



Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**“LA IMPORTANCIA DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN LA
ALPACA”**

**Trabajo de investigación para optar por el Grado Académico de:
BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTENICA**

Presentado por:
MELISSA MARGARET VILCA SULCA

Lima – Perú

2019

UNIVERSIDAD
CIENTÍFICA
DEL SUR

ACTA DE SUSTENTACIÓN/APROBACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN DE BACHILLER

Lima, 07 de enero de 2020.

Los integrantes del Jurado evaluador del trabajo de investigación:

Presidente: Dra. BERTHA ISABEL TUPAC YUPANQUI SAGASTEGUI
Miembro: Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE
Miembro: M.V. MILENA PAOLA MONTENEGRO VEGA

*Docente: cuando el trabajo de investigación es evaluado dentro de un curso (no corresponde pago)

**Comité: Cuando hay un comité evaluador fuera de un curso, indicar miembros y presidente

Se reúnen para evaluar el trabajo de investigación de Bachiller:

"LA IMPORTANCIA DE LA CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA EN LA ALPACAS"

Presentada por el(la) estudiante:

- **MELISSA MARGARET VILCA SULCA**

Para optar al grado de Bachiller en: **MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Asesorada por: **Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS**


Luego de haber evaluado el informe final del trabajo de investigación de Bachiller, concluyen de manera unánime (X) por mayoría simple () calificar a:

Tesista: <i>Melissa Margaret Vilca Sulca</i>	Nota (en letras): <i>Diecinueve</i>		
Aprobado ()	Aprobado - Muy buena (X)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ()

Los miembros del jurado/comité firman en señal de conformidad.



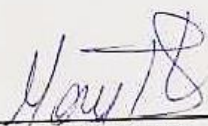
Dra. BERTHA ISABEL TUPAC YUPANQUI SAGASTEGUI
Presidente(a) del Jurado



Mg. SHIRLEY SUJEY EVANGELISTA VARGAS
Asesor(a)



Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE
Miembro 1



M.V. MILENA PAOLA MONTENEGRO VEGA
Miembro 2

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	3
2. Revisión Bibliográfica	5
2.1. Reproducción en alpaca macho.....	5
2.2. Biotecnologías reproductivas en alpaca	6
2.3. Espermatozoide de alpaca.....	7
2.3.1. Capacitación espermática.....	8
a) Bicarbonato (HCO ₃ ⁻).....	10
b) Aceptores de colesterol.....	11
c) Calcio (Ca ²⁺).....	11
2.3.2. Capacitación espermática <i>in vitro</i>	12
2.3.2.1. Medios de capacitación <i>in vitro</i>	12
3. Conclusión.....	14
4. Referencias Bibliográficas.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Asas de túbulos seminíferos, red testicular y el conducto epididimario del morueco.....	8
Figura 2. Señales de capacitación: propuesta de secuencia de capacitación <i>in vitro</i> en espermatozoides de mamífero.....	9

1. Introducción

La crianza de alpacas es una actividad económica de gran importancia para las poblaciones alto andinas del Perú por la producción de fibra de gran finura y carne de alto valor nutricional (MINAGRI, 2019). La necesidad de optimizar la producción de animales con genética superior, promueve el empleo de diversas biotecnologías reproductivas. Según Díaz H., Espinoza J., Huanca W., Lopez-Torres B. y Rodríguez J. (2015), su desarrollo y aplicación se ve limitada por las propias características de la especie, requiriendo mayor conocimiento de la biología reproductiva de la especie, siendo de gran interés la fisiología reproductiva del macho.

Los espermatozoides atraviesan cambios estructurales y bioquímicos durante su recorrido por el tracto reproductivo de la hembra, donde se encuentran agentes capacitantes que activan la maquinaria molecular para que sea capaz de fecundar un ovocito de manera efectiva. Este proceso, denominado capacitación espermática, incluye la hiperactivación de la motilidad espermática y la preparación de los espermatozoides para la reacción acrosómica (Muro Y., Hasuwa H., Isotani A., Miyata H., Yamagata K., Ikawa M., *et al.*, 2016).

Para el empleo de gametos del macho en diversas tecnologías *in vitro*, es necesario la obtención de espermatozoides capacitados, por lo que se busca replicar las condiciones pro capacitantes que se encuentran de manera natural. Si bien esto fue realizado con éxito en espermatozoides de diversas especies domésticas usando medios de capacitación especialmente formulados para cada una de ellas; en la alpaca, no se cuenta con estudios suficientes sobre este proceso y los factores que conllevan a dicho estado funcional. En esta especie se ha probado el uso de medios capacitantes como Ham F10 y albumina sérica bovina (Manosalva I., 2003; Uriondo H., Alvarez C., Rodríguez C., Uipan P. y Valdivia M.,

2008), criocapitación (Canorio N., 2008), etc., pero no se ha logrado una gran capacidad de unión a la zona pelúcida.

Por lo mencionado anteriormente, el objetivo de este trabajo es realizar una revisión sobre el proceso de capacitación espermática y los factores que regulan este proceso *in vivo*, para comprender el desarrollo de los medios de capacitación espermática que se podrían aplicar en la alpaca.

2. Revisión literaria

2.1. Reproducción en alpacas macho

El conocimiento de la biología reproductiva de la alpaca macho, así como el comportamiento sexual, anatomía y características seminales, son necesarios para un adecuado manejo reproductivo de la especie.

Al año de edad, los machos manifiestan interés sexual y aptitud de monta hacia las hembras; sin embargo, todos presentan el pene adherido por completo al prepucio, por lo que se impide una cópula efectiva. Esta adherencia desaparece gradualmente durante su crecimiento, bajo la influencia de la testosterona. A los dos años de edad, cerca del 70 % de los machos presenta el pene liberado del prepucio y el 100% a los tres años (Hafez E. S. E. y Hafez B., 2007). Por otro lado, la madurez del sistema reproductivo inicia a los 12 meses de edad, apareciendo los primeros espermatozoides en la cabeza del epidídimo a los 18 meses. Entre los 20 y 24 meses, la espermatogénesis es más evidente. Todos los machos con más de tres años presentan esperma en el epidídimo de cada testículo (Montalvo C., Cevallos E. y Copaira M., 1979). Así mismo, estudios previos mencionan que el tamaño testicular podría ser usado como un indicador de producción espermática y, por lo tanto, de la fertilidad. Los testículos son elípticos y pequeños, en promedio miden entre 4 a 5 cm de longitud (Sumar J., 1983). Abraham M. C., Puhakka J., Ruete A., Al-Essawe E. M., De Verdier K., Morrell J. M. y Båge R. (2016) sugieren que los individuos cuya longitud testicular sea mayor a 3.8 cm estarían produciendo esperma. Por lo mencionado, uno de los principales obstáculos de la especie bajo los manejos tradicionales es que los machos se destinan a la reproducción a partir de los tres años.

En cuanto a las características seminales de alpaca son muy variables entre individuos diferentes y respecto al número de eyaculados consecutivos de un mismo

macho (Morton K. M. y Maxwell W. C., 2006), los cuales son influenciados por factores medioambientales y de la misma especie (Huanca T., Mamani R., Naveros M. L. y Gonzales M., 2012). El eyaculado está constituido por plasma seminal (85%) y espermatozoides (15%). La coloración varía de blanco lechoso a blanco cristalino, dependiendo de la concentración espermática. El volumen es escaso (1.62 ± 1.82 ml) (Huanca *et al.*, 2012) y con una alta viscosidad (Bravo P. W., Flores U., Garnica J. y Ordonez C., 1997). Esta característica dificulta su manejo en el laboratorio (pipeteo, dilución), así como determinar parámetros de concentración y motilidad espermática, la cual es de tipo oscilatoria y muy lenta (Sumar J, 1997). La concentración espermática es baja, a diferencia de otras especies domésticas, con valores de entre 30 a 150×10^6 espermatozoides/ml (Bravo PW., 1995).

2.2. Biotecnologías reproductivas en alpacas

El desarrollo de biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial, transferencia de embriones y protocolos para la fecundación *in vitro* contribuyen a obtener una mayor cantidad de animales genéticamente superiores (Huanca *et al.*, 2012). En las alpacas, contribuirá a mejorar los índices de fertilidad (Apaza N., Olarte U. y Málaga J., 1998), natalidad anual (Fernández S, 1993) y de preñez (Apaza N., Sapana R., Huanca T. y Huanca W., 2001) que no superan el 65%, 50% y 60%, respectivamente. Sin embargo, se ve limitado por el desconocimiento de la fisiología reproductiva de la especie (Huanca W *et al.*, 2007).

La tecnología que más desarrollo ha tenido en los últimos años, principalmente en el ganado bovino, ha sido la fecundación *in vitro* (FIV) (Miragaya M. H., Chaves M. G., y Agüero A., 2006). Este es un proceso por el cual se cultivan espermatozoides previamente capacitados y ovocitos maduros para la obtención de un embrión.

Para el desarrollo de los protocolos de FIV en alpaca se debe tener en consideración el estudio de los procesos de recuperación y maduración de los ovocitos y espermatozoides. En el caso de los ovocitos, se ha tenido reportes de su recuperación vía laparotomía, obteniéndose una tasa de recuperación del 83% (105/127) en animales tratados con Hormona folículo estimulante (FSH) y 82% (163/198), en animales tratados con gonadotropina coriónica equina (Ecg) (Gómez C, Ratto MH, Berland M, Wolter M y Adams GP., 2002); mientras que Ratto M., Gomez C., Berland, M. y Adams G. P. (2007) obtuvieron 89% y 87% en animales tratados con FSH y eCG, respectivamente. Por otro lado, Ruiz J. A., Correa J. E., Ayuque G., Landeo L., Yaranga M., y Zacarías A (2007) maduraron ovocitos de alpaca durante 27 horas en el medio TCM-199 suplementado y obtuvieron un 75% de tasa de maduración. En cuanto a las células espermáticas, estas deben alcanzar su capacidad fecundante a través de un proceso de preparación *in vitro*.

2.3. Espermatozoide de alpaca

La espermatogénesis es un proceso de división y diferenciación celular por el cual las espermatogonias, diploides, dan lugar a espermatozoides haploides. Estos son células altamente diferenciadas que se dividen en cabeza y flagelo. La cabeza consiste en el núcleo, algunas estructuras del citoesqueleto y el citoplasma. El cuello une la cabeza a la cola o flagelo. Esta es la parte encargada del movimiento y se subdivide en segmento medio, principal y terminal (Eddy y O'Brien, 1994). El espermatozoide está cubierto por la membrana plasmática. Entre esta estructura y la porción anterior de la cabeza se encuentra el acrosoma.

Los gametos son liberados en el lumen del túbulo seminífero para luego ser transportados por la red testicular y el conducto epididimario (Hafez, 2007) (Figura 1).

En la cabeza y cuerpo del epidídimo, los gametos sufren pequeños cambios metabólicos y estructurales con gran repercusión funcional, adquiriendo motilidad progresiva, pérdida de la gota citoplasmática desarrollo de la capacidad fecundante, y son almacenados en la cola del epidídimo (Hafez, 2007).

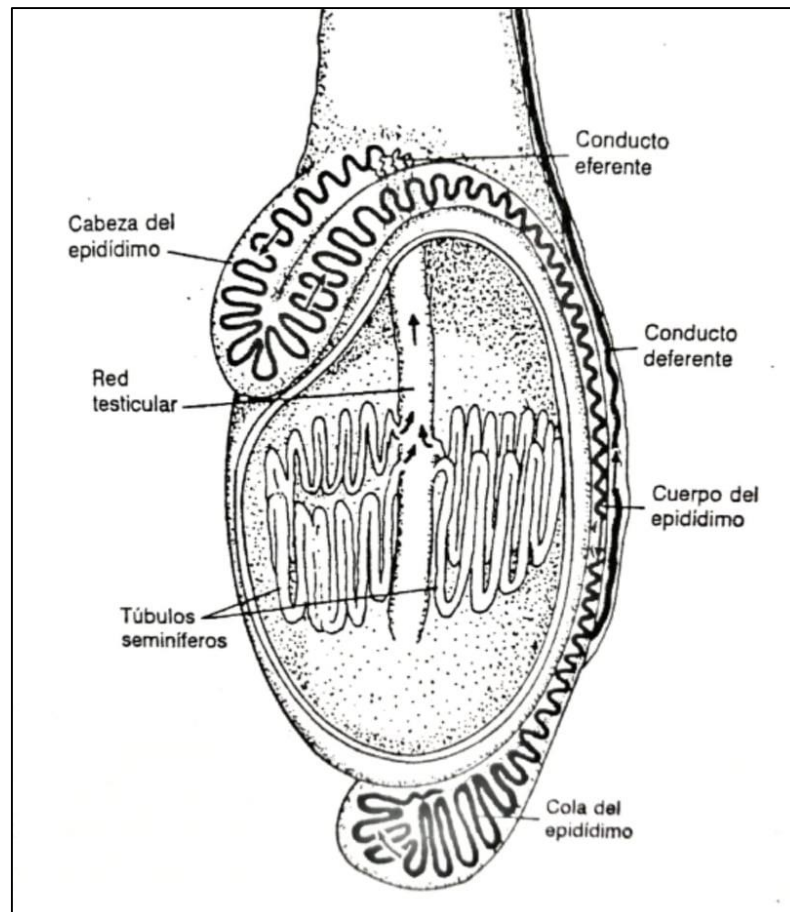


Figura 1: Asas de túbulos seminíferos, red testicular y el conducto epididimario del morueco. La vía por la cual son transportados al exterior los espermatozoides se indican mediante las flechas. Modificado de Setchell BP. Fuente: Cole HH, Cupps PT. (1977).

2.3.1. Capacitación espermática

Después de ser eyaculados, los espermatozoides no pueden fecundar los ovocitos inmediatamente. Chang (1951) y Austin (1951) observaron que estos deben entrar en contacto con el tracto reproductivo de la hembra para adquirir su capacidad fecundante. Durante su recorrido, principalmente en el oviducto (Bravo

P., Solís P., Ordoñez C. y Alarcón V., 1997c), los espermatozoides sufren cambios bioquímicos y estructurales, denominado capacitación espermática.

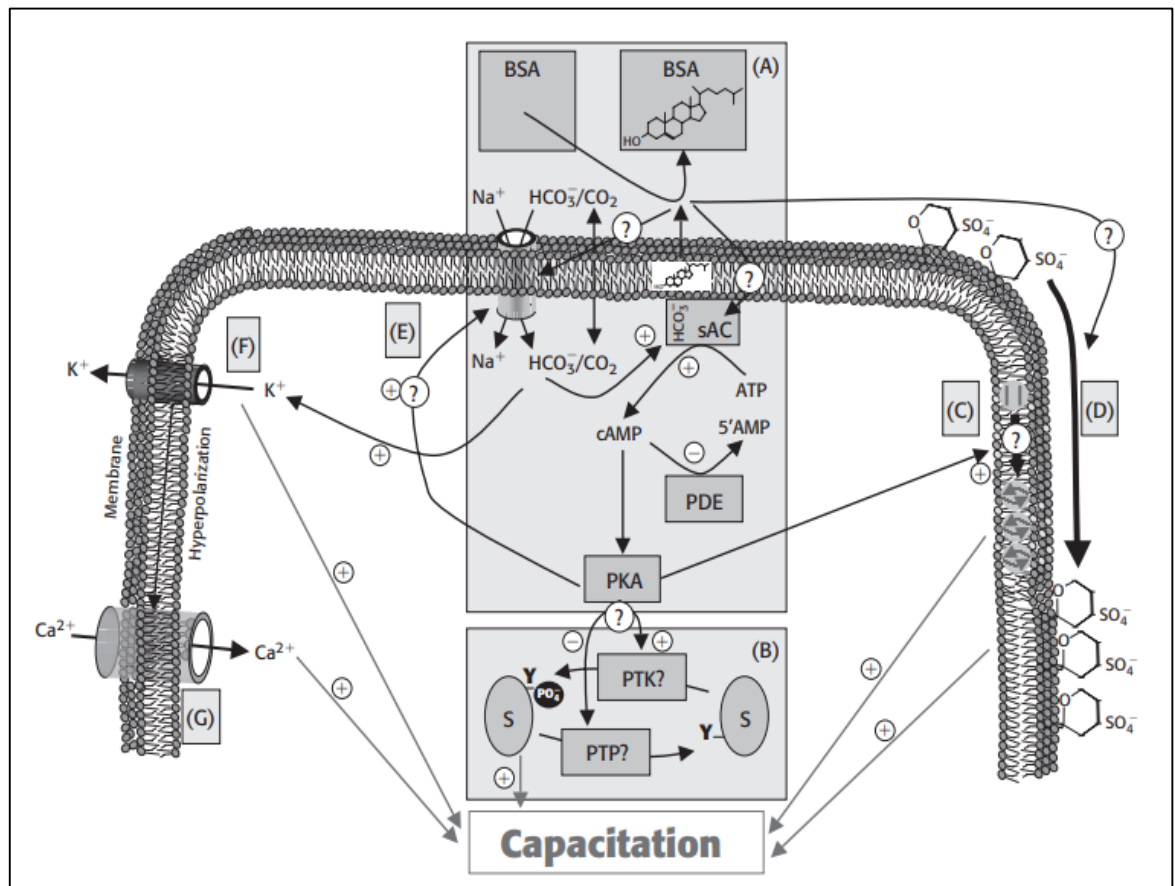


Figura 2: Señales de capacitación: propuesta de secuencia de capacitación *in vitro* en espermatozoides de mamífero. Fuente: Gadella y Visconti (2006).

Los eventos moleculares implicados al inicio de esta, incluyen: reordenamiento lipoproteico en la membrana plasmática que permite la disminución de la rigidez de la misma, exteriorización de receptores, activación de canales iónicos que incrementan el pH y calcio intracelular, fusión y vesiculación de membranas plasmática y acrosomal externa, alteración en los patrones de motilidad del flagelo y un aumento de la fosforilación de las proteínas (Gadella y Visconti, 2006). Cabe mencionar que el bicarbonato, calcio y los aceptores de colesterol son esenciales durante todo el proceso de capacitación (Figura 2). Como

resultado de esta, el espermatozoide incrementa su motilidad y adquiere la habilidad de experimentar la reacción acrosomal (Visconti, Krapf, De La Vega-Beltrán, Acevedo y Darszon, 2011).

a) Bicarbonato (HCO_3^-)

Muchos estudios han demostrado que el proceso de capacitación es dependiente HCO_3^- (Gadella y Harrison, 2000; Visconti P. E., Bailey J. L., Moore G. D., Pan D., Olds-Clarke P. y Kopf, G. S., 1995; Harrison, 2004; Boerke A., Brouwers J., Olkkonen V., Van de Lest C., Sostaric E., Schoevers E., *et al.*, 2013). Cabe señalar que el bicarbonato se ha encontrado en bajas concentraciones en el epidídimo y elevadas en el plasma seminal y oviducto, por lo que se presume que juega un papel importante suprimiendo la capacitación en el primero y promoviéndola en los últimos mencionados (Rodríguez-Martínez H., Ekstedt E., y Einarsson S., 1990). El movimiento transmembrana de este anión se asocia con el incremento intracelular del pH observado durante la capacitación (Parrish J., Susko-Parrish J. y First N., 1989).

Por otro lado, el HCO_3^- es capaz de estimular la Adenil ciclasa (AC), enzima responsable de la síntesis del Adenosín monofosfato (AMPc) (Visconti P., Muschietti J., Flawia M. y Tezon, J., 1990). El AMPc activa a las protein kinasa (PKA), permitiendo la fosforilización de la protein-tirosina. La fosforilación de los residuos de tirosina permite la regulación de la movilidad del espermatozoide y el reconocimiento de la zona pelúcida (Vijayaraghavan S., Trautman K. D., Goueli S. A. y Carr D. W., 1997). Así mismo, el bicarbonato también modifica la estructura lipídica de la membrana plasmática utilizando la ruta AC/AMPc/PKA,

antes mencionada (Gadella y Harrison, 2000) permitiendo la reacción acrosomal del espermatozoide y fecundación del ovocito.

b) Aceptores de colesterol

Los espermatozoides recién eyaculados presentan una relación colesterol/fosfolípidos (C/F) elevada, lo que genera la “rigidez” de su membrana plasmática por lo que no puede sufrir exocitosis acrosomal. Durante el tránsito en el tracto reproductivo de la hembra, el colesterol (CHOL) se mueve de la membrana plasmática hacia los aceptores de colesterol presentes en el fluido oviductal permitiendo la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. La pérdida de colesterol permite la exposición de los receptores de membrana para la manosa (Sierra R. A. y Olivera M., 2000).

c) Calcio (Ca^{2+})

Luego de la salida del colesterol de las membranas junto con activación de un canal de calcio en la membrana acrosomal externa por parte del PKA (Olivera M., Ruiz T., Tarazona A. y Giraldo C., 2006), el calcio extracelular ingresa al espermatozoide de manera masiva como consecuencia de la apertura de los canales dependientes del voltaje (CatSper 1 y 2) localizados en la cola del espermatozoide, por despolarización de la membrana plasmática, lo cual se encuentra relacionado a la motilidad hiperactivada del espermatozoide (Xia y Ren, 2009). El Ca^{2+} juega un papel muy importante junto con el HCO_3^- en la transducción de señales de la adenilato ciclasa (AC), enzima que regula el metabolismo del AMPc. (Chang y Suarez, 2011)

2.3.2. Capacitación espermática *in vitro*

Para determinar los mecanismos moleculares involucrados en la capacitación de espermatozoides, se han utilizado medios de capacitación *in vitro*; es decir que se incuban los espermatozoides en tampones definidos químicamente que imitan los fluidos del tracto reproductivo de la hembra. Esto se ha realizado en espermatozoides de diversas especies de animales, especialmente mamíferos; pero se necesita de condiciones adecuadas como un medio de cultivo que contenga las sustancias pro capacitantes que activen el estado de capacitación, así como tiempo y temperatura adecuadas para alcanzar dicho fin (Jaiswal B., Cohen-Dayag A., Tur-Kaspa I. y Eisenbach M., 1998).

a) Medios de capacitación espermática *in vitro*

El contenido de los medios capacitantes varía de acuerdo a la especie en estudio, pero en general HCO_3^- , Ca^{2+} y albúmina son los componentes esenciales para la capacitación en todas las especies (Visconti P., Galantino-Homer H., Moore G., Bailey J., Ning X., Fornes M. y Kopf G., 1998). Por ejemplo, el medio Biggers, Whitten y Whittingham (BWW) comprende una solución salina equilibrada, una macromolécula, típicamente albúmina de suero bovino (BSA) o alcohol polivinílico, complementada con diversos sustratos energéticos como glucosa, piruvato y lactato, así como Ca^{2+} y HCO_3^- . Este se ha utilizado de manera efectiva para incrementar la capacidad fecundante de los espermatozoides de una variedad de especies, incluyendo humanos, equinos, caninos y bovinos (Lin M., Zhang X., Murdoch R. N. y Aitken R. J., 2017). En el equino; los espermatozoides fueron diluidos utilizando este medio más albúmina sérica y cafeína 1 mM, asegurando capacitación espermática (Thomas A. D., Meyers S. A. y Ball B. A., 2006). Por otro lado, en espermatozoides epididimarios de

bovinos, se utilizó un medio de lavado buffer fosfato dextrosa que contenía 119 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1.2 mM MgSO₄, 10 mM glucosa, 16.3 mM KH₂PO₄, y 100 U/ml de penicilina (Visesato M., Tapasi D., Maitreyi B. y Tapati C., 2007). En este mismo estudio también utilizaron 5 ml de BWW mencionado anteriormente y suplementado con heparina o albúmina sérica bovina (Thomas *et al.*, 2006).

En alpacas, se ha descrito el método de capacitación mediante el uso del medio HAM F10 junto con una concentración de albúmina sérica bovina (BSA) (Manosalva, 2003). Por otro lado, se ha estudiado la criocapacitación, en donde los espermatozoides luego de ser criopreservados presentan niveles elevados de calcio intracelular, evento que se asemeja a una capacitación espermática normal. Sin embargo, la capacidad de unión a la zona pelúcida de los espermatozoides criopreservados fue menor que la de los espermatozoides capacitados *in vitro*. A pesar de estos resultados, se pudo resaltar que los primeros no necesitan ningún tratamiento de capacitación *in vitro* para lograr dicho fin. (Canorio, 2008).

También se ha evaluado el efecto del fluido folicular en la capacitación espermática, sin embargo, esto varía según la especie tanto en motilidad como en la reacción acrosomal. Bravo y Valdivia (2018), observaron el efecto del fluido folicular de alpaca (FFa) en la motilidad y reacción acrosómica de los espermatozoides de alpaca, utilizando un fluido folicular de tres tamaños de folículo: pequeño (< 3 mm), medio (3-6 mm) y grande (> 6 mm), en una concentración del 30%. Se concluyó que el tamaño folicular influye en el efecto del líquido folicular en el espermatozoide de alpaca, donde los folículos pequeños y medianos estimulan mejor la motilidad del esperma, pero la reacción del acrosoma se ve aumentada por el líquido folicular de los folículos pequeños y grandes.

3. Conclusión

El espermatozoide es una célula especializada cuyo estado metabólico está determinado por el medio en el que se encuentre. Al atravesar el tracto reproductivo de la hembra, sufre cambios estructurales y bioquímicos, denominado capacitación espermática. Este proceso es indispensable para que ocurra la fecundación de un ovocito maduro.

Con lo mencionado anteriormente, se concluye que es necesario reproducir las condiciones pro capacitantes mediante el uso de medios de capacitación para el desarrollo y aplicación de biotecnologías reproductivas, como la fecundación *in vitro*, y con ello, incrementar la tasa de concepción de la alpaca.

Si bien, la capacitación *in vitro* fue realizada con éxito en diversas especies domésticas y se han estudiado los principales componentes de los medios (bicarbonato, calcio y albúmina); en la alpaca, no se cuenta con estudios suficientes sobre el proceso de capacitación y menos aún de qué factor conlleva a dicho estado funcional.

4. Referencias Bibliográficas

1. Abraham, M. C., Puhakka, J., Ruete, A., Al-Essawe, E. M., de Verdier, K., Morrell, J. M., y Båge, R. (2016). Testicular length as an indicator of the onset of sperm production in alpacas under Swedish conditions. *Acta veterinaria Scandinavica*, 58, 10. doi:10.1186/s13028-016-0191-x
2. Apaza, N., Olarte, U. y Málaga, J. (1998). Empadre controlado de alpacas Huacaya en el Banco de Germoplasma de la EE ILLPA Puno. Memorias de la XXI Reunión Científica Anual de la Asociación Peruana de Producción Animal. Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.
3. Apaza, N., Sapana, R., Huanca, T. y Huanca, W. (2001). Inseminación artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. *Rev Invest Vet, Perú Supl*, 1, 435-438.
4. Austin, C. (1951). Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res*, 4, 581-596.
5. Boerke A., Brouwers J., Olkkonen V., Van de Lest C., Sostaric E., Schoevers E., Bernd H. y Gadella B. (2013). Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of capacitating mammalian sperm during in vitro fertilization. *Biology of reproduction*, 88(1), 21-1.
6. Bravo PW. (1995). Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. *Proceedings of Post Graduate Foundation in Veterinary Science of University of Sydney* 257: 61-66.
7. Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J., y Ordonez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47(3), 619-626.
8. Bravo, P., Solis, P., Ordoñez, C. y Alarcón, V. (1997c). Fertility of the male alpaca: effect of daily consecutive breeding. *Animal Reproduction Science*. 46: 305-312.

9. Bravo, Z. y Valdivia, M. (2018). Follicular fluid stimulates capacitation and acrosome reaction in alpaca sperm (*Vicugna pacos*). *Reproduction in domestic animals*, 53(3), 629-635.
10. Canorio, N. (2008). Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*) (Doctoral dissertation, Tesis de Magíster. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 102 p).
11. Chang, H., y Suarez, S. S. (2011). Two distinct Ca²⁺ signaling pathways modulate sperm flagellar beating patterns in mice. *Biology of reproduction*, 85(2), 296-305.
12. Chang, M. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168, 697-698.
13. Cole HH, Cupps PT. (1977). *Reproduction in Domestic Animals*. New York: Academic Press
14. Díaz V, Hugo, Espinoza B, Juan, Huanca L, Wilfredo, Lopez-Torres, Bernardo, & Rodríguez G, José. (2015). Características Bioquímicas del Plasma Seminal Fresco y Congelado/Descongelado de Alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(1), 43-48. Recuperado en 17 de octubre de 2019, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172015000100006&lng=es&tlng=pt.
15. Eddy EM y O'Brien DA. (1994). The spermatozoon. *The Physiology of Reproduction*, Vol. 1, eds E Knobil and JD Neill, New York: Raven Press, pp. 29–77
16. Fernández Baca S. (1993). Manipulation of reproductive functions in male and female New World camelids. *Ani. Reprod. Sci.* 33, 307-323.

17. Gadella B y Harrison R (2000). The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*. 127: 2407-2420.
18. Gadella, B. y Visconti, P. (2006). Regulation of capacitation. *The sperm cell: Production, maturation, fertilization, regeneration*, 134-169.
19. Gómez C, Ratto MH, Berland M, Wolter M y Adams GP. (2002). Superstimulatory response and oocyte collection in Alpacas. *Theriogenology* 57: p584.
20. Hafez, E. S. E., y Hafez, B. (2007). *Reproducción e inseminación artificial en animales*. McGraw-hill.
21. Harrison RA (2004). Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Molecular reproduction and development*. 67: 337- 352
22. Huanca W, Cordero A, Huanca T y Adams G. (2007). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos: Avances y perspectivas. En *Resúmenes de la XX Reunion ALPA, XXX Reunion científica anual peruana de producción animal*. Cusco-Peru.
23. Huanca, T., Mamani, R., Naveros, M. L., y Gonzales, M. (2012). Variación individual y estacional de las características seminales en la alpaca (*Vicugna pacos*).
24. Jaiswal, B. S., Cohen-Dayag, A., Tur-Kaspa, I., y Eisenbach, M. (1998). Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS letters*, 427(2), 309-313.
25. Lin M., Zhang X., Murdoch R. N. y Aitken R. J. (2017). Swim-up of tammar wallaby (*Macropus eugenii*) spermatozoa in Biggers, Whitter and Whittingham (BWW) medium: maximisation of sperm motility, minimisation of impairment of

- sperm metabolism and induction of sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(2), 345-356.
26. Manosalva I. (2003). Capacitación in vitro de espermatozoides de alpaca. Tesis Título– Facultad de Ciencias Biológicas-Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
27. MINAGRI (2019). Potencial productivo y comercial de la Alpaca - septiembre 2019. Recuperado de: file:///C:/Users/User/Downloads/potencial_productivo_comercial_de_la_alpaca.pdf f MINAGRI 2019
28. Miragaya M. H., Chaves M. G., y Agüero A. (2006). Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*, 61(2-3), 299-310.
29. Montalvo, C., Cevallos, E. y Copaira, M. (1979). Estudio microscópico del parénquima testicular de la alpaca durante las estaciones del año. Res. Proyectos de Investigacion PU, editor. Nacional Mayor de San Marco. s, Lima1979, 37.
30. Morton, K. M., y Maxwell, W. C. (2006). The continued development of artificial insemination technologies in alpacas. University of Sydney-NSW, Australia: ReproGen–RIRDC.
31. Muro, Y., Hasuwa, H., Isotani, A., Miyata, H., Yamagata, K., Ikawa, M., ... & Okabe, M. (2016). Behavior of mouse spermatozoa in the female reproductive tract from soon after mating to the beginning of fertilization. *Biology of reproduction*, 94(4), 80-1.
32. Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A. y Giraldo, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426-436.

33. Parrish J., Susko-Parrish J. y First N. (1989) Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. *Biol Reprod* 41 (4), 683–699.
34. Ratto M., Gomez C., Berland, M. y Adams G. P. (2007). Effect of ovarian superstimulation on COC collection and maturation in alpacas. *Animal reproduction science*, 97(3-4), 246-256.
35. Rodriguez-Martinez H., Ekstedt E., y Einarsson S. (1990). Acidification of epididymal fluid in the boar. *International journal of andrology*, 13(3), 238-243.
36. Ruiz J. A., Correa J. E., Ayuque G., Landeo L., Yaranga M., y Zacarías A. (2007). Producción in vitro de embriones partenogénéticos de alpaca y llama. In Resúmenes del I Congreso Nacional de Reproducción y Mejoramiento Genético de Camélidos Sudamericanos y I Simposium Internacional de Biotecnología Aplicada en Camélidos Sudamericanos (pp. 145-149).
37. Sierra R. A. y Olivera M. (2000). Interacción entre gametos: ¿Cómo lo logra el espermatozoide? *Rev Col Cienc Pec* 2000; 13: 148-155.
38. Sumar, J. (1983). Studies on Reproductive pathology in Alpacas. Faculty of veterinary medicine UNMSM- Lima.
39. Sumar, J. (1997). Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. In *Memorias I Symposium Internacional Avances en Reproducción de Rumiantes. Perú.* p (pp. 30-55).
40. Thomas A. D., Meyers S. A. y Ball B. A. (2006). Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology*, 65(8), 1531-1550.
41. Uriondo, H., Alvarez, C., Rodríguez, C., Uipan, P. y Valdivia, M. (2008). Evaluación de la motilidad y reacción acrosómica durante la capacitación in vitro

- de espermatozoides de alpaca en presencia de zona pelúcida intacta y solubilizada. Acta en La XIX Reunion Anual de la Sociedad Chilena de Reproduccion y Desarrollo, 3-5.
42. Vijayaraghavan S., Trautman K. D., Goueli S. A. y Carr D. W. (1997). A tyrosine-phosphorylated 55-kilodalton motility-associated bovine sperm protein is regulated by cyclic adenosine 3', 5'-monophosphates and calcium. *Biology of reproduction*, 56(6), 1450-1457.
43. Visconti P. E., Bailey J. L., Moore G. D., Pan D., Olds-Clarke P. y Kopf, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*, 121(4), 1129-1137.
44. Visconti, P. E., Krapf, D., De La Vega-beltrán, J. L., Acevedo, J. J., y Darszon, A. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*, 13(3), 395. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.69>
45. Visconti, P. E., Muschietti, J. P., Flawia, M. M., y Tezon, J. G. (1990). Bicarbonate dependence of cAMP accumulation induced by phorbol esters in hamster spermatozoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1054(2), 231-236.
46. Visconti, P., Galantino-Homer, H., Moore, G., Bailey, J., Ning, X., Fornes, M., y Kopf, G. (1998). The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology*, 19(2), 242-248.
47. Visesato M., Tapasi D., Maitreyi B. y Tapati C. (2007). Protein tyrosine phosphorylation of a heparin-binding sperm membrane mitogen (HBSM) is associated with capacitation and acrosome reaction. *Biochemical and biophysical research communications*, 352(2), 404-409.

48. Xia, J. y Ren, D. (2009). The BSA-induced Ca (2+) influx during sperm capacitation is CATSPER channel-dependent. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 119.