácil manejo del semen en relación con el manejo de dilutores, lográndose así desarrollar técnicas de reproducción asistida como la fecundación in-vitro e inseminación intra-citoplasmática (ICSI), los cuales permitieron conocer el comportamiento del semen en estas tecnologías (Bravo et al., 2000).

Desde el punto de vista metodológico se desarrolló las técnicas convencionales en la colecta de semen (con vagina artificial y/o maniquí, siendo una de las técnicas de fácil manejo), dentro de la evaluación de los parámetros seminales se estableció protocolos para la dilución de la filancia mediante tratamientos enzimáticos.

Este proyecto pretendió establecer el adecuado tratamiento enzimático para la dilución de la filancia del semen de alpaca; y así de esta manera aplicar estas biotecnologías en comunidades alto andinas alpaqueras; mediante la difusión de mejores sementales a productores alpaqueros que podrán disminuir los costos de producción y acelerar la difusión del material genético en poblaciones aún mayores de nuestra región.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Comparar el efecto de las enzimas naturales (bromelina y papaína) y enzimas artificiales (tripsina y hialuronidasa), en la dilución de semen fresco de alpaca (*Vicugna pacos*) de la raza Huacaya aclimatadas a la zona Costa de Tacna.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Comparar la filancia en la dilución de semen fresco utilizando las enzimas naturales (bromelina y papaína) y enzimas artificiales (tripsina y hialuronidasa) en alpaca (*Vicugna pacos*) de la raza Huacaya aclimatados a la zona Costa de Tacna.
- Comparar la motilidad en la dilución de semen fresco utilizando las enzimas naturales (bromelina y papaína) y enzimas artificiales (tripsina y hialuronidasa), en alpaca (*Vicugna pacos*) de la raza Huacaya aclimatados a la zona Costa de Tacna.
- Comparar la viabilidad en la dilución de semen fresco utilizando las enzimas naturales (bromelina y papaína) y enzimas artificiales (tripsina y hialuronidasa), en alpaca (*Vicugna pacos*) de la raza Huacaya aclimatados a la zona Costa de Tacna.

1.3 Hipótesis

1.3.1 Hipótesis de investigación

- El comportamiento de la filancia, motilidad y viabilidad del semen en la dilución con enzimas naturales y artificiales resultan ser mejores en comparación al semen fresco.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

2.1.1 Nacional

Un estudio en Cusco determinó el efecto de las enzimas sobre la filancia del semen en alpacas, en donde el efecto de cuatro enzimas: colagenasa, fibrinolisisina, hialurodinasa y tripsina fueron registradas en la evaluación de la viscosidad, motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de acrosoma del semen de alpaca. Las muestras de semen fueron recolectadas usando una vagina artificial para cada una de las alpacas. Una solución al 25 % de la enzima a una concentración de 1 mg/ml fue agregado a la eyaculación. El análisis de varianza se utilizó para determinar las diferencias en la eliminación de la viscosidad y las alteraciones en motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y la integridad acrosomal a 0 (tiempo de recolección del semen), 2 y 5 min. En el semen de alpacas, colagenasa eliminó la viscosidad en 100 y 99 % de las muestras, respectivamente, la fibrinolisisina en 89 y 59 %; hialurodinasa en 88 y 36 %; y tripsina en 55 y 68 % de las muestras ($p < 0,05$). En el semen de alpacas,

las enzimas utilizadas no tuvieron ningún efecto sobre la motilidad del esperma. El porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó de forma variable después del tratamiento con fibrinolisisina, hialurodinasa y tripsina. No hubo una diferencia significativa en la integridad del acrosoma. En general, la colagenasa tuvo poca o ninguna influencia en la disminución de la motilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos y la integridad del acrosoma, mientras que fue eficaz para eliminar la viscosidad del semen (Bravo et al., 2000).

Otro estudio en Cusco determinó el Efecto de dos tiempos de incubación en papaína en los parámetros cinéticos de los espermatozoides de llama (lama glama), el objetivo del trabajo fue determinar el efecto de dos tiempos de incubación en papaína (15 y 60 minutos) en los parámetros de movilidad de los espermatozoides de llama. Se utilizó 9 eyaculados de 3 llamas, colectados por electro eyaculación en 3 oportunidades, con intervalos de 1 semana entre cada colecta. A las muestras de semen, se añadió papaína (0,1 mg/ml de Tris) en una proporción de 1:1, manteniéndose 15 y 60 minutos a una temperatura de 37 °C, luego se agrega 20 µL del inhibidor de papaína por mL de semen diluido durante 5 minutos a la misma temperatura. Los parámetros cinéticos de los espermatozoides de llama fueron evaluados con un sistema CASA (ISAS), se determinó la velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), la velocidad promedio (VAP),

índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), índice de oscilación (WOB), movimiento lateral de la cabeza (ALH), y frecuencia de batida de la cola (BCF). Se halló que los parámetros cinéticos de los espermatozoides de llama son superiores ($p < 0,05$) al ser tratados 60 minutos en relación a 15 minutos de incubación en papaína. El volumen del semen colectado fue $4,5 \pm 0,77$ mL; la filancia fue $4,83 \pm 1,2$ cm; con una motilidad de $27,8 \pm 7,21$ %, y una concentración de $66,98 \pm 46,85$ ($\times 10^6$ spz/mL) en semen fresco. La motilidad fue de 37,25 % en el tiempo de incubación de 15 minutos y de 68,98% en 60 minutos con papaína, siendo este último estadísticamente superior ($p < 0,05$), en conclusión, se recomienda utilizar la enzima papaína con un período de incubación de 60 minutos, en donde reporta mejores resultados (Cucho et al., 2018).

2.1.2 Internacional

Un estudio en Italia determinó el Efecto de los tratamientos de α -Amilasa, Papaína y Spermfluid sobre la viscosidad y los parámetros del semen de los eyaculados de camello dromedario; en la cual llevaron a cabo la siguiente metodología de trabajo, se utilizaron eyaculaciones de cinco camellos dromedarios clínicamente sanos (*Camelus dromedarius*) para evaluar los efectos de diferentes tratamientos enzimáticos (amilasa, papaína, Spermfluid) en licuefacción y parámetros seminales. Después de

la colección, los eyaculados se dividieron en 5 partes alícuotas: (1) sin diluir (control); o diluido 1: 1 con: (2) Tris-Citrato-fructosa (TCF), (3) TCF que contiene amilasa, (4) TCF que contiene papaína o (5) Spermfluid que contiene Bromelina. A los 120 minutos después de la dilución, se evaluó cada alícuota, a intervalos de 20 minutos, para determinar la viscosidad, la motilidad, viabilidad y la aglutinación. Sólo las alícuotas diluidas con TCF que contenían papaína se sometieron a licuefacción completa.

La motilidad del espermatozoide disminuyó significativamente durante los tiempos de observación, excepto por las muestras diluidas con Spermfluid ($P = 0,005$). Las muestras diluidas mostraron diferentes niveles de aglutinación, siendo el más bajo observado en el control y el más alto en las muestras tratadas con papaína. Donde concluye que la viscosidad de los camellos dromedarios podría reducirse efectivamente usando la enzima proteolítica papaína. La motilidad con el grupo control a las 0 horas:3,2, 20 min:2,3, 40 min:1,6, 60 min:1,1, 90 min:0,6, 120 min:0,1. la motilidad con el tratamiento tris citrato fructosa a las 0 horas:3,2, 20 min:3,3, 40 min:2,8, 60 min:2,5, 90 min:1,9, 120 min:1,6. La motilidad con el tratamiento TCF+Amilasa a las 0 horas:3,0, 20 min:3,3, 40 min:2,7, 60 min:2,4, 90 min:2,2, 120 min:1,4. En el tratamiento con TCF + Papaína a las 0 horas:3,3, 20 min:3,5, 40 min:2,7, 60 min:2,5, 90 min:1,9, 120 min:1,9. En el tratamiento con Spermfluid a las

0 horas:3, 20 min:2,9, 40 min:3,3, 60 min:3,4, 90 min:3,1, 120 min:2,7
(Monaco et al., 2016).

En Australia se realizó un estudio en el efecto del plasma seminal sobre el efecto de las enzimas y proteasas de glicosaminoglicanos en la viscosidad del plasma seminal de alpaca y la función espermática. Este estudio investigó el efecto de las enzimas GAG hialuronidasa, condroitinasa ABC y queratanasa y las proteasas papaína y proteinasa K sobre la viscosidad plasmática seminal y la función espermática, para ayudar a identificar la causa de la viscosidad plasmática seminal y proponer métodos para la reducción de la viscosidad. Este estudio se realizó como dos experimentos, en el experimento 1 se determinó el efecto de la hialuronidasa, condroitinasa ABC y papaína sobre la viscosidad plasmática seminal y la función espermática y en el experimento 2 se determinó el efecto de queratanasa, proteinasa K y papaína sobre la viscosidad plasmática seminal y la función espermática. En el experimento se recolectó semen de cuatro machos durante el verano usando una vagina artificial colocada en un maniquí. Dentro de los 5 minutos de la recolección, se evaluó el volumen de semen, viscosidad, motilidad y concentración de espermatozoides. Después de la recolección se diluyó 1 ml de semen con una concentración de 1:1 con tris-citrato-fructosa (Evans y Maxwell, 1987). El diluido se dividió en cinco grupos de tratamientos; (1) Control: 380 μ L de semen diluido más

20 μ L de 0,01 % de BSA, (2) Hialuronidasa: 380 μ L de semen diluido más 20 μ L de hialuronidasa, (3) Condroitinasa ABC: 380 μ L de semen diluido más 20 μ L, (4) Hialuronidasa y condroitinasa ABC y (5) Papaína: 380 μ L de semen diluido más 20 μ L. Las muestras fueron incubadas para 2 horas a 37 °C en un baño maría. Se evaluaron la movilidad, la viabilidad y la integridad del acrosoma, después de la dilución (tiempo 0) y a los 30, 60 y 120 minutos después del tratamiento enzimático. La integridad del ADN de los espermatozoides se evaluó a los 0 y 60 minutos después del tratamiento enzimático. En el presente estudio después de 2 h de incubación, la hialuronidasa, condroitinasa ABC y hialuronidasa más condroitinasa ABC redujo la viscosidad en un 62 %, 65 % y 71 % respectivamente en comparación con el 60 % en las muestras de control y la queratanasa redujo la viscosidad en un 48 % en comparación con el 46 % en las muestras de control. La papaína y la proteinasa K eliminaron por completo la viscosidad, dentro de 30 min y 60 min respectivamente indicando que la viscosidad del semen en las alpacas es causada por proteoglicanos u otras proteínas plasmáticas seminales como papaína (Kavanagh et al., 2002) y proteinasa K (Grande-Allen et al., 2004).

La movilidad de los espermatozoides, la integridad del ADN, la integridad del acrosoma y la viabilidad se evaluaron durante 2 horas de incubación. Todas las enzimas redujeron la viscosidad plasmática seminal en

comparación con el control ($P < 0,001$) aunque la papaína fue más efectiva, eliminando completamente la viscosidad dentro de los 30 minutos de tratamiento. La proporción de espermatozoides intactos viables y acrosómicos se redujo en todas las muestras tratadas con enzimas excepto aquellos tratados con papaína ($P < 0,001$) (Kershaw-Young et al., 2013).

2.2 Bases Teóricas

Camélidos sudamericanos

El Perú es el principal productor de camélidos sudamericanos del mundo, la población de alpacas es de alrededor de 3,7 millones de ejemplares, la domesticación de esta especie data de hace más de 7 mil años. Puno es la región con mayor población de alpacas con aproximadamente 1 millón 460 mil, seguido por Cusco con 546 mil y Arequipa con una población de más de 468 mil ejemplares. La producción de alpaca en el Perú representa el 80% de la producción total a nivel mundial. Ministerio de Agricultura y Riego - Dirección General de Políticas Agrarias (MINAGRI, 2018).

Características del semen

El semen es la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino, la porción líquida de dicha suspensión se conoce

como plasma seminal (Hafez y Hafez, 2002). La composición bioquímica del plasma seminal de los camélidos ha sido descrita e incluye, entre otras cosas, cloruros, calcio, proteínas, lípidos y glucosa en concentraciones similares a los observados en semen de carnero y de toro, pero la concentración de fructosa y ácido cítrico es mucho menor en el plasma seminal de alpaca y camello, probablemente debido a la ausencia de las glándulas vesiculares, que son la principal fuente de fructosa y ácido cítrico en otras especies (Vaughan et al., 2003). El semen de camélidos es altamente viscoso con una baja concentración de espermatozoides, la viscosidad del plasma seminal es el mayor impedimento sobre la investigación en la criopreservación de semen y otras tecnologías de reproducción asistida (Kershaw - Young y Maxwell, 2012).

Características macroscópicas:

Color

El color de los eyaculados varía de blanco lechoso a blanco cristalino, según la concentración de espermatozoides y el grado de contaminación con otros fluidos, también el color puede ser modificado por la presencia de elementos anormales (Sumar y Leyva, 1981). Las tonalidades del color crema nos indicarían la presencia de concentraciones altas de espermatozoides en los eyaculados (Paricahua, 2001).

Volumen

En alpacas, los testículos promedian de 3 a 5 cm de longitud y 15 a 18 g de peso, lo que equivale a 0,02 a 0,03 por ciento del peso corporal en comparación con el 0,18 y 1,4 en los toros y carneros, respectivamente (Vaughan et al., 2003). En consecuencia, los camélidos producen menos espermatozoides al día en comparación con los carneros y toros (Kershaw - Young y Maxwell, 2012). En camélidos aproximadamente el 85 por ciento del eyaculado es plasma seminal y el 15 por ciento restantes, son espermatozoides (Bravo et al., 1997). El volumen colectado de semen de alpaca es variable.

pH

En las alpacas, los valores de pH se acercan mucho a la neutralidad, con cierta tendencia a la alcalinidad ligera y aumenta en el semen contaminado con orina, sobre todo en la colección por electro eyaculación (Sumar, 2002). El pH del semen de alpaca está comprendido entre 7,1 a 8,3 y en llamas entre 7,2 a 8,6 (Hanzen et al., 2014).

Viscosidad y filancia

La alta viscosidad es común en semen de los camélidos, esto representa un desafío más para desarrollar la inseminación artificial, esta viscosidad

natural es el principal obstáculo que impide el desarrollo de la conservación y la inseminación artificial (Morton et al., 2009). También impide la mezcla homogénea del semen con un dilutor, lo que limita el contacto entre la membrana del espermatozoide y los compuestos crioprotectores utilizados en la congelación (Kershaw-Young y Maxwell, 2012).

La concentración de glicosaminoglicanos (GAG) en el plasma seminal de alpaca es 15 veces mayor que en la del carnero y más del 85 por ciento del contenido total de GAG en el plasma seminal de alpaca es sulfato de queratán, y este se correlaciona con la viscosidad (Kershaw-Young y Maxwell, 2012). Debido a esta alta viscosidad el movimiento de los espermatozoides es lento (Sumar y Leyva, 1981).

Se han utilizado varios tipos de enzimas con la finalidad de disminuir y/o eliminar esta característica. Bravo et al., (1999) demostraron que soluciones con una concentración de 1,25 por ciento de tripsina y 5 mg/ml de colagenasa, facilitan la eliminación de la viscosidad y mejoran el manejo del semen de alpaca. Giuliano et al., (2010) reportaron que el tratamiento de semen con 0,1 por ciento de colagenasa mejora las propiedades reológicas del semen de llama y facilita la separación de los espermatozoides del plasma seminal. Kershaw et al., (2016) indicaron que el uso de papaína en una concentración de 1 mg/ml, elimina la viscosidad

del semen de alpaca, mientras mantiene la motilidad, viabilidad, integridad acrosomal e integridad de ADN espermático.

La filancia de semen se define como la capacidad de formación de hilo, por lo tanto, es una característica reológica diferente a la viscosidad (Giuliano, 2012). En un estudio en semen obtenido por vagina artificial de 22 alpacas machos, se encontró una filancia de 22,3 – 25,5 mm (Naveros y Contreras, 2014). El tratamiento enzimático disminuye esta característica, se ha reportado $37,3 \pm 12,4$ mm de filancia en semen normal y $5,0 \pm 2,0$ mm para semen tratado con colagenasa (Olaguivel y Naveros, 2014).

El plasma seminal de las alpacas está compuesto por las secreciones de las glándulas anexas, las que son vertidas hacia la uretra durante la eyaculación, generándose así la mezcla con los espermatozoides (Sumar, 2002). Dichas secreciones contienen diversos componentes bioquímicos que regulan diferentes funciones espermáticas (Barrios et al., 2000), y que por la presencia de mucopolisacáridos confieren la viscosidad al plasma (Garnica et al., 1993). La disminución de la viscosidad depende de cada macho y tiende a disminuir con el aumento de eyaculados en un día (Tibary y Vaughan, 2006).

Características microscópicas:

La evaluación microscópica del semen, tiene por finalidad determinar su calidad y calcular el número de dosis que se pueden obtener de un eyaculado, garantizando su eficiencia (Bustinza, 2001). La evaluación del semen es necesaria para implementar planes de manejo reproductivo y que los métodos tradicionales de estimación de la calidad de los eyaculados de diferentes especies se han basado principalmente en la evaluación de la movilidad individual, la morfología espermática y el número total de espermatozoides (Giuliano, 2012).

Motilidad espermática

La motilidad de los espermatozoides constituye un elemento importante para la valoración de la calidad e indica el grado de energía de éstos, la evaluación debe ser inmediata a la colección para apreciar la intensidad del movimiento espermático (Sumar y Leyva, 1981). La motilidad es quizás el parámetro más cercano para medir la viabilidad de los espermatozoides, basados en este supuesto, la observación visual de la motilidad es el criterio más comúnmente utilizado para estimar la viabilidad espermática (Aller et al., 2003).

Las muestras con motilidad inicial mayor a 60 % logran mejores porcentajes de motilidad post-descongelamiento, en comparación con las muestras que inician con motilidades menores a 60 % (Choez et al., 2013).

En alpacas debido a la alta viscosidad del plasma seminal, no se observa “motilidad masal” (no hay remolinos) y la motilidad progresiva individual es muy lenta comparado al ovino y vacuno (Sumar, 2002). La motilidad es mejorada mediante la utilización de enzimas, es así para semen de alpacas obtenido por vagina artificial, un promedio de 22,38 y 40,60 %, para eyaculados sin y con tratamiento de colagenasa respectivamente; y la motilidad post descongelación tuvo un promedio de 12,50 y 24,57 % para el grupo sin y con colagenasa, respectivamente (Olaguivel y Naveros, 2014).

Concentración espermática

La cantidad de espermatozoides es una característica muy variable, nos expresa el número de células espermáticas por ml, por lo que es importante la determinación precisa del número de espermatozoides, la concentración se mide usando un hemocitómetro, un colorímetro o un espectrofotómetro (Hafez y Hafez, 2002).

La concentración espermática en alpacas varía de 30 000 a 150 millones de espermatozoides por ml y varía considerablemente entre machos,

eyaculados y procedimiento de colección de semen (Vaughan et al., 2003). La concentración de espermatozoides depende de la secreción de testosterona por los testículos, edad y tamaño del animal e igualmente puede ser modificado por factores como la alimentación, salud y tamaño testicular (Hafez y Hafez, 2002).

Vitalidad espermática.

Esta evaluación proporciona un control sobre la evaluación de la motilidad, ya que el porcentaje de células muertas no debe exceder el porcentaje de espermatozoides inmóviles, se basa en el principio de que las membranas plasmáticas dañadas, como las que se encuentran en las células no vitales (muertas), permiten la entrada de colorantes impermeables a la membrana (WHO, 2010).

Hay varios métodos para determinar la viabilidad espermática, la más usada es la tinción de eosina – nigrosina (Alarcón et al., 2012; Canorio et al., 2015). La técnica de doble tinción utilizado para evaluar conjuntamente la integridad acrosomal, que emplea el colorante Azul tripán como indicador de vitalidad y Giemsa que se adhiere a la matriz acrosomal (Banda et al., 2010; Choez et al., 2013). En la práctica se debe considerar a los espermatozoides vivos pero anormales como muertos, para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos normales (Giuliano, 2012).

Funcionalidad de membrana espermática

Los espermatozoides de los camélidos sudamericanos no presentan movilidad progresiva, por lo que es necesario determinar si en el eyaculado existe una población de espermatozoides inmóviles con las membranas funcionales e íntegras, por esta razón el porcentaje de movilidad espermática no sería un estimador de la calidad del eyaculado y la presencia de espermatozoides inmóviles o con poca movilidad sería una condición inherente o propia de estas especies (Giuliano, 2012).

Integridad de acrosoma espermático

El acrosoma es un organelo membranoso de doble capa ubicada en la parte apical de la cabeza espermática, que contiene distintas enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina (Ugarelli et al., 2017). La determinación de la integridad acrosomal es uno de los parámetros espermáticos de importancia, debido a su papel en la reacción acrosomal que es un proceso excitótico, que consiste en la fusión del acrosoma con la membrana plasmática, resultando en la exposición y liberación del contenido acrosomal al medio extracelular (Ramalho-Santos et al., 2002). Por esta razón es muy importante para la fertilización y el empleo de técnicas para su valoración en camélidos sería de utilidad para evaluar los efectos que puedan tener las diferentes biotecnologías (Giuliano, 2012).

Colecta de semen

La colección de semen en llamas y alpacas ha pasado por varios métodos conforme han avanzado los años. Primeramente, se reportó el uso de condones, luego el electro eyaculación, la fístula uretral, vagina artificial, y ahora último la aspiración de semen del fondo vaginal (Bravo y Alarcón, 2013).

La colección de semen en camélidos sudamericanos tiene grandes inconvenientes, tales como la duración de la cópula, la posición de cópula, el lugar de depósito del semen y el tipo de eyaculación, así como el aspecto del eyaculado, su extrema viscosidad y lo dificultoso de su manejo hizo que se investigue una técnica óptima para poder extraer semen y poder manejarlo sin que éstos pierdan su capacidad fecundante.

Uno de los métodos más usados para la colección de semen es:

Vagina artificial.- Esta técnica fue desarrollada con la utilización de un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de cópula; la cual consiste en un tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 de largo con una funda interna de látex, un cono de látex al que envolvía un alambre en espiral simulando la cervix de la alpaca y al final un frasco de colección de semen de ovino o un tubo de centrifuga, el agua a 45° se coloca por una

válvula-espita; los machos aceptaron el maniquí después de un período de entrenamiento (Bravo et al., 1997).

Métodos para reducir la filancia

Método enzimático: Enzimas naturales:

Papaína

Es una proteína de 212 aminoácidos, que se encuentran enrollados en 2 partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre. Es una enzima de baja especificidad que hidroliza tanto las proteínas como los péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres. Preferentemente actúa sobre los aminoácidos básicos, Leu, Gly, Arg, Lis y Phe. La papaína que se extrae de la papaya es una enzima proteolítica, es decir, con capacidad para digerir las proteínas de los alimentos. Similar a la pepsina, una enzima que está en nuestro jugo gástrico. Esta enzima se consigue por la extracción del látex, que es un líquido blanco obtenido mediante cortes en los frutos inmaduros a la superficie de la papaya. Luego, en laboratorio, se separa la enzima y se purifica hasta alcanzar un nivel óptimo de calidad para la comercialización y uso.

Bromelina

La bromelina es un nombre general para una familia de enzimas proteolíticas sulfhidrilo obtenidas de *Ananas comosus*, la planta de la piña.

El componente primario de la bromelina es una fracción proteolítica de sulfhidrilo. Bromelina también contiene una peroxidasa, fosfatasa ácida, varios inhibidores de la proteasa y calcio unido orgánicamente. Cuando la fracción proteolítica de la bromelina se purifica y se extrae, el resultado es una potente enzima proteolítica in vitro; Sin embargo, este componente ha demostrado ser fisiológicamente inactivo in vivo para muchas de las condiciones en que la bromelina tiene un efecto beneficioso, que gran parte de la actividad fisiológica de la bromelina no se tiene en cuenta en su proteolítica fracción y es probable que los efectos beneficiosos de la bromelina se deban a múltiples factores, no a un solo factor que puede ser aislado.

Hasta la fecha, se han detectado ocho componentes básicos proteolíticamente activos en el tallo.

Los dos componentes principales han sido etiquetados F4 y F5. La proteinasa considerada como la mayor parte de la fracción activa ha sido designada como F9, que comprende aproximadamente el 2 % del total de proteínas.

Se ha demostrado que todo el extracto de bromelína exhibe su actividad sobre un rango de pH de 4,5 a 9,8 (Gregory, 1996).

Enzimas comerciales:

Hialuronidasa

La hialuronidasa es una familia de enzimas, cuya función es, como su propio nombre indica, degradar el ácido hialurónico (AH). Se encuentra en el acrosoma, y su función principal es degradar la corona radiada durante el proceso de fecundación. Además, se encuentra en algunas bacterias patógenas, siendo un factor de virulencia, ya que esta enzima hidroliza también el ácido hialurónico de la matriz extracelular. También está presente en el veneno de la mayoría de las serpientes (Freiberg, 1984).

Tripsina

La tripsina es una enzima peptidasa, que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas mediante hidrólisis para formar péptidos de menor tamaño y aminoácidos. La tripsina es producida en el páncreas y secretada en el duodeno (parte del intestino), donde es esencial para la digestión. El pH óptimo es 8 y la temperatura óptima es 37 °C. Es una enzima específica ya que liga al péptido en las posiciones del carboxilo de residuos Arginina (Arg)

o Lisina (Lys) en la cadena, ambos aminoácidos con grupos R cargados positivamente, fragmentando al péptido inicial.

La tripsina es producida por el páncreas en forma de tripsinógeno (enzima inactiva), y luego es activado en el duodeno por la enteropeptidasa a tripsina (enzima activa) mediante corte proteolítico (Kühne, 1877).

2.3 Marco Conceptual

- **Alpaca:** Especie animal perteneciente al género de camélidos sudamericanos (Cunningham Dictionary, 2000).
- **Bromelina:** La bromelina es un nombre general para una familia de enzimas proteolíticas sulfhidrilo obtenidas de *Ananas comosus*, la planta de la piña. El componente primario de la bromelina es una fracción proteolítica de sulfhidrilo. También contiene una peroxidasa, fosfatasa ácida, varios inhibidores de la proteasa y calcio unido orgánicamente. (Gregory, 1996).
- **Criopreservación:** Es una técnica que tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas (Cunningham Dictionary, 2000).

- **Dilutor:** Solución que tiene como objetivo aumentar el volumen del eyaculado y proteger a los espermatozoides de daños térmicos y oxidativos (Cunningham Dictionary, 2000).
- **Filancia:** Capacidad de formación de hilo semen (Giuliano,2012).
- **Papaína:** Enzima de baja especificidad que hidroliza tanto las proteínas como los péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres (Taboas, S., 2002).
- **Reología:** Es la parte de la física que estudia la relación entre el esfuerzo y la deformación en los materiales que son capaces de fluir (Cunningham Dictionary, 2000).
- **Semen:** Secreción que se vierte durante la eyaculación, el cual está compuesto mayormente por espermatozoides y por sustancias procedentes de las glándulas accesorias (Cunningham Dictionary, 2000).
- **Viscosidad:** Resistencia que tienen las moléculas que conforman un líquido para separarse unas de otras, oposición de un fluido a deformarse, debida a las fuerzas de adherencia que tienen unas moléculas de un líquido o fluido con respecto a las otras moléculas del mismo líquido (Hatschek, 1928).

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Material

3.1.1 Ubicación Geográfica y Temporal

El presente estudio se llevó a cabo en el Proyecto de Investigación: “Uso de biotecnología para el mejoramiento genético y desarrollo de capacidades en el manejo de alpacas (*Vicugna pacos*) en la zona alto andina de Tacna”, en la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, ubicado en la sede los Pichones Sur, comprendida entre las coordenadas UTM 19S 368776,3 Este y 8010052,1 Norte, con una altitud 550 msnm., localizado en la provincia de Tacna; con una temperatura que fluctúa entre 22 a 30° en época de verano y 10 a 24° de temperatura en época de invierno.

3.1.2 Población y Muestra

Se trabajó con una población de 17 alpacas machos procedentes de las zonas alto andinas, adaptadas en la costa, de una edad de 3-5 años, de los cuales se seleccionará 4 machos que presente características de filancia espermática (mayor a 1 cm) en la muestra del eyaculado; de ese grupo se procedió a coleccionar semen 2 veces por semana, que posteriormente fueron

sometidos a tratamientos con bromelina y papaína (enzimas naturales) y la tripsina y hialuronidasa (enzimas artificiales).

Tabla 1. Número de muestras de semen para evaluación.

	Tratamiento: Tipo de enzimas			
	T1	T2	T3	T4
	(bromelina)	(papaína)	(tripsina)	(hialuronidasa)
Número de animales	4	4	4	4
Número de repeticiones/ tratamiento	10	10	10	10
Total de repeticiones	40	40	40	40

3.1.3 Materiales

Equipo de laboratorio.

- Microscopio óptico.
- Refrigeradora.
- Baño maría.
- Estufa.

Material de laboratorio

- Vasos de precipitación de 50 mL.
- Tubos falcón de 15 mL
- Termómetros
- Hervidora.
- Láminas portaobjetos.
- Láminas cubreobjetos.
- Micro pipetas.
- Tips (puntas descartables).
- Aceite de inmersión.
- Fundas de látex.
- Cintas de látex.
- Vaginas artificiales.
- Lubricante.
- Fundas de tela.

Reactivos

- Eosina (5 %).
- Nigrosina (10 %).
- Agua biodestillada.

- Alcohol 70 %.

Enzimas

- Papaína.
- Bromelina.
- Hialuronidasa.
- Tripsina.

3.2 Método

3.2.1 Tipo y Diseño de Investigación

El proyecto de investigación es experimental transversal, en la cual se manejan variables de la unidad de estudio y las muestras de estudio fueron tomadas en distintos momentos durante el desarrollo del estudio.

3.2.2 Diseño Procedimental

Colecta y evaluación del semen fresco

El método de colecta de semen que utilizamos fue el de vagina artificial, se realizaron 10 colectas de semen por macho durante el desarrollo del proyecto, cada muestra de semen se evaluó en fresco (filancia, motilidad y viabilidad).

Evaluación de la filancia del semen

Una vez colectada el semen se coloca en baño maría, en donde se observó y se evaluó la filancia espermática:

Se determinó con la ayuda de una pipeta para poder realizar la expansión del semen y evaluar con un centímetro.

Evaluación de la motilidad del semen

Motilidad espermática: Total

La evaluación de la motilidad total se realizó siguiendo los siguientes pasos:

Se colocó un volumen de 10 µl de semen sobre un portaobjetos nuevo y precalentado, que luego se cubrió con una laminilla cubreobjetos.

La muestra se observó con microscopía óptica a 40X, se determinó el porcentaje de células espermáticas en movimiento, en diversos campos microscópicos.

Los resultados se expresaron en porcentaje, según la siguiente fórmula:

$$\text{Motilidad Total.} = \frac{\text{Número de espermatozoides móviles.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

Tabla 2. Valoración de la motilidad total para semen.

% Células móviles	Valor descriptivo
80-100 %	Muy buena cantidad de células móviles
60-79 %	Buena cantidad de células móviles
40-59 %	Regular cantidad de células móviles
Menos de 40 %	Mala cantidad de células móviles

Fuente: OMS. 2010 citado por Gimeno Mique, Isabel M., (2014)

Evaluación de la viabilidad espermática.

Tinción eosina nigrosina

Se mantuvo en una lámina portaobjeto una gota de eosina nigrosina.

Se extrajo con una pipeta 10 ul de semen y se le agregó a la lámina portaobjetos.

Luego se realizó un frotis con otro portaobjeto y se procedió a secar.

Una vez seco la muestra de tinción se procedió a realizar la prueba de viabilidad.

Se evaluó la lámina en un microscopio compuesto de contraste de fase a 100 x con aceite de inmersión.

Se determinó el número de espermatozoides vivos y muertos, Se consideró espermatozoides vivos a aquellos que no presentan coloración y espermatozoides muertos a los que son teñidos con el colorante.

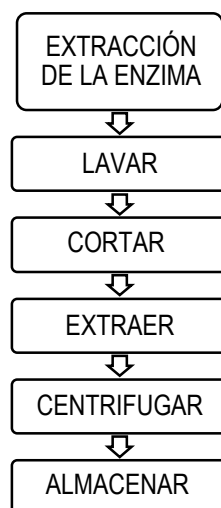
Se realizó un conteo de 200 espermatozoides, en donde se identificaron vivos, muertos, normales y anormales. Para viabilidad:

$$\% \text{ vivos} = \frac{\text{Número de espermatozoides sin coloración.}}{\text{Número Total de espermatozoides observados.}} \times 100$$

Posteriormente a la obtención de muestras fueron alicuotados en 4 fracciones, con los respectivos tratamientos. Transcurrido el tiempo para cada tratamiento enzimático, se llevaron a evaluación las muestras de semen en donde se observó la filancia, motilidad y viabilidad.

Preparación de enzimas

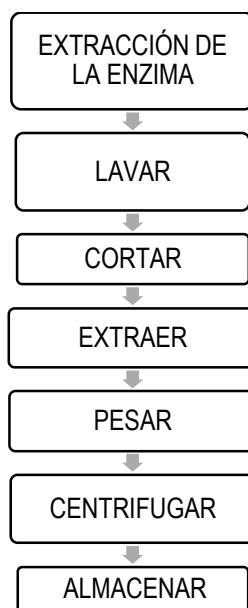
Figura 1. Flujoograma para la extracción de la enzima bromelina.



Fuente: Villavicencio M., (2011)

- **Lavar:** Se lavó la fruta (piña) a utilizarse de una manera exhaustiva, hasta que quede libre de cualquier impureza física.
- **Cortar:** Se realizó el corte longitudinal de cuatro a seis incisiones longitudinales con un cuchillo de acero inoxidable.
- **Extraer:** Se extrajo el látex del corte anterior y se lo recogió en un vaso precipitado.
- **Centrifugar:** Se centrifugó a 4 500 revoluciones durante 10 minutos.
- **Almacenar:** Se almacenó el recipiente en el congelador a -20 °C, para una mejor conservación de la enzima.

Figura 2. Flujograma para la extracción de la enzima papaína.



- **Lavar:** Se lavó la fruta (papaya) a utilizarse de una manera exhaustiva, hasta que quede libre de cualquier impureza física.
- **Cortar:** Se realizó el corte longitudinal de cuatro a seis incisiones longitudinales con un cuchillo de acero inoxidable.
- **Extraer:** Se extrajo el látex del corte anterior y se lo recogió en un vaso precipitado.
- **Pesar:** El látex colocado en el vaso precipitado fue pesado en una balanza analítica.
- **Centrifugar:** Se centrifugó a 4 500 revoluciones durante 10 minutos.
- **Almacenar:** Se almacenó el recipiente en el congelador a -20 °C, para una mejor conservación de la enzima.

Preparación de la enzima tripsina

- Se pesó 1 mg de tripsina en polvo de la marca (SIGMA-ALDRICH, USA), y se diluyó en 1 ml de agua biodestillada.
- Posteriormente esa dilución se llevó al vortex para su homogenización.

Preparación de la enzima hialuronidasa

- Se pesó 1 mg de hialuronidasa en polvo de la marca SIGMA, y se diluyó en 1 ml de agua biodestillada
- Posteriormente esa dilución se llevará al vortex para su homogenización.

Dilución del semen con tratamientos enzimáticos

Una vez evaluado las características macroscópicas y microscópicas del semen en fresco, se realizó el siguiente procedimiento:

- Cada muestra seminal se dividió en 4 partes iguales y se diluyó con los 4 tratamientos enzimáticos, en diferentes cantidades.
- ✓ Bromelina: 1:0,25 (Delgado y Quispe, 2018).
- ✓ Papaína: 1:1 (Delgado y Quispe, 2018).
- ✓ Tripsina: 1:0,25 (Bravo et al., 2000).
- ✓ Hialuronidasa: 1:0,25 (Bravo et al., 2000).
- Una vez que se diluyó el semen con los tratamientos enzimáticos, se mantuvo en baño maría a 37 °C en diferentes tiempos:

- ✓ Bromelina: 1 minuto (Delgado y Quispe, 2018).
- ✓ Papaína: 15 minutos (Cucho et al., 2018).
- ✓ Tripsina: 5 minutos (Bravo et al., 2000).
- ✓ Hialuronidasa: 5 minutos (Bravo et al., 2000).

Evaluación del semen post tratamiento enzimático para el objetivo 1 (filancia), objetivo 2 (motilidad), objetivo 3 (viabilidad).

Para el objetivo N° 1: Se evaluó la filancia en la dilución de semen fresco utilizando 2 enzimas naturales (bromelina y papaína) y 2 enzimas artificiales (tripsina y hialuronidasa) de la raza Huacaya en la zona Costa de Tacna.

Para la evaluación de la filancia en semen con tratamientos enzimáticos se realizó el mismo procedimiento mencionado en el protocolo de evaluación de la filancia en semen fresco.

Para el objetivo N° 2: Evaluar la motilidad en la dilución de semen fresco utilizando 2 enzimas naturales (bromelina y papaína) y 2 enzimas artificiales (tripsina y hialuronidasa) de la raza Huacaya en la zona Costa de Tacna.

Para la evaluación de la motilidad en semen con tratamiento enzimáticos se realizó el mismo procedimiento mencionado en el protocolo de evaluación de la motilidad en semen fresco, considerando la misma fórmula.

Para el objetivo N° 3: Evaluar la viabilidad en la dilución de semen fresco utilizando 2 enzimas naturales (bromelina y papaína) y 2 enzimas artificiales (tripsina y hialuronidasa) en alpaca (*Vicugna pacos*) de la raza Huacaya en la zona Costa de Tacna.

Para la evaluación de la viabilidad en semen con tratamientos enzimáticos se realizó el mismo procedimiento mencionado en el protocolo de evaluación de la viabilidad en semen fresco, considerando la misma fórmula.

3.2.3 Análisis de Datos

Para evaluar el efecto del uso de enzimas naturales y artificiales en la dilución de semen fresco de alpacas de la raza Huacaya; se determinó y comparó los parámetros seminales (Filancia, Motilidad y Viabilidad) antes y después de la dilución, estos resultados fueron expresados en porcentajes y visualizados en histogramas; fueron evaluados mediante el Análisis de Variancia (ANVA) bajo un diseño completamente aleatorio, con

un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Este diseño se trabajó con el software estadístico Infostat Versión estudiantil.

Las medias de los tratamientos fueron comparadas con el uso de la Prueba de Friedman.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + u_{ij}$$

μ : media general (muestra de semen)

τ_i : efecto del i-esimo tratamiento (enzimas)

u_{ij} : error experimental

i: parámetros espermáticos

j: tratamientos enzimáticos

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Resultados

Tabla 3. Filancia de semen de alpaca (cm) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos

N° de animal	Semen fresco (antes) filancia (cm)	Evaluación por tratamientos (cm) (después)			
		T1: bromelina	T2: papaína	T3: Tripsina	T4: hialuronidasa
1	2,35	0,00	0,37	0,40	0,78
2	2,05	0,05	0,43	0,42	0,61
3	1,68	0,07	0,02	0,10	0,34
4	1,70	0,02	0,15	0,50	0,75
Promedio	1,94	0,04	0,24	0,37	0,64
D.S.	0,32	0,03	0,19	0,18	0,20

D.S.=desviación estándar.

En la tabla 3, se observa los resultados de filancia espermática antes y después de la dilución con los tratamientos enzimáticos: bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa. Se realizó 10 repeticiones por cada macho que se colectó semen, resultando un total de 40 datos por animal; en los cuales se observó que la filancia de semen fresco fue de $1,94 \pm 0,32$ cm y la filancia en la evaluación post-tratamiento con la enzima

bromelina es de $0,04 \pm 0,03$ cm, con la enzima papaína fue de $0,24 \pm 0,19$ cm, con la enzima tripsina fue de $0,37 \pm 0,18$ cm y con la enzima hialuronidasa fue de $0,64 \pm 0,20$ cm, los cuales muestran diferencias significativas entre el semen fresco y después del proceso de dilución con los tratamientos enzimáticos ($p \leq 0,05$). Al comparar las medias de los tratamientos, el T1 muestra diferencias significativas en comparación con los T2, T3 y T4 ($p \leq 0,05$); mientras que, entre los tres tratamientos, el T2 es superior y similar a su vez con el T3, mientras que el T4 es inferior a todos los tratamientos. Estos resultados demuestran que los cuatro tratamientos enzimáticos hicieron efecto, ya que diluyeron la filancia espermática, esto podría deberse que a diferencia de otros reportes la filancia inicial no era tan significativa.

Figura 3. Filancia de semen de alpaca (cm) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos

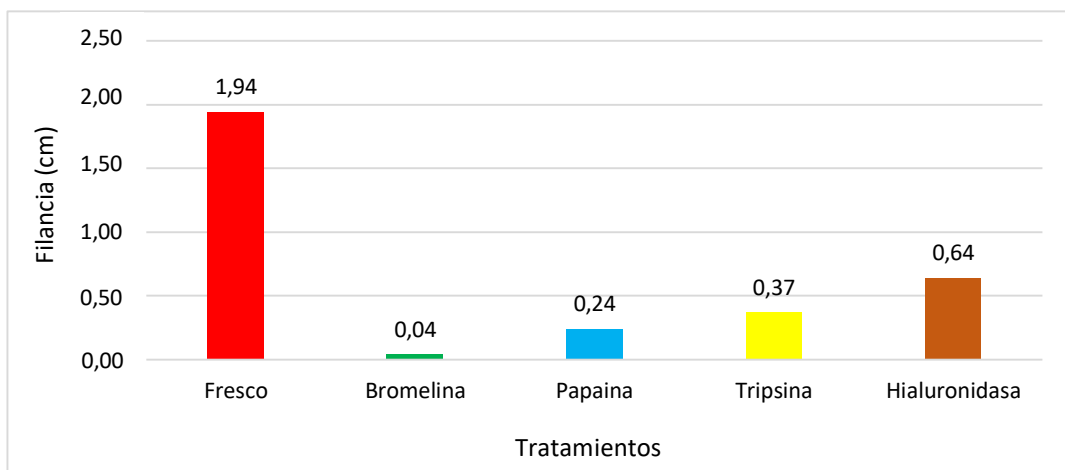


Tabla 4. Motilidad de espermatozoides (%) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos.

N° de animal	Semen fresco (antes) motilid. (%)	Evaluación por tratamientos (%) (después)			
		T1: bromelina	T2: papaína	T3: Tripsina	T4: Hialuronidasa
1	38,00	39,00	28,00	16,50	22,50
2	31,00	32,00	20,40	32,40	29,00
3	35,00	29,00	27,00	13,50	15,50
4	48,00	41,00	41,5	36,00	33,50
Promedio	38,00	35,25	29,23	24,60	25,38
D.S.	7,26	5,68	8,85	11,25	7,85

D.S. =desviación estándar.

En la tabla 4, se observa los resultados de la motilidad espermática antes y después de la dilución con los tratamientos enzimáticos: bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa. Del total de las 10 repeticiones por macho; se observa que la motilidad en semen fresco es de $38 \pm 7,26$ % y la respuesta a los tratamientos enzimáticos fue en el caso de la bromelina es de $35,25 \pm 5,68$ %, con la papaína fue de $29,23 \pm 8,85$ %, con la tripsina fue de $24,60 \pm 11,25$ % y con la hialuronidasa $25,38 \pm 7,85$ %, los cuales muestran diferencias significativas entre el semen fresco y después del

proceso de dilución con los tratamientos enzimáticos ($p \leq 0,05$). Al comparar las medias de los tratamientos, el T1 con enzima bromelina muestra diferencia significativa a comparación de los T2, T3 y T4 ($p \leq 0,05$), mientras que entre los tres tratamientos el T2 muestra mejores resultados que con el T4, pero con similitud al T3. Estos resultados muestran una disminución en la motilidad total, en comparación con la inicial, esto podría deberse a la existencia de un efecto adverso de dichas enzimas en cuanto al movimiento espermático normal.

Figura 4. Motilidad de espermatozoides (%) antes y después de la dilución con los tratamientos enzimáticos

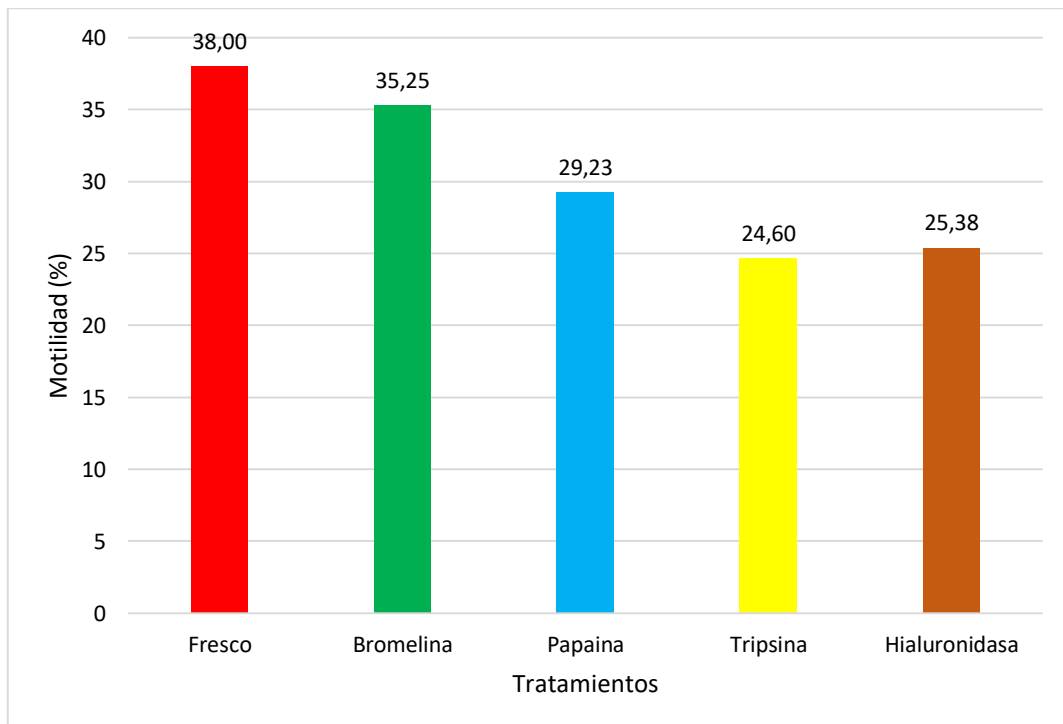


Tabla 5. Viabilidad de espermatozoides (%) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos.

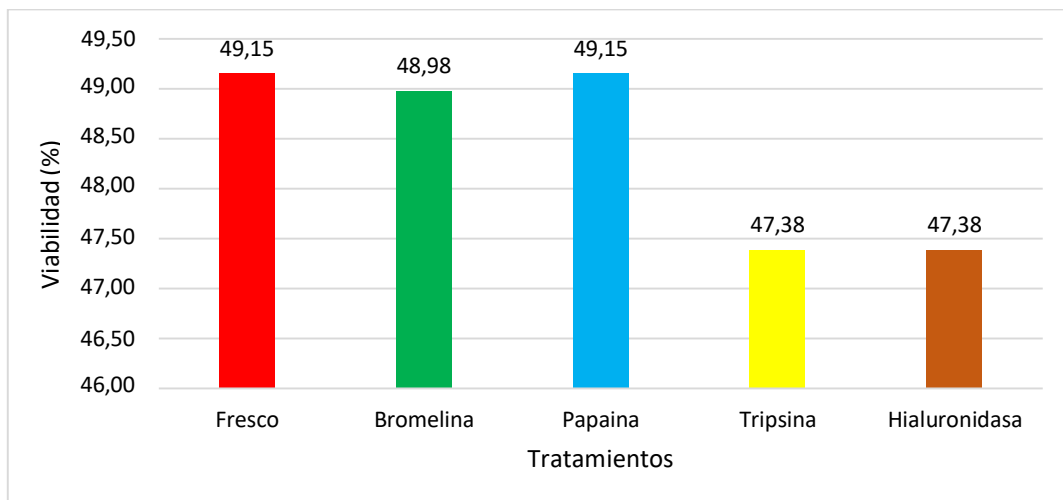
N° de animal	Semen fresco (antes) viabil. (%)	Evaluación por tratamientos (%) (después)			
		T1: Bromelina	T2: papaína	T3: Tripsina	T4: Hialuronidasa
1	48,00	50,00	53,50	51,80	50,20
2	45,60	48,70	44,20	42,90	42,30
3	50,60	45,80	46,30	43,90	46,10
4	52,40	51,40	52,60	50,90	50,90
Promedio	49,15	48,98	49,15	47,38	47,38
D.S.	2,97	2,39	4,60	4,62	3,99

D.S. =desviación estándar.

En la tabla 5, se observa los resultados de viabilidad espermática antes y después de la dilución con los tratamientos enzimáticos. Del total de las 10 repeticiones; observándose la viabilidad espermática a la tinción con eosina nigrosina, en lo que respecta al semen fresco es de $49,15 \pm 2,97$ % y la viabilidad espermática a la evaluación con el T1 fue de $48,98 \pm 2,39$ %, con el T2 fue de $49,15 \pm 4,60$ %, con el T3 fue de $47,38 \pm 4,62$ % y con el T4 fue de $47,38 \pm 3,99$ %. Con respecto a la muestra en fresco y las muestras con

los tratamientos enzimáticos, no mostraron diferencia significativa ($p>0,05$). De igual manera a la comparación entre los T1, T2, T3 y T4 no se encontró diferencias significativas ($p>0,05$).

Figura 5. Viabilidad de espermatozoides (%) antes y después de la dilución con tratamientos enzimáticos



4.2 Contrastación de hipótesis

Ho: El comportamiento de la filancia, motilidad y viabilidad espermática del semen en la dilución con enzimas naturales y artificiales son perjudiciales en comparación al semen fresco.

Ha: El comportamiento de la filancia, motilidad y viabilidad espermática del semen en la dilución con enzimas naturales y artificiales son mejores en comparación al semen fresco.

Nivel de Significancia: $\alpha = 0,05$

Prueba Estadística: Friedman.

Valor crítico:

Si $P < 0,05$ = se rechaza la H_0 , se acepta la H_a .

Si $P > 0,05$ = se acepta la H_0 , se rechaza la H_a .

Toma de decisión:

En la estadística hay significancia entre las medias de los cuatro tratamientos donde p valor para Filancia es de 0,0001 y p valor para Motilidad es de 0,0004, en donde p valor es $< 0,05$. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis H_0 y se acepta la H_a . En cuanto a viabilidad no se observó ningún efecto en los 4 tratamientos.

Conclusión:

Los tratamientos enzimáticos se comportan de manera diferente en comparación al semen fresco sobre los parámetros espermáticos, es decir que las sobrevivencias espermáticas al someterlos al proceso enzimático muestran resultados mejores en comparación al semen fresco, donde el T1 (bromelina) resulta ser más favorable que los demás.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1 Filancia

Los resultados del presente estudio en cuanto a la dilución de filancia espermática con la enzima hialuronidasa fue de 67 %, resultado parecido a los reportados por Kershaw-Young et al., (2013) en un trabajo realizado en Australia; quienes reportaron dilución de filancia de un 62 % con esta enzima, el cual trabajó con una filancia inicial de 15 mm; lo que indicaría que la enzima hialuronidasa influiría en la dilución de la filancia espermática, pero no en su totalidad. Aunque el mismo estudio reportó resultados superiores en dilución de filancia de un 100 % con la enzima papaína, a diferencia del presente estudio el cual diluyó un 88 %. Tal superioridad se debe probablemente al tiempo mayor en el que se realizó el proceso de incubación de la enzima papaína con el semen, lo cual fue en unos 30 minutos; que en el caso del presente estudio se realizó en un tiempo de 15 minutos en baño en seco (Kershaw-Young et al., 2012). Esta diferencia también podría atribuirse al clima estacional, donde Australia fluctúa entre 20-35 °C en verano y 3-20°C en invierno, a diferencia de Tacna que en verano su temperatura es entre 22-30 °C y en invierno entre 10-24 °C, donde ambos fluctúan entre los mismos rangos, pero con

mínimos y máximos de temperaturas parecidas. De estos, se encontró que la papaína es la más adecuada para la dilución de la filancia espermática del plasma seminal en las alpacas (Morton et al., 2009).

Resultados inferiores al presente estudio reporta Bravo et al., (2000) en Cusco; en el cual evalúa el efecto de enzimas en la filancia de semen en llamas y alpacas colectadas mediante vagina artificial, reportando una dilución de la filancia de 68 % con la enzima tripsina (81 % en este estudio) y 36% con la enzima hialuronidasa (67 % en este estudio) ambos en un tiempo de incubación de 5 minutos, tal superioridad podría atribuirse a que el autor tiene un amplio rango en el intervalo de filancia de 0,4 a 4,9 cm, esto explicaría que dicha enzima no actúa de manera satisfactoria en una filancia mayor, el cual estudios anteriores que se hicieron de estas mismas enzimas recomiendan prolongar el tiempo para un mejor efecto (Leyva et al., 1984). La diferencia también podría atribuirse al manejo de la temperatura del semen, ya que dicho trabajo lo realizaron en baño maría a diferencia del nuestro que fue en baño en seco el cual ofrece mejor mantenimiento de la temperatura, respetando las condiciones óptimas de higiene, temperatura y seguridad.

Los resultados del presente estudio muestran diferencias con respecto a los resultados publicados por Monaco et al., (2016) quien reporta una eliminación de la filancia de 31 % (88 % en este estudio) en la dilución de semen con la enzima papaína y 62 % (98 % en este estudio) en la dilución de semen con la enzima bromelina spermfluid ; ambos tratamientos de la investigación se realizaron en camellos dromedarios durante 120 minutos en intervalos de 20 minutos por tratamiento; tal diferencia podría atribuirse a que el autor utilizó un tiempo de incubación más amplio en el proceso de dilución del semen con el tratamiento enzimático, lo que sugiere que a un mayor tiempo de incubación enzimático podrían dar un mejor efecto para la reducción de la filancia en el semen de camellos dromedarios (Kershaw-Young et al., 2013). Otro factor en la diferencia entre nuestros resultados es el grado de filancia entre diferentes especies el cual varía entre machos (Tibary y Memon, 1999) y disminuye con el incremento de número de eyaculados en cualquier día (Bravo et al., 1997). Esta diferencia podría atribuirse también a la utilización de diferentes marcas en lo que respecta a la enzima bromelina, utilizando en esta investigación la enzima natural bromelina extraído de la piña. Respecto al presente estudio se utilizó la marca Spermfluid bromelina, esto hace indicar que la calidad de enzimas extraídas de la misma fruta favorece en la dilución de la filancia.

5.2 Motilidad

Los resultados del presente trabajo muestran diferencias con respecto al resultado publicados por Bravo et al., (2000) en Cusco; en el cual evalúa el efecto de enzimas en la filancia de semen en llamas y alpacas, reportando que las enzimas utilizadas tripsina y hialuronidasa no tuvieron efecto sobre la motilidad espermática; cuyos resultados muestran diferencias con el presente estudio, el cual si muestra una disminución en la motilidad total con la inicial, el cual fue en la tripsina de un 35 % y en la enzima hialuronidasa en 33 %, lo cual puede deberse al nivel de concentración de los mismos a la dilución, el cual influye mucho durante el proceso de adaptación del espermatozoide al tratamiento enzimático. Aunque el mismo estudio también muestra diferencias con respecto a los resultados de nuestra investigación, donde Bravo et al. (2000) reportó una disminución de motilidad en la dilución de semen con la enzima tripsina de 13 % (35 % en este estudio) y en la dilución con la enzima hialuronidasa de 12 % (33 % en este estudio); en ambos tratamientos enzimáticos de esta investigación se utilizó eyaculados colectados mediante vagina artificial; cuyos resultados muestran diferencias con el presente estudio, esto debido a la diferencias de especies utilizados en los experimentos. También esta diferencia podría deberse a la diferencia de climas, donde el clima de la Costa de Tacna tiene una temperatura de 22-30 °C, a diferencia de Cusco

que tiene una temperatura de 13-15 °C, el cual es el clima de hábitat preferible de las alpacas.

Los resultados del presente trabajo muestran diferencias con respecto a los resultados publicados por Cucho et al. (2018), en su estudio sobre el Efecto de dos tiempos de incubación en papaína en los parámetros cinéticos de los espermatozoides de llama (*Lama glama*), donde se utilizó 9 eyaculados de 3 llamas, colectadas por electro eyaculación, quien reporta una motilidad de 37,25 % en el tiempo de incubación de 15 minutos con la enzima papaína y de 68,98 % en 60 minutos, ambas con una motilidad inicial de 27,8 %. Los dos tratamientos son superiores a los resultados de nuestro estudio el cual fue de 23 % de una motilidad inicial de 38 %. Tal diferencia podría atribuirse a que el autor trabajó con el semen de llama el cual es más viscoso a comparación al semen de alpaca (Bravo et al., 2000), donde la filancia influye para que la motilidad individual sea de tipo oscilatoria (Sumar, 2002). Esto puede explicar el porqué del aumento de motilidad entre el semen fresco y el semen con tratamiento enzimático, obteniéndose mayores porcentajes de motilidad en semen con tratamiento enzimático por la ausencia de la filancia espermática.

Los resultados del presente trabajo muestran diferencias con respecto a los resultados publicados por Monaco et al., (2016) en su estudio en Italia

sobre el Efecto de los tratamientos α -Amilasa, Papaína y Spermfluid Bromelina sobre la viscosidad y los parámetros del semen de los eyaculados de camello dromedario; de quien reporta la disminución de motilidad con el tratamiento con TCF + Papaína a las 0 horas:3,3 %, 20 min:3,5 %, 40 min:2,7 %, 60 min:2,5 %, 90 min:1,9 %, 120 min:1,9 % (23 % en este estudio) y con el tratamiento con bromelina a las 0 horas: 3 %, 20 min:2,9 %, 40 min:3,3 %, 60 min:3,4 %, 90 min:3,1 %, 120 min: 2,7 % (8 % en este estudio); en ambos tratamientos de esta investigación hay disminución en la motilidad inicial, la diferencia entre nuestros resultados fue el tiempo de incubación empleado ya que fueron de 0 horas, 20,40,60,90 y 120 minutos, lo que indica que la dilución de semen con enzimas disminuye significativamente durante los tiempos de observación , a excepción de las muestras diluidas con la enzima bromelina. Evidentemente las diferencias con estos son debido al tipo de enzimas comerciales y/o naturales y al tiempo de incubación empleado (Casaretto et al., 2012).

5.3 Viabilidad espermática

Los resultados del presente estudio indican que hubo una mejor viabilidad espermática en la dilución con la enzima papaína con 49,15 % y la enzima bromelina con 48,98 %, en comparación con los tratamientos con enzima

tripsina y hialuronidasa con un 47,38 %; lo que explicaría que dicha enzima no causó un efecto negativo en la viabilidad espermática, el cual estudios anteriores que se hicieron indican que en la colección de esperma por vagina artificial, el porcentaje de espermatozoides muertos no debe ser mayor a 12 % y el porcentaje aceptable de espermatozoides vivos puede fluctuar de 88 % a 96 %, esto dependiendo de todos los factores que influyen sobre la supervivencia de los espermatozoides (Torres,1992).

Por otro lado, Bravo et al., (2000) reporta resultados inferiores a los nuestros en donde la disminución de la viabilidad a la dilución de semen con la enzima tripsina fue de 16,3 % (4 % en este estudio) y con la enzima hialuronidasa fue de 15,2 % (4 % en este estudio); esta diferencia podría atribuirse al método de evaluación utilizado por el autor, quien realizó una evaluación integral de viabilidad utilizando el porcentaje de espermatozoides vivos mediante tinción de muestras de semen con la Tinción de Hancocks (Society of Theriogenology, Hastings,NEBRASKA), a diferencia de nuestro estudio que se realizó un frotis con eosina negrosina. Lo que hace indicar que el método utilizado en este estudio y en los demás estudios reportados influiría en el daño causado en la membrana espermática. Últimas investigaciones en la evaluación de la viabilidad sugieren que la utilización de tinciones supravitales no son adecuadas para el semen de camélidos, puesto que muchas veces el gel del plasma seminal

no permite que el colorante tenga contacto con la membrana espermática, es por esto que se propone la utilización de tinciones fluorescentes como el fluorocromo diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e ioduro de propidio (PI) para evaluar la funcionalidad de la membrana espermática y así la viabilidad en espermatozoides (Carretero et al., 2009).

CONCLUSIONES

- Las enzimas naturales muestran mejores resultados sobre los parámetros espermáticos para la calidad de semen de la alpaca, especialmente la enzima bromelina, quien resulta ser mejor que los demás tratamientos enzimáticos.
- La filancia inicial de los espermatozoides después de la dilución, disminuye drásticamente en los cuatro tratamientos enzimáticos, donde la enzima bromelina muestra diferencia significativa en comparación con los otros tratamientos enzimáticos.
- La motilidad inicial de los espermatozoides después de la dilución con tratamientos enzimáticos muestra diferencias significativas entre semen fresco y después del proceso de dilución con tratamientos enzimáticos, donde la enzima bromelina muestra mejores resultados en comparación con los otros tratamientos enzimáticos.
- La viabilidad espermática inicial no es afectada después de la dilución con los cuatro tratamientos enzimáticos, esto permite concluir que no existe un daño estructural de la membrana espermática durante el proceso de dilución enzimática.

RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones experimentando nuevos tipos de enzimas de origen natural, como diluyente de la filancia espermática del semen de camélidos sudamericanos, facilitando la congelación en la zona costa de Tacna, como ensayo experimental para su posterior aplicación en la zona alto andina de la misma región.
- Realizar más pruebas con la utilización de tratamientos enzimáticos para obtener el tiempo óptimo que se necesita para la dilución de la filancia, para preservar la motilidad y viabilidad espermática en alpacas de la región de Tacna.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, V., García, W., Bravo, P.W. (2012). Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(1), 58-64.
- Aller, J.F., Rebuffi, G.E., Cancino, A.K., Alberio, R.H. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Archivos de Zootecnia*, 52, 15-23.
- Banda, R., Evangelista, S., Ruiz, L., Sandoval, R., Rodríguez, LC., Valdivia, CM., Santiani, A. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 21(2), 145-153.
- Barrios, B., Pérez, R., Gallegos, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., Cebrián Pérez, J. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod*, 63, 1531-1537.

- Bravo, P.W., Flores, U., Garnica, J., Ordoñez, C. (1997). *Collection of Semen and Insemination Artificial of Alpacas*. *Theriogenology*, 47(3), 619-626.
- Bravo, P.W., Pacheco, C., Quispe, G., Vilcapaza, L., Ordoñez, C. (1999). *Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome*. *Archives of Andrology*, 43(3), 239-246.
- Bravo, P., Ccallo, M., Garnica. (2000). The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. Centro Experimental La Raya, Universidad Nacional San Antonio Abad, Cusco, Perú. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno, Perú. *Small Ruminant Research*.
- Bravo, P.W., Alarcon, V.(2013). Preservación de semen y avances recientes en la inseminación artificial de llamas y alpacas. Carrera Profesional de Medicina Veterinaria, UNSAAC. Centro Experimental La Raya, Universidad Nacional San Antonio Abad, Cusco, Perú. *Spermova*, 3(2), 158 - 160.
- Bustinza, V. (2001). *La Alpaca: Crianza, Manejo y Mejoramiento*. 1 ed. Puno, Perú, Editorial Universitaria.

- Canorio, N., Paredes, F., Valdivia, M. (2015). Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna Pacos*). *Revista Investigación Veterinaria*, 26, 434–443.
- Carretero, I. S., Giuliano, C., Casarreto, Neild. (2009). Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. *Invet*, 11 (1), 55-63.
- Casaretto, C., Martínez Sarrasague, M., Giuliano, S., Rubin de Celis, E., Gambarotta, M., Carretero, I., Miragaya, M. (2012). Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer, *Revista de Andrología*, 44, 335-341.
- Choez, K., Evangelista, S., Castillo, R., Santiani, A. (2013). Efecto de la motilidad inicial y diferentes concentraciones de glicerol en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Spermova* 3(1), 83-84.
- Cucho, H., Ccalta, R., Meza, A., Mamani, R., Ccalta, A., Cabeza, U., Ampuero, E. (2018). Efecto de dos tiempos de incubación en papaína en los parámetros cinéticos de los espermatozoides de llama (*Lama glama*). Universidad Nacional San Antonio Abad, Cusco, Perú.

Cunningham Collins English Dictionary (2000). 5th Edition first published in HarperCollins Publishers 1979, 1986, 1991, 1994, 1998.

Delgado, P., Quispe, Y. (2018). Efecto de tres niveles de glicerol y tiempos de equilibrio sobre la viabilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*) post-descongelado. Universidad Pública de El Alto. Bolivia.

Evans, G., Maxwell, W. M. C. (1987). Inseminación artificial de ovejas y cabras.

Freiberg, M. (1984). *The World of venomous animals*. New Jersey. TFH publications.

Garnica J., Achata R., Bravo P.W. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction science*, 3, 85-90.

Gimeno, M., Isabel, M. (2014). Morfología espermática y parámetros seminales básicos en varones normo. Universidad Politecnica De Valencia.

Giuliano, S.M., Carretero, M.I., Gambarotta, M.C., Neild, D.M., Trasorras, V.L., Pinto, M., Miragaya., M.H. (2010). Improvement of llama

(Lama glama) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science*, 118(1), 98-102.

Giuliano, S.M. (2012). Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericanos. *Spermova*, 2(1), 6-9.

Grande – Allen, K. J., Calabro, A., Grupta, V., Wight, T. N., Hascall, V. C., Vesely, L. (2004). Glucosaminoglicanos y proteoglicanos en valvas y cuerdas normales de la válvula mitral: asociación con regiones de carga de tracción y compresión. *Glycobiology*, 14, 621 - 633

Gregory, S. K. (1996). Bromelain: A literature Review and Discussion of its therapeutic Applications, 1(4), 24-245

Hafez, E., Hafez, B. (2002). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7 ed. México. McGraw-Hill Interamericana.

Hanzen, C., Cucho, H., Ampuero, E., Ordoñez, C., Sumar, J . (2014). Principios de la reproducción de los camélidos sudamericanos. 1 ed. Cusco, Perú, Editorial Universitaria, FUNSAAC.

Hatscheck, E. (1928). The viscosity of liquids. London.

Kavanagh, E., Osborne, A. C., Ashhurst, D. E., Pitsillides, A. (2002). Los epitopes de sulfato de queratán exhiben una distribución conservada durante el desarrollo conjunto que permanece sin revalar sobre la base de la densidad de carga de glucosaminoglicanos. *Revista de histoquímica y citoquímica*, 50, 1039-1047.

Kershaw-Young, C.M., Maxwell, W.M. (2012). Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(4), 369-375.

Kershaw-Young, C.M., Stuart, C., Evans, G., Maxwell, W.M. (2013). The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 261–267.

Kershaw, C.M., Evans, G., Rodney, R., Maxwell, W.M. (2016). Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm function and improve post-thaw motility rates. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(6), 1107

Kühne, W. (1877). Experiences and remarks on enzymes and ferments. *Inst. Univ. Heidelberg Unters*, 1, 291-324.

Leyva, V., Sumar, J., Franco, E. (1984). Estudio preliminar de la concentración de espermatozoides de semen de alpaca obtenido con vagina artificial (Preliminary study of alpaca semen concentration obtained with artificial vagina). 3ra. *Reunion anual de la Asociación peruana de Producción Animal*, Lima.

MINAGRI. (2018). Boletín Sumaq alpaca, situación de la alpaca en el Perú. Ministerio de Agricultura y Riego. Lima.

Monaco, D., Fatnassi, M., Padalino, B., Hammadi, M., Khorchani, T., Lacalandra, G. (2016). Effect of α -Amylase, Papain, and Spermfluid treatments on viscosity and semen parameters of dromedary camel ejaculates. Departamento de Emergencias y Trasplantes de Órganos, Clínicas Veterinarias y Sección de Producción Animal, Universidad de Bari Aldo Moro, Bari, Italia.

Morton, K.M., Gibb, Z., Bertoldo, M., Maxwell, W.M. (2009). Effect of diluent, dilution rate and storage temperature on longevity and functional integrity of liquid stored alpaca (*Vicugna pacos*) semen. *Journal of Camelid Science*, 2, 15-25.

Morton, K., Thomson, P., Bailey K, Evans, G., Maxwell W.M.C.(2006). Quality parameters for alpaca (*Vicugna pacos*) semen are affected

by semen collection procedure. *Reprod. Dom. Anim*, 45(4), 637-643.

Naveros, M.L., Contreras, M. (2014). Evaluación de dos dilutores comerciales en la congelación de semen con fines de inseminación artificial en alpacas (*Vicugna pacos*). In Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. *Memorias*. Abancay, Perú, UNAMBA.

Novoa, C., Leyva, V. (1996). Reproducción en alpacas y llamas. *Publicación científica*. IVITA- UNMSM, 26, 32.

Olaguivel, C., Naveros, M.L. (2014). Efecto de la enzima colagenasa en la congelación de semen en alpacas (*Vicugna pacos*). *Spermova*, 4(1), 64.

Paricahua, E. (2001). Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. *Tesis Med. Vet.* Puno, Perú, UNA.

Ramalho-Santos, J., Schatten, G., Moreno, R.D. (2002). Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biology of reproduction*, 67(4), 1043-1051.

Sumar, J., Leyva, V. (1981). Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). In Convención Internacional

sobre Camélidos Sudamericanos. *Resúmenes*. Punta Arenas, Chile.

Sumar, J. (2002). Llamas y alpacas. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7 ed. México, Editorial McGraw-Hill Interamericana.

Taboas, S. (2002). Plantas con enzimas: Papaína y Bromelina. Perú.

Tibary, A. y Memon, M. (1999). *Reproduction in the male South American Camelidae*. *CamelPrac. Res.* 6, 235-248.

Tibary, A., Vaughan, J. (2006). Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Rumin*, 61, 283-298.

Torres, H. (1992). Un plan de acción para la conservación de Camélidos Sudamericanos. Grupo de especialistas en Camélidos Sudamericanos de la SSC/IUCN. Suiza.

Ugarelli, A., Evangelista, S., Santiani, A. (2017). Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 28(1), 130-140.

Vaughan, J.L., Galloway, D., Hopkins, D. (2003). Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*): report for the Rural Industries Research and Development Corporation. Barton ACT, Australia.

Villavicencio, M. C. (2011). Extracción, concentración y cuantificación de la actividad enzimática de la papaína a partir de la papaya (*Carica papaya*). Universidad Técnica de Ambato. Ecuador.

WHO (World Health Organization). (2010). Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5 ed. Geneva, Switzerland.

Zirena, N. (2014). Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación. Tesis Med. Vet. Lima, Perú, UNMSM.

ANEXOS

Anexo 1. Valores iniciales de volumen, filancia, motilidad y viabilidad por animal.

Animal	VOLUMEN	FILANCIA I (cm)	MOTILIDAD INICIAL (%)	VIABILIDAD I (%)
1	0,95 ± 0,59	2,35 ± 1,63	38 ± 13,17	48 ± 4,52
2	1,13 ± 0,62	2,05 ± 1,23	31 ± 8,76	45,6 ± 5,21
3	1,61 ± 0,77	1,68 ± 0,94	35 ± 12,69	50,6 ± 9,82
4	1,42 ± 0,68	1,7 ± 0,82	48 ± 10,33	52,4 ± 7,81

Anexo 2. Filancia, motilidad y viabilidad en relación a la enzima utilizada.

Enzima	FILANCIA I	MOTILIDAD INICIAL (%)	VIABILIDAD I (%)
Hialuronidasa	0,64 ± 0,20 ^d	25,38 ± 7,85 ^{ab}	47,38 ± 3,99
Papaína	0,24 ± 0,19 ^b	29,23 ± 8,85 ^{bc}	49,15 ± 4,60
Bromelina	0,04 ± 0,03 ^a	35,25 ± 5,68 ^d	48,98 ± 2,39
Tripsina	0,37 ± 0,18 ^{bc}	24,60 ± 11,25 ^a	47,38 ± 4,62
p-valor	<0,0001	0,0004	0,7166

Anexo 3. Prueba de Friedman para filancia.

Bromelina	Hialuronidasa	Tripsina	Papaína	T²	P
1,69	3,38	2,65	2,29	28,49	<0,0001

**Anexo 4. Estadística de grupo para filancia total después de la dilución del semen con tratamientos enzimáticos:
Bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa**

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	Media	N
Bromelina	67,5	1,69	0,04	40
Papaína	91,5	2,29	0,24	40
Tripsina	106	2,65	0,37	40
Hialuronidasa	135	3,38	0,64	40

Anexo 5. Prueba de Friedman para motilidad.

Bromelina	Papaína	Hialorunidasa	Tripsina	T²	P
3,11	2,6	2,25	2,04	6,59	0,0004

Anexo 6. Estadística de grupo para motilidad total después de la dilución del semen con tratamientos enzimáticos: Bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa.

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	Media	N
Tripsina	81,5	2,04	24,6	40
Hialorunidasa	90	2,25	25,375	40
Papaína	104	2,6	29,225	40
Bromelina	124,5	3,11	35,25	40

Anexo 7. Prueba de Friedman para viabilidad.

Bromelina	Papaína	Hialorunidasa	Tripsina	T²	P
2,45	2,68	2,53	2,35	0,45	0,7166

Anexo 8. Estadística de grupo para viabilidad total después de la dilución del semen con tratamientos enzimáticos: Bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa.

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	Media	N
Tripsina	94	2,35	47,38	40
Bromelina	98	2,45	48,98	40
Hialorunidasa	101	2,53	47,38	40
Papaína	107	2,68	49,15	40

Anexo 9. Registro de colecta diaria de alpacas, valores antes y después de la dilución del semen con tratamientos enzimáticos: Bromelina, papaína, tripsina y hialuronidasa.

ARET	FILANC (cm)	MOT. INIC. (%)	VIAB. INIC. (%)	MET. ENZIM.	DIL. C/ ENZIMA	TIEMP. DE INCUB. (min.)	FILANC (cm)	MOT. C/E (%)	VIAB. (%)
M-007	2	40	61	Piña	100 - 25	1	0,5	20	40
				Hialuronid.	100 - 15	5	1	40	30
				Tripsina	100 - 25	5	0,5	10	35
				Papaya	100 - 100	15	0	30	47
M-004	5	50	49	Piña	100 - 25	1	0	60	52
				Hialuronid.	100 - 15	5	3	15	54
				Tripsina	100 - 25	5	2	10	41
				Papaya	100 - 100	15	1	25	61
M-016	2	30	52	Piña	100 - 25	1	0	0	37
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,5	15	40
				Tripsina	100 - 25	5	0,5	10	67
				Papaya	100 - 100	15	0,3	20	69
M-006	2	40	52	Piña	100 - 25	1	0	15	51
				Hialuronid.	100 - 15	5	1	40	53
				Tripsina	100 - 25	5	1	40	51
				Papaya	100 - 100	15	0,5	20	62
M-016	3	50	58	Piña	100 - 25	1	0	50	64
				Hialuronid.	100 - 15	5	1	15	45
				Tripsina	100 - 25	5	1	25	40
				Papaya	100 - 100	15	0,2	15	56

Continua página siguiente.

Viene página anterior.

M-007	1	30	50	Piña	100 - 25	1	0	10	36
				Hialuronid.	100 - 15	5	0	0	23
				Tripsina	100 - 25	5	0,2	15	45
				Papaya	100 - 100	15	0	15	41
M-004	3	30	52	Piña	100 - 25	1	0	40	57
				Hialuronid.	100 - 15	5	1	0	61
				Tripsina	100 - 25	5	0	40	67
				papaya	100 - 100	15	0,5	0	58
M-007	1,5	40	56	Piña	100 - 25	1	0	40	40
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,5	10	49
				Tripsina	100 - 25	5	0,3	0	44
				Papaya	100 - 100	15	0	30	42
M-016	2	50	48	Piña	100 - 25	1	0,2	50	52
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,5	30	47
				Tripsina	100 - 25	5	1	50	50
				Papaya	100 - 100	15	0	60	51
M-007	1,5	50	60	Piña	100 - 25	1	0,2	10	62
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,2	5	66
				Tripsina	100 - 25	5	0	0	56
				Papaya	100 - 100	15	0	25	43
M-007	1	30	47	Piña	100 - 25	1	0	40	59
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,2	0	63
				Tripsina	100 - 25	5	0	30	72
				Papaya	100 - 100	15	0	30	56
M-004	2,5	20	42	Piña	100 - 25	1	0	15	56
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,3	0	49
				Tripsina	100 - 25	5	0	5	59

Continua página siguiente.

Viene página anterior.

				Papaya	100 - 100	15	0	30	60
M-016	1	50	64	Piña	100 - 25	1	0	60	62
				Hialuronidas a	100 - 15	5	0,5	15	69
				Tripsina	100 - 25	5	0,3	50	50
				Papaya	100 - 100	15	0	50	49
M-016	2	70	58	Piña	100 - 25	1	0	60	55
				Hialuronid.	100 - 15	5	2	50	56
				Tripsina	100 - 25	5	0,5	60	58
				Papaya	100 - 100	15	0,5	50	63
M-007	2	60	62	Piña	100 - 25	1	0	60	55
				Hialuronid.	100 - 15	5	1	50	56
				Tripsina	100 - 25	5	0	60	60
				Papaya	100 - 100	15	0	60	63
M-004	1	60	55	Piña	100 - 25	1	0	70	62
				Tripsina	100 - 25	5	0	10	56
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,5	30	68
				Papaya	100 - 100	15	0,2	50	67
M-016	1	50	42	Piña	100 - 25	1	0	30	41
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,2	40	53
				Tripsina	100 - 25	5	0	5	27
				Papaya	100 - 100	15	0	50	28
M-004	1	50	52	Piña	100 - 25	1	0	0	47
				Hialuronid.	100 - 15	5	0	40	49
				Tripsina	100 - 25	5	0	10	57
				Papaya	100 - 100	15	0	30	47
M-007	4	30	40	Piña	100 - 25	1	0	40	33
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,5	20	42

Continua página siguiente.

Viene página anterior.

				Tripsina	100 - 25	5	0	10	35
				Papaya	100 - 100	15	0	30	40
M-004	3	30	51	Piña	100 - 25	1	0	10	30
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,5	0	40
				Tripsina	100 - 25	5	0,5	0	50
				Papaya	100 - 100	15	0,2	40	47
M-016	3	50%	43%	Piña	100 - 25	1	0	20	25
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,3	50	42
				Tripsina	100 - 25	5	0,2	50	42
				Papaya	100 - 100	15	0	60	52
M-007	2	20	31	Piña	100 - 25	1	0	0	23
				Hialuronid.	100 - 15	5	1,5	20	44
				Tripsina	100 - 25	5	0	10	40
				Papaya	100 - 100	15	0,2	20	55
M-004	1	40	44	Piña	100 - 25	1	0	50	45
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,5	50	42
				Tripsina	100 - 25	5	0	40	42
				Papaya	100 - 100	15	0	40	53
M-004	1	20	47	Piña	100 - 25	1	0	30	47
				Hialuronid.	100 - 15	5	0	20	52
				Tripsina	100 - 25	5	0	5	49
				Papaya	100 - 100	15	0	20	51
M-004	5	40	42	Piña	100 - 25	1	0	60	48
				Hialuronid.	100 - 15	5	1,5	50	42
				Tripsina	100 - 25	5	1	30	39
				Papaya	100 - 100	15	1	30	48
M-016	1	40	51	Piña	100 - 25	1	0	40	51

Continua página siguiente.

Viene página anterior.

				Hialuronid.	100 - 15	5	1	40	58
				Tripsina	100 - 25	5	0	30	52
				Papaya	100 - 100	15	0	30	52
M-006	5	20	53	Piña	100 - 25	1	0	10	60
				Hialuronid.	100 - 15	5	1	0	37
				Tripsina	100 - 25	5	0,5	30	57
				Papaya	100 - 100	15	1	20	55
M-016	1	50	62	Piña	100 - 25	1	0	50	66
				Hialuronid.	100 - 15	5	1	50	58
				Tripsina	100 - 25	5	1	30	65
				Papaya	100 - 100	15	0,5	30	43
M-004	1	40	46	Piña	100 - 25	1	0	55	56
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,5	20	45
				Tripsina	100 - 25	5	0,5	15	58
				Papaya	100 - 100	15	0,8	15	43
M-006	2	30	50	Piña	100 - 25	1	0	45	50
				Hialuronid.	100 - 15	5	0	20	43
				Tripsina	100 - 25	5	0	40	36
				Papaya	100 - 100	15	0,5	30	39
M-006	1	20	40	Piña	100 - 25	1	0	30	40
				Hialuronid.	100 - 15	5	1,2	10	29
				Tripsina	100 - 25	5	0,5	25	39
				Papaya	100 - 100	15	0,5	20	35
M-006	1,5	40	49	Piña	100 - 25	1	0	60	57
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,8	50	61
				Tripsina	100 - 25	5	0,7	40	41
				Papaya	100 - 100	15	0,5	40	57

Continua página siguiente.

Viene página anterior.

M-006	1,5	30	42	Piña	100 - 25	1	0	40	46
				Hialuronid.	100 - 15	5	0	15	28
				Tripsina	100 - 25	5	0	10	34
				Papaya	100 - 100	15	0,2	15	40
M-006	3	40	47	Piña	100 - 25	1	0	0	36
				Hialuronid.	100 - 15	5	1	55	52
				Tripsina	100 - 25	5	0,5	50	54
				Papaya	100 - 100	15	0,1	10	38
M-006	1	40	43	Piña	100 - 25	1	0	50	45
				Hialuronid.	100 - 15	5	0	50	48
				Tripsina	100 - 25	5	0	40	38
				Papaya	100 - 100	15	0	5	34
M-006	2,5	30	41	Piña	100 - 25	1	0,5	40	55
				Hialuronid.	100 - 15	5	1	30	42
				Tripsina	100 - 25	5	1	35	48
				Papaya	100 - 100	15	0,5	20	33
M-006	1	20	39	Piña	100 - 25	1	0	30	47
				Hialuronid.	100 - 15	5	0	20	30
				Tripsina	100 - 25	5	0	14	31
				Papaya	100 - 100	15	0,5	24	49
M-007	0,8	20	49	Piña	100 - 25	1	0	30	50
				Hialuronid.	100 - 15	5	0	10	44
				Tripsina	100 - 25	5	0	0	26
				Papaya	100 - 100	15	0	10	36
M-016	1	40	46	Piña	100 - 25	1	0	50	61
				Hialuronid.	100 - 15	5	0,5	30	41
				tripsina	100 - 25	5	0,5	50	58

Continua página siguiente.

Viene página anterior.

				papaya	100 - 100	15	0	50	63
M-007	1	30	50	piña	100 - 25	1	0	40	60
				Hialuronid.	100 - 15	5	0	10	44
				tripsina	100 - 25	5	0	0	26
				papaya	100 - 100	15	0	20	40
