

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Integridad acrosomal y de la membrana plasmática en
espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”
recuperados de semen fresco, refrigerado
y congelado. Ayacucho - 2018.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Presentado por el:

Bach. CUEVA HURTADO, Ricardo César Próspero

AYACUCHO – PERÚ

2018

A Dios y a mi madre

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por constituir el Alma Mater de mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología, Especialidad de Biotecnología y plana docente quienes contribuyeron a mi formación profesional.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores y M.V. Mijaíl Contreras Huamani de la Estación Experimental Agraria “Canaán” del INIA, por haberme brindado todas las facilidades para realizar mi trabajo de tesis.

A mi asesor, Mg. Fidel Rodolfo Mujica Lengua por su apoyo y orientación académica, que ha permitido la elaboración y finalización del presente trabajo de tesis.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón docente de la Escuela Profesional de Biología por su colaboración en la parte estadística de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	7
2.3. Bases teóricas	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1. Ubicación de la zona de estudio	25
3.2. Población y muestra	25
3.3. Metodología y recolección de datos	26
3.4. Tipo de investigación	31
3.5. Análisis estadístico	32
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIONES	45
VI. CONCLUSIONES	55
VII. RECOMENDACIONES	57
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	63

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Distribución de las unidades experimentales para la variable integridad del acrosoma según su tratamiento representadas en el diseño en bloque completamente aleatorizado.	29
Tabla 2. Distribución de las unidades experimentales para la variable integridad de membrana espermática según su tratamiento representadas en el diseño en bloque completamente aleatorizado.	30
Tabla 3. Valores promedio y desviación típica de espermatozoides vivos con acrosoma intacto respecto a diferentes etapas del procesamiento de semen de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca". Ayacucho, 2018.	34
Tabla 4. Valores promedio y desviación típica de espermatozoides vivos con membrana celular intacta respecto a diferentes etapas del procesamiento de semen de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca". Ayacucho, 2018.	36
Tabla 5. Valores promedio y desviación típica de la motilidad individual de espermatozoides respecto a diferentes etapas del procesamiento de semen de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca". Ayacucho, 2018.	38
Tabla 6. Valores promedio y desviación típica de las características seminales de cada uno de los cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca" colectados por vagina artificial de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA-Ayacucho, 2018.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Partes del acrosoma del espermatozoide de mamífero.	11
Figura 2. Estructura y membrana plasmática del espermatozoide de mamífero.	11
Figura 3. Características de la muestra espermática sometida al proceso de Tinción Triple con azul tripán, rojo neutro y solución Giemsa.	21
Figura 4. Valores promedios del porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides vivos de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca" evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018.	35
Figura 5. Valores de la mediana en porcentaje de integridad de membrana plasmática de espermatozoides vivos de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca" evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018.	37
Figura 6. Valores promedios del porcentaje de motilidad individual de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca" evaluados en tres etapas de conservación de semen. Ayacucho, 2018	39
Figura 7. Promedios en porcentaje de la motilidad, integridad de membrana espermática e integridad del acrosoma en diferentes etapas del procesamiento de semen de cinco reproductores de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca", INIA - Ayacucho, 2018.	40
Figura 8. Espermatozoides de alpaca teñidos con la triple tinción azul de tripán, Rojo neutro y Giemsa. a) Espermatozoide vivo con acrosoma intacto. b) Espermatozoide vivo sin acrosoma. c) Espermatozoide muerto con acrosoma intacto. d) Espermatozoide muerto sin acrosoma.	42
Figura 9. Espermatozoides de alpaca teñidos con el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI, analizados en el AndroVision sistema CASA. a) espermatozoides con membrana íntegra se observó de color azul. b) espermatozoides con membrana dañada se observó de color rojo.	43

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág
Anexo 1. Registro total de datos de las características seminales y valores en porcentaje de la integridad acrosomal y de membrana plasmática de espermatozoides de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen, en las diferentes fechas de evaluación. Ayacucho, 2018.	64
Anexo 2. Registro de datos de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y reaccionado, espermatozoides muertos con acrosoma intacto y reaccionado de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen, en las diferentes fechas de evaluación. Ayacucho, 2018.	65
Anexo 3. Registro de datos de espermatozoides con integridad de membrana plasmática (Viabiles) y espermatozoides con membrana plasmática desintegrada (No viables) de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen, en las diferentes fechas de evaluación. Ayacucho, 2018.	66
Anexo 4. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para integridad del acrosoma de espermatozoides vivos de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen. Ayacucho, 2018.	67
Anexo 5. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para integridad del acrosoma de espermatozoides vivos de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, evaluados en tres tipos de semen. Ayacucho, 2018.	68
Anexo 6. Prueba de DBCA de integridad del acrosoma de espermatozoides vivos de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” evaluados en tres tipos de semen. Ayacucho, 2018.	69
Anexo 7. Prueba comparación de medias de HSD Tukey de integridad del acrosoma de espermatozoides vivos de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” evaluados en tres tipos de semen. Ayacucho, 2018.	70

Anexo 8.	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para integridad de membrana plasmática de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen. Ayacucho, 2018.	71
Anexo 9.	Prueba de Friedman para integridad de membrana plasmática de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” evaluados en tres tipos de semen. Ayacucho, 2018.	72
Anexo 10.	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para motilidad individual de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen. Ayacucho, 2018.	73
Anexo 11.	Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para motilidad individual de espermatozoides vivos de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, evaluados en tres tipos de semen. Ayacucho, 2018.	74
Anexo 12.	Prueba de DBCA de motilidad individual de espermatozoides vivos de cinco machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” evaluados en tres tipos de semen. Ayacucho, 2018.	75
Anexo 13.	Prueba de comparación de medias de HSD Tukey para la motilidad individual de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” evaluados en tres tipos de semen. Ayacucho, 2018.	76
Anexo 14.	Armado de la vagina artificial y recolección de semen de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” de la Estación Experimental Agraria Canaán. Ayacucho, 2018.	77
Anexo 15.	Procesamiento de muestras de semen de alpaca para su evaluación de integridad del acrosoma y membrana espermática en la Estación Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.	78
Anexo 16.	Preparación de los colorantes azul de tripán, rojo neutro y Giemsa para evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. Ayacucho, 2018.	79
Anexo 17.	Procesos de la tiple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa para evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” en la Estación	80

	Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.	
Anexo 18.	Observación microscópica de espermatozoides de alpaca vivos y muertos con y sin acrosoma, utilizando la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa en la Estación Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.	81
Anexo 19.	Equipo de AndroVision (Sistema CASA) para la evaluación de la integridad de membrana espermática (viabilidad) en la Estación Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.	82
Anexo 20.	Proceso de preparación y observación microscópica de espermatozoides con membrana intacta y dañada en el equipo de AndroVision (Sistema CASA) usando el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI en la Estación Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.	83
Anexo 21.	Matriz de Consistencia.	84

RESUMEN

La reproducción en alpacas mediante Inseminación Artificial y fecundación *in vitro* usando semen refrigerado y congelado se ha convertido en una problemática ya que se han encontrado mayor daño en la estructura de los espermatozoides en comparación con el semen fresco, siendo unas de las causas la pérdida del acrosoma y el daño a nivel de membrana espermática. Es por ello que esta investigación tuvo como objetivo evaluar la integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de alpaca en semen fresco, refrigerado y congelado usando la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa y la tinción fluorescente de Hoechst 33342/PI. La investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán-Ayacucho. Se trabajó con 45 muestras de semen colectado de cinco alpacas macho por vagina artificial con tres repeticiones para cada uno. Se analizó los parámetros espermáticos como el volumen, concentración, vitalidad y motilidad. Para la evaluación de la integridad acrosomal en los tratamientos se usó el método de triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa y para la evaluación de la integridad de membrana se usó el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI) analizado en el AndroVision (Sistema CASA). El porcentaje promedio de la integridad del acrosoma fue 79,33%; 65,60%; y 38,54% para semen fresco, refrigerado y congelado respectivamente, existiendo diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0,05$). El porcentaje de integridad de membrana obtuvo valores de la mediana de 61,73%; 51,60% y 26,13% para semen fresco, refrigerado y congelado respectivamente, existiendo diferencias significativa entre los tratamientos ($p < 0,05$). El porcentaje de motilidad espermática fue 71,13%; 63,67% y 22,60% para semen fresco refrigerado y congelado, no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos con semen fresco y refrigerado. Sin embargo existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los dos primeros tratamientos comparados con el semen congelado. La motilidad y la integridad del acrosoma obtuvieron los mejores resultados en los tres tratamientos. Las características seminales fueron el volumen que obtuvo un promedio 1,22 ml de semen, la concentración espermática fue 194×10^6 espermatozoides/ml y 72,53% de vitalidad espermática. Los espermatozoides vivos con acrosoma intacto se observó la zona acrosomal fucsia y la postacrosomal blanquecina. Los espermatozoides con membrana intacta se observó de color azul y los espermatozoides con membrana dañada se observó de color rojo. Se concluye que la integridad acrosomal e integridad de membrana espermática son estadísticamente diferentes en las tres etapas de conservación del semen, asimismo la motilidad espermática es estadísticamente igual en semen fresco y refrigerado pero son diferentes estadísticamente con el semen congelado.

Palabras clave: integridad del acrosoma, integridad de membrana, *Vicugna pacos*.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad se ha incrementado la utilización de semen fresco, refrigerado y congelado para la inseminación artificial y fertilización *in vitro* en diferentes especies animales de producción. En la mayoría de estudios realizados en nuestro medio orientados al manejo y conservación de espermatozoides en alpacas incluyen limitados parámetros de referencia.

No obstante, existen técnicas especializadas diseñadas con la finalidad de estimar la potencial capacidad fecundante de una muestra de espermatozoides. En ese sentido, la evaluación de la integridad funcional y estructural de la membrana plasmática, así como de la integridad acrosomal puede representar indicadores de la funcionalidad de los espermatozoides.¹

La integridad de la membrana plasmática y acrosomal reflejan la viabilidad espermática. Los procesos de refrigeración y criopreservación podrían afectar estas membranas ocasionando daños como hinchamiento y disrupción de las mismas, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pueden inducir una capacitación espermática anticipada, viéndose afectada la fertilidad.²

Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides sufren daño principalmente en la membrana plasmática y acrosomal, reduciendo así el número de células viables acortando su tiempo de vida en el tracto reproductivo de la hembra; por lo tanto tendrían una menor oportunidad de poder fecundar el ovocito. En el acrosoma se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la zona acrosomal con su borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas, los mismos que tienden a romperse en el proceso de refrigeración, congelación y descongelamiento. Las muestras seminales con alta proporción de alteraciones acrosomales suelen tener una fertilidad baja. De igual manera, la integridad en la membrana plasmática del espermatozoide es muy importante para la fertilidad ya que un daño produciría

modificaciones en su permeabilidad, lo que a su vez produce alteraciones de sus funciones metabólicas, perjudicando la motilidad y su capacidad fecundante.³

La evaluación precisa del estado acrosomal y de la membrana espermática es uno de los pasos más importantes para determinar el potencial fecundante de los espermatozoides de alpaca, por ello las pruebas, tinciones y métodos para evaluar la integridad de membrana y del acrosoma deben ser confiables como lo son los dos fluorocromos Hoechst 33342/PI usados para evaluar la integridad de membrana y la triple tinción con azul de tripán, rojo neutro y Giemsa para evaluar la integridad acrosomal. En base a lo mencionado se planteó la presente investigación teniendo los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar la integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de alpaca de semen fresco, refrigerado y congelado.

Objetivos específicos

1. Determinar la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca usando la triple tinción con azul de tripán, rojo neutro y Giemsa en semen fresco, refrigerado y congelado.
2. Determinar la integridad de la membrana plasmática usando la tinción fluorescente de Hoechst 33342/PI con el módulo AndroVision (Sistema CASA), en semen fresco, refrigerado y congelado.
3. Determinar la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado y congelado.
4. Evaluar el volumen, concentración y vitalidad espermática de la alpaca.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Ugarelli A et al.⁴ 2017, al evaluar la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo, determinó el porcentaje de integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca utilizando *Arachis hypogaea* y *Pisum sativum*, conjugadas con isotiocianato de fluoresceína. Los espermatozoides que emitieron fluorescencia verde fueron considerados con daño acrosomal, mientras que los que emitieron fluorescencia roja fueron considerados muertos. Se obtuvo $59,17 \pm 4,84$ y $61,13 \pm 4,35\%$ de espermatozoides vivos con integridad acrosomal para isotiocianato de fluoresceína con *Arachis hypogaea* y isotiocianato de fluoresceína con *Pisum sativum*, respectivamente.⁴

Suhevic J et al.⁵ 2015, al estudiar la calidad de las membranas espermáticas porcinas mediante triple tinción fluorocrómica en semen fresco y refrigerado, determinó mediante una triple tinción fluorocrómica (Hoechst 33342, Ioduro de Propidio, *Pisum sativum* con isotiocianato de fluoresceína) la calidad de las membranas espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado a 17°C. El porcentaje de células con acrosoma intacto fue inferior en el semen refrigerado tanto para espermatozoides con membrana plasmática intacta (Fresco: 59,6%; Refrigerado: 49,92%) como lesionada (Fresco: 16,74%; Refrigerado: 10,17%). Se pudo evidenciar que durante el proceso de refrigeración la membrana más afectada es la acrosomal.⁵

Carretero M et al.⁶ 2015, al evaluar el estado acrosomal de espermatozoides de llama (*Lama glama*), se determinó la integridad acrosomal por dos técnicas de microscopía de campo claro, técnica de tinción azul Coomassie y la triple tinción azul tripán, rojo neutro y Giemsa la primera técnica se utilizó para evaluar el estado acrosomal en muestras de semen fresco, semen incubado con colagenasa, semen refrigerado y semen congelado/descongelado. Los patrones

observados con la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa fueron; espermatozoides vivos con membranas íntegras y con acrosoma presente (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma púrpura); espermatozoides vivos con acrosoma dañado o suelto (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma lavanda claro u oscuro); espermatozoides muertos con acrosoma presente (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma púrpura); espermatozoides muertos con acrosoma dañado o suelto (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma violeta claro u oscuro). También se evaluó la integridad acrosomal por técnicas de mediante microscopía de fluorescencia, se estudiaron mediante citometría de flujo el estado acrosomal de espermatozoides de alpaca, para lo cual utilizaron FITC-PSA (FITC- *Pisum sativum agglutinin*) junto con un fluorocromo, el ioduro de propidio (IP), logrando identificar diferentes poblaciones celulares; espermatozoides viables con membrana acrosomal intacta, viables con membrana acrosomal dañada, espermatozoides muertos con membrana acrosomal intacta y con membrana acrosomal dañada.⁶

Fumuso F et al.⁷ 2015, en su investigación sobre viabilidad y el estado acrosomal de espermatozoides de llama (*Lama glama*), evaluó la integridad acrosomal y viabilidad en llamas usando la triple tinción (azul tripán, rojo neutro, ácido clorhídrico y Giemsa), observando espermatozoides vivos con membranas íntegras y con acrosoma presente (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma púrpura); espermatozoides vivos con acrosoma dañado o suelto (región postacrosomal celeste o azul claro y acrosoma lavanda claro u oscuro); espermatozoides muertos con acrosoma presente (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma púrpura) y espermatozoides muertos con acrosoma dañado o suelto (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma violeta claro u oscuro).⁷

Calderón A.⁸ 2015, en su trabajo efecto de la adición del plasma seminal de toro (*Bos taurus*) sobre la viabilidad de los espermatozoides criopreservados colectados de los conductos deferentes en alpacas "*Vicugna pacos*", evaluó la motilidad individual de los espermatozoides en semen fresco, refrigerado y congelado, menciona a la colección de (37°C) fue 43,98% usando dilutor tris yema de huevo, en la refrigeración 5°C fue 33,24%, a la descongelación 14,46% con el mismo dilutor. En La integridad de membrana (prueba de HOST) de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 46,63%, a la refrigeración 5°C fue 33,51% y al momento de la descongelación fue 21,54% usando el dilutor Tris yema de huevo.⁸

Asimismo menciona la integridad del acrosoma de los espermatozoides a la colección (37°C) fue 44,78%, a la refrigeración 5°C fue 41,26% y al momento de la descongelación fue 25,12%.⁸

Vargas P.⁹ 2015, en su estudio efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros, se evaluó la integridad de la membrana espermática y acrosoma en semen de carneros de tres razas (Criollo, Corriedale y Texel) expuestos a tres dilutores (Tris, agua de coco y leche UHT), al momento de la refrigeración (5°C) y descongelación; la prueba de endosmosis fue utilizada para evaluar la integridad de la membrana espermática y la tinción triple para evaluar la integridad del acrosoma. Los resultados obtenidos a la refrigeración y descongelación para integridad de membrana para el efecto dilutor fueron 67,33%; 49,93%; 46,93% y 34,47%; 24,73%; 20,93% para el dilutor tris, agua de coco y leche UHT respectivamente. En el acrosoma en semen refrigerado y descongelado para el efecto del dilutor se obtuvo 50,60%; 44,27%; 48,93% y 24,33%; 24,0%; 28,20% para el dilutor tris, agua de coco y leche UHT respectivamente.⁹

Cabrera P et al.¹⁰ 2014, al estudiar la selección espermática en semen congelado/descongelado de equino, determinó por citometría de flujo la viabilidad e integridad de membrana plasmática (SYBR-14/PI), potencial de membrana mitocondrial e integridad de la membrana acrosomal (FITC-PSA/PI) en semen descongelado de equino. Los espermatozoides de equinos viables con membrana plasmática intacta al comparar dos dilutores no presentó diferencia significativa en un animal B (15,2±6,4 vs. 12,6±0,7). Sin embargo, se observó diferencia significativa en tres animales, siendo superior el dilutor Swim-up al Equipure® en dos de ellos (A: 54,3±1,7 vs. 36,7±1,9, C: 36,1±5,7 vs. 29,4±4,8 y D: 34,4±9,4 vs. 52,7±5,2, respectivamente. En cuanto a los espermatozoides con la membrana acrosomal intacta al comparar dos dilutores, se observó los valores de integridad acrosomal en cuatro animales de equino (A: 32,2±2,7% vs. 34,6±2,7%, B: 12,7±8,0% vs. 7,4±0,9%, C: 23,3±4,1% vs. 18,2±2,4% y D: 14,1±8,3% vs. 26,3±3,1%; respectivamente).¹⁰

Chequeman C et al.¹¹ 2013, al evaluar los parámetros de la función espermática en esperma de alpaca eyaculado mediante citometría de flujo, encontró que el valor promedio para la viabilidad de los espermatozoides fue de 57 ± 8%. Los espermatozoides con membrana acrosómica intacta fueron 87,9 ± 5%, y los espermatozoides viables con membrana acrosomal intacta fueron 46,8

± 9%. Las muestras se procesaron por el análisis por citometría de flujo usando la tinción con SYBR-14 / yoduro de propidio, para evaluar la viabilidad o integridad de membrana plasmática de espermatozoides; la integridad de la membrana acrosomal se evaluó usando etiquetado de aglutinina / yoduro de propidio de *Pisum Sativum* conjugado con FITC.¹¹

Cabrera P et al.³ 2012, en su estudio viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales, evaluó integridad acrosomal, integridad de membrana espermática, motilidad, espermatozoides vivos, volumen y concentración durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación de diez eyaculados por animal. La integridad del acrosoma en semen refrigerado varió entre 59,3 a 69,2% con diferencia estadística entre toros. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó de 65,2% en semen refrigerado a 48,6% en semen congelado/descongelado, sin diferencias estadísticas entre toros. No se encontró una correlación significativa entre motilidad con integridad de membrana espermática o integridad del acrosoma, no se encontró una correlación significativa entre motilidad con integridad de membrana espermática o integridad de acrosoma.³

Díaz O et al.¹² 2009, al estudiar la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos reproductores con gotas citoplásmicas persistentes, evaluó la integridad acrosomal, funcionalidad bioquímica de la membrana espermática y las relaciones entre éstas en machos con y sin persistencia de gotas citoplásmicas (PGC). Se realizó la evaluación de los parámetros reproductores del cerdo jóvenes, maduros y viejos, para funcionalidad bioquímica de la membrana plasmática se obtuvo 54,7%; 59,3% y 54,0% en cada etapa de desarrollo del cerdo jóvenes, maduros y viejos respectivamente. Para acrosoma íntegro registró 84,5%; 85,5% y 85,5% en cerdo jóvenes, maduros y viejos respectivamente. Este estudio concluye que cerdos reproductores mayores de tres años presentan con mayor frecuencia eyaculados de baja calidad espermática.¹²

Rubio J et al.¹³ 2009, al evaluarse el efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros, se encontró el efecto de la criopreservación sobre el porcentaje de espermatozoides vivos (VIT), acrosomas dañados (DAR), y la integridad estructural y funcional de la membrana plasmática y membrana acrosomal de espermatozoides provenientes de cinco eyaculados frescos y cinco pajuelas descongeladas de cuatro toros. Para la valoración de la integridad estructural de

la membrana plasmática y acrosomal se utilizó la tinción eosina-nigrosina tomando una alícuota (10 μ l) de semen fresco y descongelado y sobre una platina termoregurable a 37°C se mezclaba suavemente con la misma cantidad del colorante para realizar un frotis donde se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos y acrosomas dañados. Para la valoración de la funcionalidad de la membrana espermática y acrosomal (integridad funcional), se utilizó el test HOST y ORT, tanto para el semen fresco, como para el descongelado, asimismo menciona que los valores de acrosoma dañada en semen fresco fue 10% y 35,25% en semen pos descongelado. En cuanto a la evaluación de la funcionalidad de la membrana plasmática y acrosomal, los resultados del (ORT) mostraron diferencias altamente significativas al comparar las muestras frescas y descongeladas (88,75% vs. 52,20%), la prueba de (HOST) mostraron diferencias estadísticas significativas (71,85% vs. 50,82%) entre los eyaculados frescos y las muestras descongeladas.¹³

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Espermatozoide

Son células haploides que tienen la mitad de los cromosomas que una célula somática. Se originan inicialmente a partir de las espermatogonias, que son las primeras células germinativas del testículo adulto y están localizadas en la membrana basal del epitelio seminífero. Después de varias mitosis dan origen a los espermatocitos, que son células que entran en meiosis. Los espermatozoides maduros son células alargadas consistentes en una cabeza aplanada portadora del núcleo, están cubiertos por la membrana plasmática y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular.¹⁴

2.2.2. Semen

El semen puede ser definido como la suspensión celular líquida que contiene los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino (glándulas accesorias, epidídimo, testículo y conductos deferentes). El plasma seminal constituye la porción fluida de esa suspensión, que es liberada en la eyaculación.¹⁵

2.2.3. Viabilidad espermática

La integridad de la membrana plasmática y acrosomal reflejan la viabilidad espermática.²

2.2.4. Refrigeración del semen

La reducción gradual de la temperatura disminuye el nivel del metabolismo celular prolongando así la vida útil de los gametos masculinos. Este fenómeno

conocido como choque frío depende de la velocidad de enfriamiento, del rango absoluto de temperatura que se descienda y de la temperatura final que se alcance. Para evitar los efectos adversos del choque frío se emplean velocidades de refrigeración moderadas y homogéneas que van de $-0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ a $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, las cuales descienden la temperatura del semen de 30°C a 5°C en periodos de tiempo de una a dos horas.¹⁶

2.2.5. Congelación del semen

Es la congelación de los espermatozoides a bajas temperaturas menores a los 0°C . Los espermatozoides actualmente pueden conservarse en nitrógeno líquido a una temperatura baja de -196°C y sobrevivir con fertilidad relativamente alta después de su descongelamiento, sin embargo muchos de los espermatozoides existentes mueren o se encuentran inmóviles por el efecto de la congelación y descongelación.⁸

2.2.6. Acrosoma

El acrosoma es un organelo membranoso de doble capa ubicado en la parte apical de la cabeza espermática, que contiene distintas enzimas hidrolíticas, como la hialuronidasa y la acrosina. La formación de este organelo, a partir del aparato de Golgi, es un proceso altamente sincronizado y bastante lento en comparación con la biogénesis de otras vesículas secretoras, en mamíferos, está asociada con la diferenciación de espermátidas durante la espermatogénesis.^{17, 18}

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación. En el acrosoma se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la zona acrosomal con su borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas, los mismos que tienden a romperse en el proceso de refrigeración, congelación y descongelamiento.⁹

2.2.7. Membrana espermática

Es la membrana que envuelve todo el espermatozoide y que lo protege del medio externo. Las membranas de los espermatozoides están compuestas principalmente por una cadena doble de fosfolípidos en la cual se localizan complejos proteicos distribuidos aleatoriamente. Cuando están inalterados, se encuentran en estado fluido, esencial para su función.⁹

2.2.8. Motilidad espermática

Se consideran espermatozoides móviles aquellos que aparecen activos y con movimiento, la motilidad individual es el porcentaje de espermatozoides móviles con respecto al total de espermatozoides visualizados.

Es una de las pruebas que se utiliza con mayor frecuencia para evaluar la calidad de semen diluido. En algunas especies, parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide. Si existe menos del 40% de espermatozoides con movimiento lineal progresivo, es menos probable que haya fertilidad.¹⁹

2.2.9. Integridad de membranas

Es el mantenimiento intacto de un conjunto de membranas, sin lesiones ni daño. La evaluación estructural del espermatozoide hace énfasis en la valoración de la integridad de su membrana plasmática, así como también la membrana acrosomal; pudiendo en algunos casos evaluarlas juntas o por separado mediante tinciones sencillas en microscopio óptico.²⁰

2.3. Bases teóricas

2.3.1. *Vicugna pacos* “alpaca”

Es la especie más pequeña de los camélidos domésticos y comparte muchas características morfológicas con la vicuña, teniendo un peso aproximado entre 55 y 65 kg. La fibra del cuerpo de la alpaca tiene hasta 50 cm de largo, con diámetro de 12 a 28 micrómetros, más resistente que la lana de oveja y con un alto costo en el mercado internacional.

La domesticación de este mamífero data de hace 6000 a 7000 años de antigüedad en los Andes peruanos, sugiriendo a la vicuña como ancestro de la alpaca, siendo esta especie finamente criada por la gran importancia económica de la fibra que produce. Para los Camélidos Sudamericanos, existen cuatro especies, siendo dos de ellas silvestres, el guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) y dos formas doméstica, la llama (*Lama glama*) y la alpaca (*Vicugna pacos*). El análisis combinado de variaciones cromosómicas y moleculares demostraron una alta similitud genética entre alpacas y vicuñas, así como entre llamas y guanacos.

Las cuatro especies poseen características comunes, como la presencia de glándulas metatarsianas, labio leporino, utilización de estercoleros o bosteaderos comunes, organización social polígama, ausencia de marcado dimorfismo sexual, ovulación inducida con la producción de una sola cría por parto o estación reproductiva. El análisis cromosómico de las cuatro especies, indica un valor de $2n=74$ para todas; encontrándose diferencias finas y consistentes en los brazos cortos del cromosoma 1, separando a los guanacos y llamas, de las vicuñas y alpacas.¹⁴

2.3.2. Fisiología reproductiva del macho

Las alpacas sólo producen una cría al año, con una gestación de 340 días en promedio y una duración de vida de entre 15 y 25 años. Durante la cópula de los Camélidos Sudamericanos, la postura, la duración de la misma y el patrón de eyaculación, son limitantes para el ámbito reproductivo con un interés internacional, siendo necesario implementar el uso de biotecnologías reproductivas en Camélidos Sudamericanos como la Inseminación Artificial para acelerar la propagación de animales genéticamente superiores, que son selectos por la riqueza de su fibra y carne.²¹

Para el análisis del eyaculado de cualquier mamífero, los parámetros a evaluar son: volumen, color, aspecto, pH, concentración de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides móviles y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.²²

La fisiología reproductiva de las alpacas difiere de la de otros animales domésticos y queda pobremente entendida, por ello se busca establecer tecnologías para el manejo y preservación de sus gametos. Poseen una estacionalidad reproductiva, incluyendo el apareamiento y el parto los cuales se producen durante los meses de diciembre a marzo, coincidiendo con los periodos de lluvias abundantes y presencia de forraje.²³

Las técnicas de reproducción asistida como la criopreservación de gametos y embriones son una herramienta clave para el manejo sostenible y estudio a nivel molecular del comportamiento de éstas células, con la finalidad de la producción, manejo y mejoramiento de esta especie. En los últimos años se han venido realizando trabajos sobre el manejo de semen para su preservación, pero las características que presenta este tipo de muestra son muy desalentadoras, ya que la técnica de extracción seminal no ha sido estandarizada y sólo se obtienen eyaculados con bajo volumen, alta viscosidad y una baja concentración de espermatozoides. Una alternativa que se ha presentado es el uso de espermatozoides del epidídimo ya que estos espermatozoides se encuentran en un nivel de maduración notable y su manejo en el laboratorio es muy satisfactorio. El uso de estos espermatozoides es principalmente para establecer un protocolo de preservación que sea manejable y el cual permita la obtención de espermatozoides post descongelamiento que presenten una alta tasa de fecundación.²³

El espermatozoide de los mamíferos consta de tres regiones; cabeza, cuello y flagelo en el cual se encuentran la pieza intermedia, pieza principal y pieza

terminal. Desde el punto de vista funcional, es un transportador de la información genética. Por ello, debemos destacar la presencia de un núcleo muy condensado, una membrana plasmática muy sensible a los cambios térmicos y osmóticos.²⁴

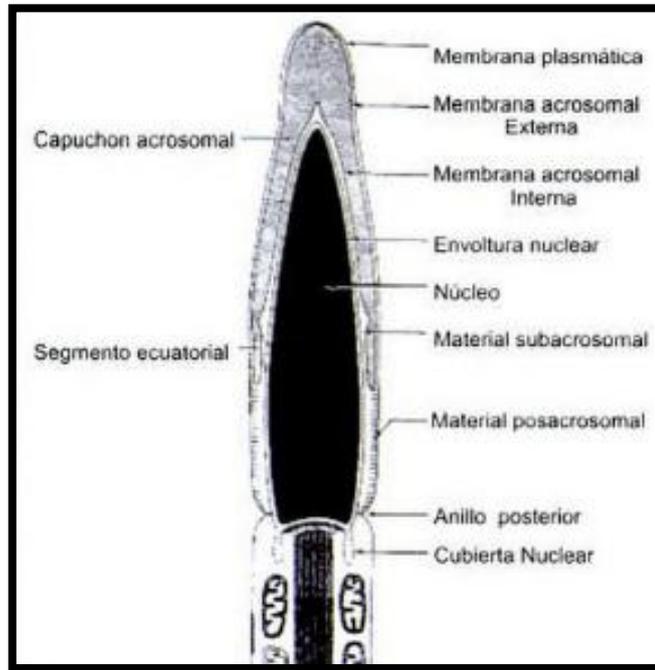


Figura 1. Partes del acrosoma del espermatozoide de mamífero.²⁵

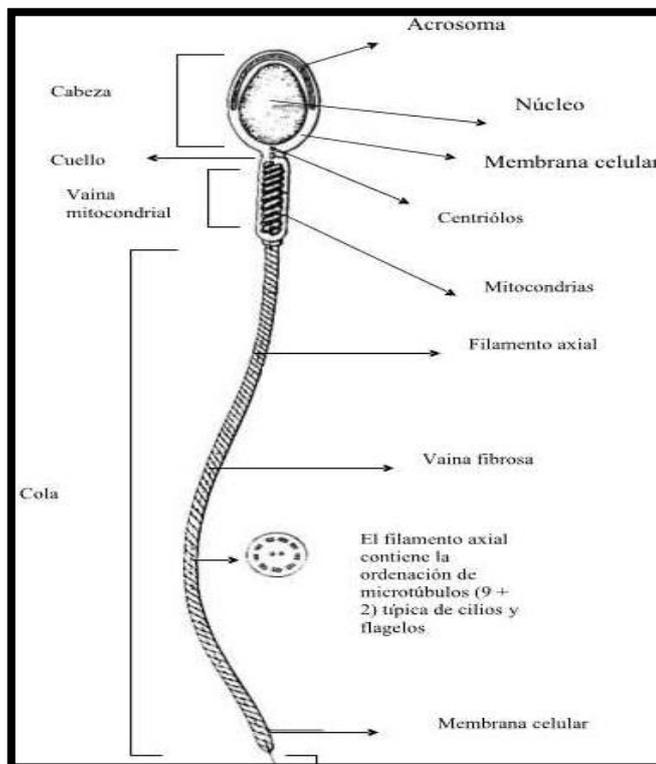


Figura 2. Estructura y membrana plasmática del espermatozoide de mamífero.²⁶

2.3.3. Características seminales

a) Volumen

Varía según el estado fisiológico del macho, edad, raza, alimentación, frecuencia de colección y preparación psicosexual, existe una variabilidad de volumen de eyaculado entre individuos y aun en un mismo individuo entre una colección y otra. Los valores más frecuentemente encontrados en semen colectado de alpaca oscilan entre 1 a 4 ml y excepcionalmente se ha reportado 12 ml, los valores de volumen disminuyen en eyaculaciones sucesivas y también está dado por el intervalo entre estas.⁸

b) Concentración

La concentración espermática está definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen, expresada normalmente en millones por ml de eyaculado (esp/ml). Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la rapidez y exactitud. Son varios los métodos que permiten determinar la concentración espermática. Entre ellos, figuran el recuento de la cámara de Neubauer y el método del fotocolorímetro. Ambos métodos son precisos y, si bien el fotocolorímetro permite un recuento más rápido, su costo es más elevado que la cámara de Neubauer.¹⁹

La concentración espermática de la alpaca es muy variable, posiblemente debido a diferencias individuales y de método de colección.²⁷

c) Motilidad individual

La motilidad total en camélidos no está presente como en el caso de los carneros, en camélidos es mejor referirse como motilidad individual y oscilatoria, con movimiento lento que en parte es debido a la viscosidad del semen.²⁸

La menor motilidad después del proceso de refrigeración y congelación de los espermatozoides se debe probablemente a que este proceso produce cambios en la morfología espermática incluyendo daños en la mitocondrias, el acrosoma y cola del espermatozoide.²⁹

2.3.4. Integridad del acrosoma

La evaluación de este componente espermático resulta esencial al considerar que participa del proceso de fecundación de ovocitos. Esta valoración toma mayor relevancia en espermatozoides criopreservados cuya mayor permeabilidad al calcio, inducida por las bajas temperaturas, posibilitan reacciones capacitantes anticipadas que menguarían el potencial fecundante del espermatozoide.⁸

La integridad de las membranas plasmática y acrosomal es de gran importancia para la funcionalidad de los espermatozoides. Esto cobra especial relevancia teniendo en cuenta que luego de la refrigeración y del congelamiento profundo se ha observado que los espermatozoides de varias especies evidencian cambios similares a los de la capacitación, efecto que se ha llamado “criocapacitación”.⁸

Son diversas las técnicas que se han desarrollado con el objetivo de valorar la situación del acrosoma y la pérdida del mismo, una de ellas es la técnica de triple tinción que basa su metodología en la tinción de los espermatozoides haciendo uso de los colorantes, rosa de bengala, azul tripán y pardo Bismark.³⁰

La reactividad de la membrana acrosomal representa un requisito absoluto para la fertilización y sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del oocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con este para formar un embrión. Asimismo ya se había demostrado en espermatozoides de ratón que sólo aquellos con acrosoma intacto pueden unirse a la membrana pelúcida. No obstante, algunas células espermáticas pueden sufrir la reacción acrosomal de manera espontánea, existiendo diversas experiencias que muestran la necesidad de moléculas específicas asociadas con el ovocito en la inducción de la reacción espontánea.³

Idealmente, el método para determinar el estado acrosomal debe ser exacto, rápido e inocuo para la función espermática; asimismo, debe poder emplearse en distintos medios y fluidos, y ser capaz de diferenciar reacciones acrosómicas falsas, que están asociadas a la muerte de la célula, con reacciones verdaderas, asociadas a la fecundación.³

Una metodología muy eficaz fue utilizando la tinción azul tripán, rojo neutro y solución Giemsa.³¹

En llamas, utilizaron la técnica de triple tinción (azul tripán, rojo neutro - ácido clorhídrico y Giemsa) como una técnica confiable para determinar la presencia acrosomal.⁷

En la llama se ha utilizado la tinción azul de Coomassie para evaluar la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal.³²

Por el contrario, la citometría de flujo permite una evaluación más segura y no es dependiente del laboratorista sino del software de análisis del citómetro, permitiendo la evaluación de mayor número de eventos, generalmente en un

rango de 8000 - 20000 espermatozoides, en comparación con los 200 espermatozoides que se observa generalmente en los análisis con microscopía, dado que es un conteo automatizado, objetivo y rápido de un flujo celular mediante la detección de intensidades de fluorescencia.³³

También se encontró un protocolo que hace referencia al uso del colorante fluorescente yoduro propidio en asociación con leptina *Pisum Sativum* (PSA). Todos ellos permiten diferenciar espermatozoides con acrosoma intacto y aquellos con acrosoma dañado.³⁴

2.3.5. Integridad de la membrana espermática

Todo el espermatozoide está contenido en la membrana plasmática, la cual se ensancha en áreas especializadas y forma el componente más externo del espermatozoide. Permanece intacta, excepto en la región del acrosoma previo a la fertilización o como resultado de la muerte del espermatozoide.

Estructuralmente se compone de tres capas o zonas: bicapa lipídica, interfase fosfolípidos - agua y glicocálix. La bicapa lipídica esta subdividida en fosfolípidos polares, que se orientan de tal forma que los grupos de cabezas polares hidrofílicas están situadas externamente y las cadenas de ácidos grasos orientadas internamente unas a otras. La mayoría de los lípidos presentes son fosfolípidos y colesterol, la cantidad de colesterol relativo al fosfolípido determina la fluidez de la membrana. En general mientras más alta la concentración relativa de los fosfolípidos, más fluida es la membrana. El colesterol, por lo tanto, actúa junto con proteínas integrales, como un estabilizador asegurando una configuración laminar de los fosfolípidos y de la bicapa. Es sabido que la concentración de colesterol varía entre las zonas de la membrana plasmática, siendo más alta en la región del acrosoma.

El glicocálix es una capa externa de polisacáridos del espermatozoide de alpaca. Su función exacta no es clara, pero se piensa que está involucrado en antigenicidad, adherencia celular y permeabilidad específica. Es sabido que dentro del glycocalix existen uniones para proteínas periféricas. Estas proteínas son provenientes del plasma seminal y actúan estabilizando al espermatozoide durante su paso por el tracto masculino y femenino.³⁴

La integridad de la membrana espermática es un pre-requisito fundamental para el apropiado metabolismo y funciones espermáticas como la unión a la zona pelúcida, penetración y la fusión con el oolemma durante la fecundación. El grado de lesión de las membranas plasmática y acrosomal está relacionado con

la fertilidad de la muestra procesada, pero solamente en los casos en que el daño sea extenso.³⁵

La integridad de esta membrana es el requerimiento mínimo para que el espermatozoide sea móvil. El espermatozoide con la membrana plasmática afectada no es capaz de mantener las concentraciones citoplasmáticas de iones y de cofactores esenciales como el nucleótido adenina, imprescindible para el movimiento flagelar. Es posible que algunas células inmóviles puedan aparentemente mantener algún grado de integridad de la membrana por lo cual, son todavía capaces de excluir los marcadores que indican la muerte celular pese a que otras alteraciones hacen que este inmóvil.³⁶

Las técnicas de valoración de la integridad de la membrana plasmática son conocidas como recuentos de viabilidad y para ellas se necesitan combinaciones de colorantes como eosina/nigrosina/Giemsa, Hoescht 33342/Ioduro de Propidio y SYBR-14/Ioduro de Propidio y la prueba de endósmosis (hipoosmótica – HOST).³⁷

2.3.6. Refrigeración del semen

La refrigeración a 4 o 5°C permite preservar el semen por algunas horas en tanto que la congelación podría preservar los espermatozoides por muchos años.³⁸

El objeto de refrigerar el semen es el de reducir el metabolismo energético de los espermatozoides, prolongando así su viabilidad y capacidad fecundante en el tiempo. El semen de mamífero, es sensible al enfriamiento rápido (*shock* frío), traducándose en un aumento del número de espermatozoides muertos, alteración de la distribución de lípidos de membrana y aumento del calcio intracelular.³⁹

Para la conservación *in vitro* de semen, hay que dar importancia especial a la forma que se efectúa el enfriamiento, el cual debe ser muy lento. El enfriamiento a 15°C y 5°C se debe realizar en un lapso de 1 a 1,5 h y de 2 a 3 h, respectivamente. El método mayormente utilizado para conservar semen en forma líquida por períodos de tiempo mayores a 24 h es mediante la reducción progresiva de la temperatura. La motilidad se detiene totalmente a los 5°C, pero se puede restituir si se eleva nuevamente la temperatura a los niveles normales, siempre y cuando no se hayan producido daños de tipo estructural causados por shock térmico. Las células deben ser protegidas contra las bajas temperaturas mediante la adición de compuestos orgánicos como la leche descremada o la yema de huevo que aumentan la resistencia de la membrana a los cambios de

permeabilidad e impiden que los espermatozoides acumulen calcio al alterarse el sistema de intercambio iónico de la membrana.¹⁹

La conservación del semen a 5°C también puede acarrear consecuencias perjudiciales como la disminución del 40% de la actividad metabólica del Na⁺/K⁺ intracelular, lo cual provoca una marcada disfunción en el paso de algunos iones a través de la membrana celular, ocasionando una disminución en la sobrevivencia del espermatozoide.¹⁹

2.3.6.1. Efecto de la refrigeración en el acrosoma

Los espermatozoides experimentan daños a nivel de la membrana plasmática y también a nivel del acrosoma durante el proceso mismo de la refrigeración.

El acrosoma es una vesícula de secreción que se encuentra en la cabeza del espermatozoide y contiene numerosas enzimas hidrolíticas. Este organelo tiende a romperse en el proceso de refrigeración y calentamiento teniendo por consecuencia que el espermatozoide pierde su capacidad fecundante. Los espermatozoides sometidos a algún proceso de preservación en el tiempo, como la refrigeración y el congelamiento, penetran en los ovocitos en un tiempo menor.⁴⁰

A 5°C la permeabilidad al calcio crece significativamente superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de calcio. Así el calcio se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos. Es posible que el acrosoma sufra más daño, con estas alteraciones, una pérdida mayor de capacidad fecundante.⁹

La reacción acrosómica es específica, e implica la existencia de moléculas para el reconocimiento entre los gametos masculino y femenino y generar la repuesta fisiológica adecuada. Hay fusión de membranas plasmática y acrosomal externa en varios sitios, formando vesículas que se desprenden, quedando la membrana acrosomal interna ahora como nueva membrana de superficie. Las vesículas liberan su contenido a medida que el espermatozoide penetra a través de la zona pelúcida.⁴¹ Sin embargo esta valoración toma mayor relevancia en espermatozoides criopreservados cuya mayor permeabilidad al calcio, inducida por las bajas temperaturas, posibilitan reacciones capacitantes anticipadas que menguarían el potencial fecundante del espermatozoide.⁸

Trabajos realizados en la fertilización *in vitro* indican que la reacción acrosómica puede ser inducida empleando diferentes sustancias como heparina, ionóforo de calcio, fluido sintético de oviducto, proteína ZP3, estradiol, agentes fusogénicos y progesterona.⁴²

En resumen, para que se dé la reacción acrosómica es necesario que el espermatozoide sufra la debida capacitación espermática acompañada de la hiperactividad, aumento de calcio intracelular, disminución del contenido de colesterol, activación de las enzimas hidrolíticas generada por el aumento de pH intra-acrosomal, así como los procesamientos de refrigeración o congelación.⁴²

2.3.6.2. Efecto de la refrigeración en la membrana espermática

El proceso de refrigeración provoca un cambio estructural en la membrana plasmática del espermatozoide parecido a lo que sucede durante la capacitación, independientemente del diluyente, tasa de dilución, temperatura o condiciones de almacenaje; el deterioro del espermatozoide se debe al incremento en el tiempo de almacenaje y la reducción de su capacidad para controlar la entrada de iones calcio. Esto último está asociado con la capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica. En caso de los espermatozoides de mamíferos, existe una distribución desigual de proteínas del citoesqueleto asociadas a la membrana, por lo que son más sensibles a los cambios de temperatura por refrigeración.¹⁹

Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas. Cuando la membrana plasmática es afectada por el frío puede sufrir modificaciones en su permeabilidad, que resultan en alteraciones de las funciones metabólicas, perjudicando la motilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides. Para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, motiles y poseer las membranas plasmáticas y acrosomal intactas y funcionales.⁹

2.3.7. Congelación del semen

A fin de aprovechar muchas de las ventajas potenciales de la Inseminación Artificial (IA), el almacenamiento a largo plazo de semen es necesario. Esto sólo es posible mediante la congelación de un sistema que detiene los procesos metabólicos de los espermatozoides, lo que permite el almacenamiento indefinido sin una pérdida significativa de la fertilidad.⁹

El éxito de la crioconservación depende de muchos otros factores, como las interacciones entre crioprotector, tipo de diluyente, velocidad de enfriamiento, velocidad de descongelación y embalajes, así como la variación individual del animal. Una cierta pérdida de la viabilidad de los espermatozoides es inevitable debido a los procedimientos antes de la congelación, así como durante el proceso de congelación real.⁹

Los informes de investigación sobre el éxito de utilizar semen criopreservado varían significativamente, a menudo son afectados por el método experimental, que no es estandarizado en muchas investigaciones reproductivas. Información sobre la tasa de preñez a una sola inseminación, el momento de la inseminación, el número de espermatozoides inseminados, volumen de la inseminación, el momento de la inseminación, el número de espermatozoides inseminados, volumen a inseminar o el tipo de diluyente utilizado todavía están incompletos.⁹

Independientemente de todas estas consideraciones, la criopreservación para ser considerada exitosa debe permitir al espermatozoide conservar su capacidad de fertilización después de la descongelación. Para lograr esto debería retener su capacidad para producir energía a través del metabolismo; para mantener la configuración de la membrana plasmática normal y la integridad, conservar su motilidad y enzimas, tales como acrosina, dentro del acrosoma para permitir la penetración de los óvulos. La alteración de cualquiera de estas funciones o habilidades afectará significativamente la capacidad de los espermatozoides para lograr la fertilización. El mayor riesgo para el mantenimiento de estos atributos se presenta por la formación de cristales de hielo y el movimiento resultante de agua de hasta gradientes osmóticos durante el proceso de criopreservación.⁹

Durante el proceso de congelación, varios cambios biofísicos son evidentes dentro de la muestra de semen. A medida que la temperatura cae por debajo de la congelación, la muestra sufre un sobre enfriamiento, como la temperatura desciende más allá del sobre enfriamiento, se empiezan a formar cristales de hielo extracelular. Esta formación de hielo aumenta la concentración de solutos, tales como azúcares, sales y proteínas. En respuesta a este gradiente de presión osmótica de nuevo desarrollo y el hecho de que el agua dentro del espermatozoide es más lento para formar cristales de hielo comparado con el agua en el medio que se encuentra, el agua pasa hacia fuera de los espermatozoides, en particular del espermatozoide se vuelve cada vez deshidratado. La tasa de agua de los espermatozoides también depende de la velocidad de descenso de la temperatura, tanto mayor será el tiempo necesario para el flujo de salida de agua, y por lo tanto una mayor deshidratación. Esto reduce la probabilidad de la formación de cristales de hielo dentro del espermatozoide que podría causar considerable daño físico.⁹

Sin embargo, la criopreservación, tiene como objetivo lograr una velocidad de enfriamiento óptimo que proporcionará un compromiso entre estos factores.

Hay dos rangos principales de temperatura motivo de preocupación con respecto al daño que sufren los espermatozoides durante la congelación; el período de sobreenfriamiento (0-5 ° C) y la formación de cristales de hielo (6 °C a -15 °C).⁹

2.3.7.1. Efecto de la congelación en el acrosoma

Durante el proceso de criopreservación se incrementa la capacitación espermática en comparación con espermatozoides de semen fresco. En ovinos, el porcentaje de espermatozoides capacitados en el semen fresco varía entre 5 a 20%, mientras que en espermatozoides descongelados el porcentaje de capacitación puede llegar hasta 90%, aunque varía entre 40 a 60%. Esta capacitación da lugar a la reacción acrosómica o pérdida del acrosoma.⁹

Un efecto notorio que ocurre durante la criopreservación es que se produce un elevado nivel de calcio intracelular, evento que asemeja a lo que ocurre durante un proceso de capacitación normal, donde se produce una hiperactividad y reacción del acrosoma inducida por la zona pelúcida y que es un evento normal durante el proceso de fertilización.²³

La presencia del acrosoma es importante en el proceso de la fertilización y ha sido altamente relacionado con la fertilidad de espermatozoides criopreservados de bovino, en espermatozoides de búfalo se encontró un porcentaje menor de espermatozoides con acrosoma intacto luego del proceso de criopreservación.

En el acrosoma se puede distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la zona acrosomal con su borde apical, la zona post-acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas, los mismos que tienden a romperse en el proceso de congelación y descongelamiento. Muestras seminales con alta proporción de alteraciones acrosomales suelen tener una fertilidad baja.

Al producirse daño y desestabilización a nivel del acrosoma ocurre consecuentemente la liberación del contenido enzimático acrosomal, enzimas como la hialuronidasa y la acrosina.²³

2.3.7.2. Efecto de la congelación sobre la membrana plasmática

La membrana plasmática es el primer sitio dañado por la criopreservación, principalmente la membrana plasmática sobre la pieza principal, pieza media, y cabeza, con la membrana de la cabeza siendo inevitablemente dañada.²³

Las lesiones producidas por el congelamiento de las membranas antes y durante el congelamiento sólo se invierten parcialmente después del descongelamiento. Las proteínas integrales de la membrana son agrupadas por la separación de la fase lipídica, y esto puede alterar su función, especialmente la función de las proteínas de canales iónicos. Es por eso que la permeabilidad de la membrana

aumenta después del congelamiento. La regulación de calcio es claramente afectada y altera la función celular. En casos severos, es incompatible con la viabilidad celular. Como ya se mencionó anteriormente el estrés osmótico y la formación de hielo intracelular producen una disminución de la viabilidad espermática.⁹

Las membranas de los espermatozoides están compuestas principalmente por una cadena doble de fosfolípidos en la cual se localizan complejos proteicos distribuidos aleatoriamente. Cuando están inalterados, se encuentran en estado fluido, esencial para su función. Con el enfriamiento los lípidos sufren una transición a la fase líquida cristalina y posteriormente a una de gel. Una vez que se encuentran en estado de gel, los lípidos tienden a agregarse, formando microdominios en áreas aun fluidas. Estos lípidos agregados no se integran comúnmente con las proteínas asociadas con otros lípidos. Los bordes de estos microdominios se convierten en áreas más frágiles sujetas a la fusión o ruptura además de volverse más permeables a los iones. Cuando los espermatozoides están alterados los iones Na^+ y Ca^{++} que entran a las células espermáticas son retirados por medio de transporte activo.⁹

Las proteínas intracelulares también se ven afectadas por la criopreservación. Es decir que tanto las proteínas involucradas en el transporte de sustancias a través de la membrana; como las funciones enzimáticas, reducen su actividad a bajas temperaturas.⁹

2.3.7.3. Descongelación de semen criopreservado

La descongelación rápida minimiza esencialmente los daños por descongelación, ya que se reduce al mínimo la cristalización del agua exterior, lo que podría lesionar la membrana. Un problema potencial de la descongelación lenta son las alteraciones osmóticas, ocasionadas por el ingreso de agua en las células, que se considera superior frente a la salida de agua en la congelación. En la descongelación los espermatozoides están expuestos realmente a un considerable gradiente osmótico que se origina al disminuir la concentración salina del medio circundante. Durante la descongelación lenta, las células están expuestas más tiempo a un continuado estrés hipoosmótico, sin que la reducción compensadora del volumen que esto lleva consigo pueda provocar una reducción del volumen celular. En términos generales los espermatozoides descongelados a temperaturas elevadas originan resultados superiores. Sin embargo, en un estudio de campo no se pudo evidenciar diferencias entre descongelaciones practicadas a 35°C y temperatura ambiente.⁸

En la utilización del semen criopreservado, la fase de descongelamiento es tan importante para la sobrevivencia de los espermatozoides como el proceso de congelamiento, los espermatozoides que sobreviven a temperaturas de -196°C son sometidos al calentamiento y atraviesan nuevamente la zona crítica de -15°C a -60°C. La descongelación del semen a 37°C es más adecuada en condiciones prácticas por excluir el riesgo de súper calentamiento.⁴³

2.3.8. Evaluación de la integridad del acrosoma y membrana espermática

a) Tinción compuesta azul de tripán, rojo neutro y solución de Giemsa

Esta tinción de campo claro permite determinar el estado acrosomal y la viabilidad espermática simultáneamente.

En Camélidos Sudamericanos se han podido identificar cuatro patrones utilizando la triple tinción. Este protocolo determina cuatro categorías de espermatozoides al ser observados bajo microscopio:

- Espermatozoide vivo con acrosoma, se observa la zona acrosomal fucsia y la zona post acrosomal blanquecina.
- Espermatozoide vivo sin acrosoma, se observa la zona acrosomal rosa pálido y la zona post acrosomal blanquecina.
- Espermatozoide muerto con acrosoma, se observa la zona acrosomal fucsia y la zona post acrosomal azul oscuro.
- Espermatozoide muerto sin acrosoma, se observa la zona acrosomal rosa pálido y la zona post acrosomal azul oscuro.⁷

	Espermatozoide vivo con acrosoma intacto "VAI"	Espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado "VAD"	Espermatozoide muerto con acrosoma intacto "MAI"	Espermatozoide muerto con reacción del acrosoma "MAD"
Acrosoma	Color azul-violeta	Translucido	Color azul-violeta	Translucido
Región post acrosomal	Translucido, ligeramente coloreado	Translucido, ligeramente coloreado	Azul oscuro – azul violeta	Azul oscuro – azul violeta
Imagen				
Tipo	I	II	III	IV

Figura 3. Características de la muestra espermática sometida al proceso de Tinción Triple con Azul Tripán, Rojo Neutro y solución Giemsa.⁴⁴

b) Tinción de Hoechst 33342/Ioduro de propidio

Para el examen de la integridad de la membrana plasmática se utiliza una doble tinción fluorescente con Hoechst 33342/PI o SYBR14/PI.

El colorante Hoechst 33342 penetra las membranas plasmáticas y se adhiere específicamente al DNA. Todos los espermatozoides son marcados de azul. El colorante PI (Ioduro de Propidio) sólo penetra las membranas dañadas. Se sobrepone al colorante azul Hoechst. Los espermatozoides con membranas dañadas se tiñen de color rojo/ violeta. Sobre esta base, AndroVision® determina el porcentaje de espermatozoides con membranas defectuosas o intactas. Para el examen de integridad de acrosomas se utiliza una doble tinción de fluorescencia con H33342/FITC-PNA. Todos los espermatozoides son teñidos de azul (H33342). Acrosomas dañados de estas células se tiñen de verde (FITC-PNA).⁴⁵

Uno de los fluorocromos más utilizados para identificar células muertas es el ioduro de propidio. Este compuesto entra en los espermatozoides con la membrana plasmática dañada, se une al núcleo y, al ser excitado por la longitud de onda apropiada (510-560 nm), emite fluorescencia roja. Además del ioduro de propidio, existen otros marcadores fluorescentes específicos para células muertas cuyo mecanismo de acción es similar, como por ejemplo, el Hoechst 33258.⁴⁶

Un fluorocromo con un mecanismo de acción similar al del SYBR-14, capaz de identificar espermatozoides vivos, es el Hoechst 33342. Este compuesto también entra en células vivas y se une al ADN espermático, sin embargo, su uso está limitado por la longitud de onda de su espectro de excitación, que está en el rango UV. La mayoría de los citómetros disponen de un láser con una longitud de onda de 488 nm, y para evaluar las muestras marcadas con Hoechst 33342, es preciso disponer de un láser de menor longitud de onda.⁴⁶

La aparición de color azul en la cabeza de los espermatozoides indica que la membrana plasmática se encuentra intacta. Este color está dado por el fluorocromo Hoechst 33342. El daño en la membrana plasmática se observa como una fluorescencia de color rojo dada por el Ioduro de Propidio (IP).⁵

2.3.9. AndroVision sistema CASA (Análisis de Esperma Asistido por Computadora)

AndroVision® es un Sistema CASA de alta precisión para el análisis estandarizado e interactivo de semen. AndroVision® no sólo ofrece el análisis

automático clásico de motilidad, concentración y morfología, sino también diversas opciones de análisis de la funcionalidad espermática basados en tinción de fluorescencia. El módulo básico con PC y accesorios se complementa con módulos opcionales de software.

AndroVision® se puede combinar con una serie de microscopios, preferiblemente; Zeiss AxioLab y AxioScope. Cada microscopio necesita objetivo negativo de contraste de fase y mesa calefactada. Para los módulos de viabilidad, integridad de acrosoma, actividad mitocondrial e integridad de DNA se necesita un equipo de fluorescencia. Las muestras teñidas con los colorantes específicos de fluorescencia emiten luz de una longitud de onda o de un color específico. Los colorantes tiñen estructuras específicas del espermatozoide, dependiendo de la integridad y el estado funcional de las mismas. Los diferentes colores son detectados y evaluados por el software AndroVision®. Debido a la rapidez del análisis, pueden evaluarse cientos de espermatozoides en muy corto tiempo. Puede evaluarse tinciones fluorescentes para determinar la viabilidad, integridad de acrosomas, actividad mitocondrial e integridad del DNA espermático.⁴⁵

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

El estudio se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán - INIA, Ayacucho.

3.1.1. Ubicación política

Región : Ayacucho
Provincia : Huamanga
Distrito : Andrés Avelino Cáceres Dorregaray
Lugar : Estación Experimental Agraria Canaán-INIA

3.1.2. Ubicación geográfica

La Estación Experimental Agraria Canaán-INIA, se encuentra ubicada en la Av. Abancay, a 15 min de la Plaza Mayor de Huamanga. Se encuentra ubicada al sureste de la capital de la provincia Huamanga, región Ayacucho.

Latitud Sur : 13°09'48" S.

Longitud Oeste : 74°12'20" W.

Altitud : 2736 msnm.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

La población de estudio comprendió todos los espermatozoides presentes en los eyaculados de semen colectados por vagina artificial a partir de cinco alpacas macho de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA-Ayacucho.

3.2.2. Muestra

La muestra estuvo constituida por 45 muestras de 10 µl de semen para la evaluación de integridad del acrosoma y membrana espermática respectivamente, colectados por vagina artificial a partir de cinco alpacas macho de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA- Ayacucho.

3.2.3. Sistema de muestreo

El sistema de muestreo fue aleatorio.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Armado de la vagina artificial

- En un tubo de PVC se introdujo por su interior un jebe de látex y se dobló en uno los extremos.
- Luego la bolsa cortada de polietileno fijada al tubo Falcon se unió al extremo del látex doblado.
- Seguidamente se amarró con jebe la parte de abajo, para evitar que pueda salir el agua.
- Se jaló el látex en el extremo superior, luego se agregó agua de 46 a 50°C. Se procedió nuevamente a jalar el látex para después amarrar con la cinta de jebe.
- Luego se colocó presión de aire por el pitón, para inflar y dar un ligero ajuste en el interior de la vagina.
- Se colocó la tapa protectora al tubo Falcon para mantener la temperatura y así los espermatozoides recolectados puedan sobrevivir.
- Se envolvió la vagina armada con una bolsa de plástico que contenía agua caliente a 52°C y se cubrió con una frazadilla y franela exteriormente para mantener la temperatura.⁴⁷

3.3.2. Recolección de semen

- La vagina artificial armada se llevó al lugar de recolección y se procedió a limpiar la zona del periné del maniquí, se adicionó gel para facilitar la entrada de la vagina artificial, se colocó la vagina armada al maniquí, siempre manteniendo la temperatura controlada con un termómetro.
- Luego se procedió a la monta y cópula de los machos seleccionados controlando el tiempo y la efectividad de la eyaculación.
- Una vez que el macho ha penetrado, se tomó el tiempo de cópula de 15 a 40 min, luego se retiró la vagina del maniquí e inmediatamente se llevó al laboratorio para su análisis macroscópico y microscópico.

3.3.3. Evaluación de las características seminales

- Después de la recolección de semen el tubo con la muestra se colocó inmediatamente en baño María a 37°C.
- Se midió el volumen de semen en el mismo tubo Falcon recolector, solo tomando en cuenta el volumen lechoso del semen.

- Seguidamente se evaluó la concentración espermática en cámaras de recuento para su análisis en el AndroVision sistema casa con un aumento de 40X.
- Luego se evaluó la vitalidad, se usó la solución de eosina al 5% y de nigrosina al 10% en mezcla.
- Se tomó con una micropipeta 10 μ l de semen, se colocó en lámina portaobjeto y seguidamente se agregó una gota del colorante mezclado, ambos se mezclaron y posteriormente se realizó el frotis espermático.
- Se dejó secar por 2 h luego se observó al microscopio óptico de campo claro 40X o 100X con aceite de inmersión.
- Se contó 200 espermatozoides por cada portaobjetos, se observaron espermatozoides muertos de color rojo o violeta y los vivos color transparentes.

3.3.4. Evaluación de la motilidad individual

- Se evaluó en semen fresco, refrigerado y congelado, para ello con una micropipeta se tomó 10 μ l de semen y se colocó en portaobjetos.
- Luego se observó al microscopio óptico de campo claro a 40X, la motilidad se analizó con valores de porcentaje de 0 a 100% de acuerdo a su movilidad.

3.3.5. Preparación del dilutor Andromed

- Se preparó el diluyente Andromed en un tubo Falcon y se atemperó en baño María a 37°C por 5 min.
- Se usó una proporción 4:1, 4 ml de agua ultra pura o bidestilada y 1 ml de Andromed, se mezcló siempre añadir el agua al Andromed.
- Se procedió a realizar la dilución de un solo paso para la evaluación en semen fresco, refrigerado y congelado, dicha dilución se hizo en una proporción de 1:1 de la muestra del semen y diluyente Andromed.⁴⁷

3.3.6. Evaluación de integridad del acrosoma

- Las muestras de semen recogidas se colocaron en el baño María de agua ajustado a 37°C, seguidamente los portaobjetos se calentaron en platina térmica a 37°C.
- De las muestras diluidas con dilutor Andromed se tomó 10 μ l de semen y se colocó en un portaobjeto luego se agregó 10 μ l de azul tripán al 0,2% (preparado a partir de azul tripán al 0,4% SIGMA T-8154 diluido con NaCl al 0,9% en proporción 1:1).

- Se mezclaron en portaobjetos usando una micropipeta, luego se realizó el frotis sobre toda la superficie usando otro portaobjetos, ambos se mantuvieron paralelos el uno al otro en ángulo de 45°.
- Los portaobjetos se secaron al aire a temperatura ambiente por 3 minutos en una posición casi vertical.
- Luego se fijaron en una solución de rojo neutro al 0,2% (Sigma N 2889) durante 5 min.
- Después se enjuagó tres veces con agua destilada y se dejó escurrir por 2 min en una posición casi vertical.
- Luego los portaobjetos se tiñeron en Giemsa al 7,5% en (V/V) preparado de la solución madre añadiendo agua destilada para la dilución.
- Los portaobjetos con Giemsa se dejaron secar durante 24 h.
- Se enjuagó cuatro veces con agua destilada.
- Luego se mantuvieron durante 2 min en cubeta Coplin con agua destilada para la mejor diferenciación.
- Se realizó la evaluación usando objetivo de 100X en aceite de inmersión
- La evaluación se realizó para espermatozoides vivos con acrosoma intacto en semen fresco, refrigerado y congelado contando 100 células en todo el portaobjeto.
- El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI) se obtiene de la siguiente fórmula. ⁴⁴

$$\% \text{ Spz VAI} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides tipo I}}{\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides I, II, III, IV}} \times 100$$

- Tipo I : Espermatozoide vivo con acrosoma.
- Tipo II : Espermatozoide vivo sin acrosoma.
- Tipo III : Espermatozoide muerto con acrosoma.
- Tipo IV : Espermatozoide muerto sin acrosoma.

Tabla 1. Distribución de las unidades experimentales para la variable integridad del acrosoma según su tratamiento representadas en el diseño en bloque completamente aleatorizado.

Bloque	Tratamientos		
Macho 643	t_1	t_2	t_3
	t_1	t_2	t_3
	$\overline{T_1}$	$\overline{T_2}$	$\overline{T_3}$
Macho 9210	t_3	t_1	t_2
	t_3	t_1	t_2
	$\overline{T_3}$	$\overline{T_1}$	$\overline{T_2}$
Macho 12006	t_1	t_3	t_2
	t_1	t_3	t_2
	$\overline{T_1}$	$\overline{T_3}$	$\overline{T_2}$
Macho 13022	t_3	t_2	t_1
	t_3	t_2	t_1
	$\overline{T_3}$	$\overline{T_2}$	$\overline{T_1}$
Macho S/A	t_3	t_1	t_2
	t_3	t_1	t_2
	$\overline{T_3}$	$\overline{T_1}$	$\overline{T_2}$

3.3.7. Evaluación de integridad de membrana espermática

- Primeramente se atemperaron las muestras de semen de alpaca a 37°C en la platina térmica.
- Se usó la cantidad de un tubo color café con 250 µl Hoechst 33342/PI.
- Se agregó 1,5 µl de la mezcla colorante de Hoechst 33342/PI para 10 µl de la muestra de semen precalentada.
- El semen con el colorante se mezcló en un tubo Eppendorf.
- El tubo Eppendorf se envolvió con papel aluminio para proteger la muestra de la luz.
- Luego se llevó a incubar por 15 min a 37°C.
- Se colocó una gota sobre portaobjetos y cubrió con cubreobjetos.
- Se entró al sistema AndroVision CASA luego en “análisis avanzado” después modulo “viabilidad”.
- Se observó a 20X de aumento en AndroVision (Sistema CASA), los espermatozoides con membrana dañada se tiñeron de color rojo o rosado y los espermatozoides membrana intacta se tiñeron de color azul.

- El análisis de integridad de membrana se realizó en semen fresco, refrigerado y congelado.
- El recuento de espermatozoides viables con integridad de membrana se realizó en cinco campos, para sacar el porcentaje de los espermatozoides viables se aplicó la siguiente fórmula.⁴⁵

$$\% \text{ Spz con IM} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Spz con membrana intacta en 5 campos}}{\text{N}^\circ \text{ total de Spz en 5 campos}} \times 100$$

Tabla 2. Distribución de las unidades experimentales para la variable integridad de membrana espermática según su tratamiento representadas en el diseño en bloque completamente aleatorizado.

Bloque	Tratamientos		
Macho 643	t ₁	t ₂	t ₃
	t ₁	t ₂	t ₃
	t ₁	t ₂	t ₃
	$\overline{T_1}$	$\overline{T_2}$	$\overline{T_3}$
Macho 9210	t ₃	t ₁	t ₂
	t ₃	t ₁	t ₂
	t ₃	t ₁	t ₂
	$\overline{T_3}$	$\overline{T_1}$	$\overline{T_2}$
Macho 12006	t ₁	t ₃	t ₂
	t ₁	t ₃	t ₂
	t ₁	t ₃	t ₂
	$\overline{T_1}$	$\overline{T_3}$	$\overline{T_2}$
Macho 13022	t ₃	t ₂	t ₁
	t ₃	t ₂	t ₁
	t ₃	t ₂	t ₁
	$\overline{T_3}$	$\overline{T_2}$	$\overline{T_1}$
Macho S/A	t ₃	t ₁	t ₂
	t ₃	t ₁	t ₂
	t ₃	t ₁	t ₂
	$\overline{T_3}$	$\overline{T_1}$	$\overline{T_2}$

3.3.8. Refrigeración del semen

- Una vez terminada la dilución usando el dilutor Andromed, se procedió al enfriamiento o refrigeración del semen.
- Las muestras después de su evaluación en semen fresco se colocaron en tubos Eppendorf para luego guardar en la refrigeradora a 5°C por 2 h.
- Luego se evaluó la motilidad, la integridad del acrosoma y de membrana espermática.

3.3.9. Criopreservación del semen

- Se realizó usando las muestras de semen refrigeradas, seguidamente se colocaron en un frasco cubetas de hielo y luego se colocaron los tubos Eppendorf y las pajillas, para adaptar las muestras de semen que se congelaron evitando el shock térmico.
- Las muestras de semen se dejaron por 1 min en el frasco con cubos de hielo.
- Luego se midió la cantidad de nitrógeno líquido usando una regla, de la medida se midió 10 cm hasta donde llega la base de los cilindros del tanque y se procedió a marcar donde llegue la punta de las canastillas, ahí se midió 3 cm por tres veces.
- Las muestras se llevaron al tanque de nitrógeno líquido a -196°C , se abrió la tapa, se sacó el tapón y se colocaron las muestras en una de las canastillas.
- Se introdujo una canastilla con las muestras, luego se bajó la canastilla 3 cm por 5 min, se repitió tres veces, la última vez a parte de las tres veces se bajó hasta el fondo del tanque y se esperó 15 min para luego sacarlo rápidamente.

3.3.10. Descongelación

- Para la descongelación de semen se sacó la pajilla o el tubo Eppendorf congelado y se sumergió inmediatamente en agua tibia a 37°C contenida en un termo de descongelación, las pajillas de 0,50 ml y los tubos Eppendorf fueron sumergidos por un tiempo de 30 seg.
- Cumplido el tiempo se sacaron las pajillas y los tubos del agua y se secaron con ayuda de papel toalla.
- Finalmente se colocó una gota de semen sobre una lámina portaobjetos temperada a 37°C y se evaluó la motilidad, integridad de acrosoma y de membrana espermática.⁸

3.4. Tipo de investigación

El tipo de investigación realizado fue básica – experimental. Básica, ya que la principal contribución es la de generar nuevos conocimientos sobre la integridad acrosomal y de membrana plasmática de los espermatozoides en semen fresco, refrigerado y congelado. Mientras la investigación tipo experimental se realizó debido a que se manipuló una variable, que fue referida a tres etapas de conservación del semen, para ver su efecto sobre la variable dependiente integridad del acrosoma e integridad de membrana plasmática de espermatozoides de alpaca.

3.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron utilizados para la construcción de una matriz de datos en el software Excel, para luego ser exportado a los programas estadísticos R versión 3,3,2 e InfoStat Versión 2008, a partir de los cuales se crearon tablas y figuras en los que se presentan estadísticos de tendencia central y dispersión.^{48,49}

Para los resultados se aplicó el Diseño en Bloques Complemente Aleatorizados. Con la finalidad de comparar la integridad del acrosoma y motilidad espermática en los tres tratamientos (semen fresco, refrigerado y congelado), se empleó el análisis de varianza y la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$) debido a que los datos presentaron distribución normal, sin embargo para comparar la variación de la integridad de membrana espermática en los tres tratamientos (semen fresco, refrigerado y congelado), se empleó la prueba de Friedman($\alpha=0,05$), debido a que los datos para un tratamiento no presentaron distribución normal.

IV. RESULTADOS

Tabla 3. Valores promedio y desviación típica de espermatozoides vivos con acrosoma intacto respecto a diferentes etapas del procesamiento de semen de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* "alpaca". Ayacucho, 2018.

Alpaca	Semen fresco		Semen refrigerado		Semen congelado	
	Promedio (%)	DS	Promedio (%)	DS	Promedio (%)	DS
643	82,66	2,52	67,00	4,58	37,67	14,22
9210	79,00	8,72	64,00	8,54	33,67	16,86
*12006	74,66	11,02	62,33	11,37	35,67	17,67
13022	77,00	5,29	66,00	9,54	37,00	13,23
*S/A	83,33	3,79	68,66	1,15	48,67	6,81

*12006 : Código de arete para la identificación de la alpaca suri color marrón

*S/A : "Sin arete" identificación de la alpaca suri color negro

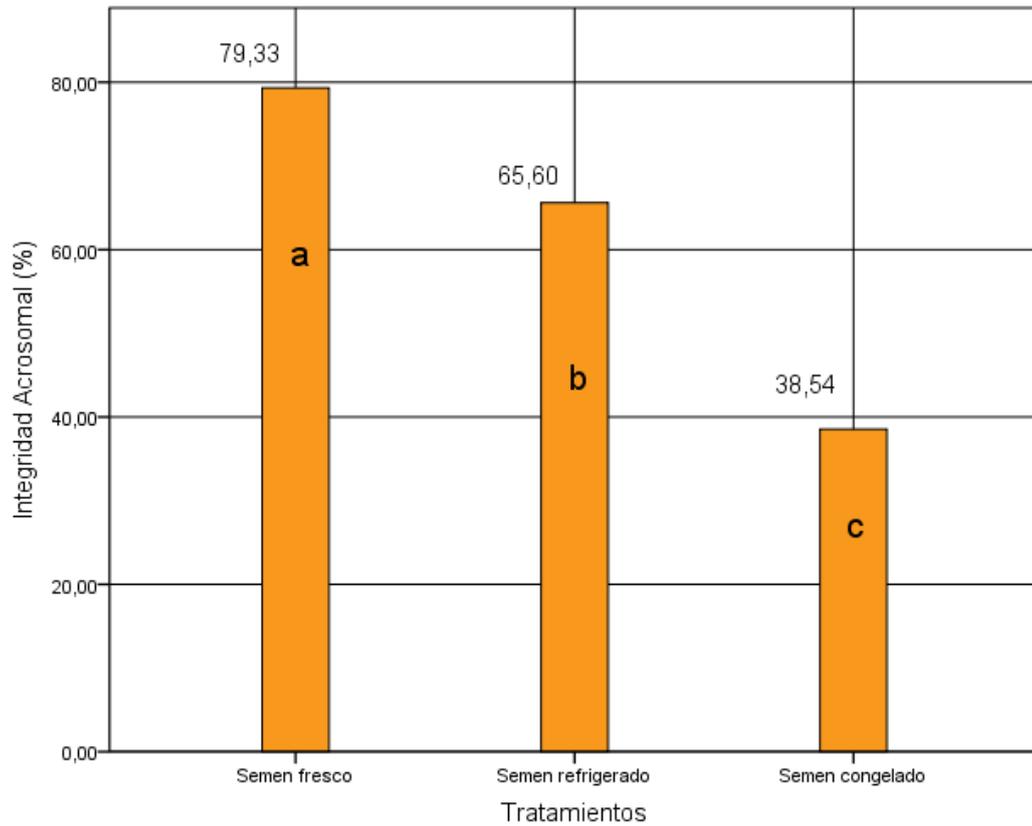


Figura 4. Valores promedios del porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides vivos de *Vicugna pacos* “alpaca” evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018. Las categorías a,b,c asignadas por la prueba estadística muestran diferencias significativas.

Tabla 4. Valores promedio y desviación típica de espermatozoides vivos con membrana celular intacta respecto a diferentes etapas del procesamiento de semen de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca”. Ayacucho, 2018.

Alpaca	Semen fresco		Semen refrigerado		Semen congelado	
	Promedio (%)	DS	Promedio (%)	DS	Promedio (%)	DS
643	57,27	4,50	46,60	7,27	25,60	9,89
9210	51,33	11,51	38,27	11,96	14,60	4,44
12006	73,00	8,14	67,60	7,27	27,93	6,94
13022	61,73	0,81	53,67	7,50	28,20	8,17
S/A	64,07	9,93	51,60	16,63	26,13	8,81

*12006 : Código de arete para la identificación de la alpaca suri color marrón

*S/A : “Sin arete” identificación de la alpaca suri color negro

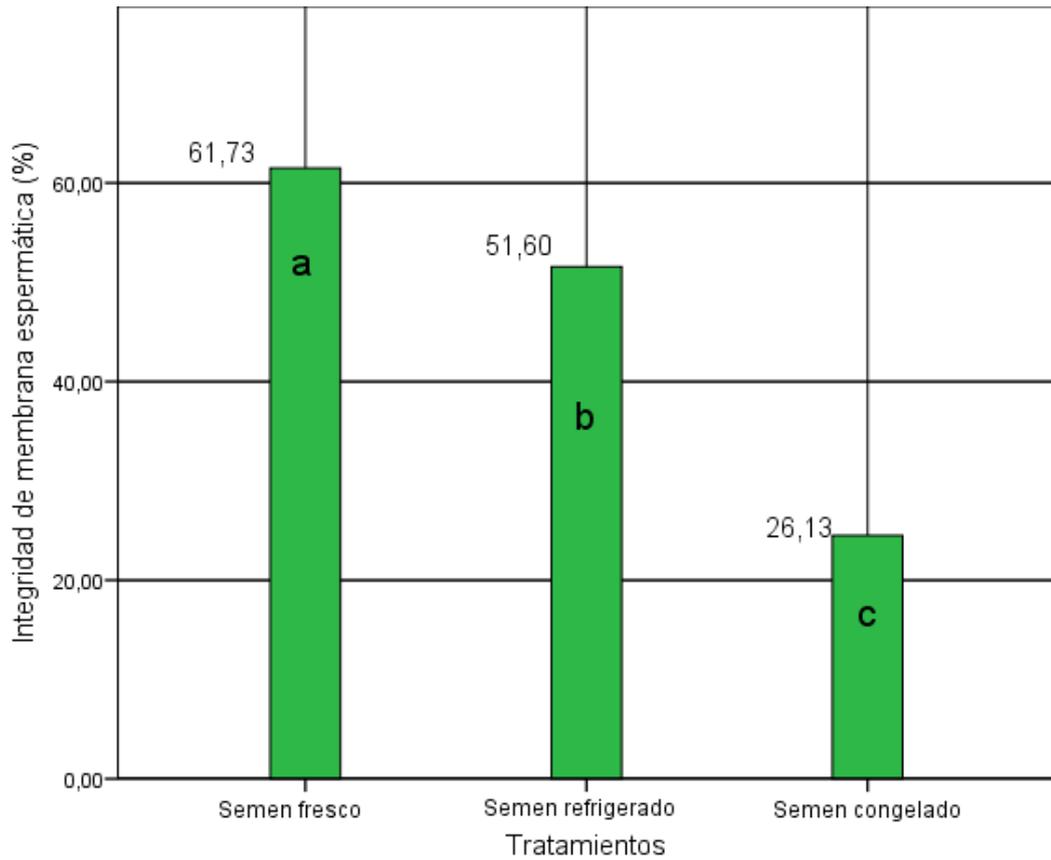


Figura 5. Valores de la mediana en porcentaje de integridad de membrana plasmática de espermatozoides vivos de *Vicugna pacos* “alpaca” evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018. Las categorías a,b,c asignadas por la prueba estadística muestran diferencias significativas.

Tabla 5. Valores promedio y desviación típica de la motilidad individual de espermatozoides respecto a diferentes etapas del procesamiento de semen de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca”. Ayacucho, 2018.

Alpaca	Semen fresco		Semen refrigerado		Semen congelado	
	Promedio (%)	DS	Promedio (%)	DS	Promedio (%)	DS
643	70,00	10,00	63,33	5,77	20,00	21,79
9210	71,67	12,58	66,67	5,77	21,67	29,02
12006	65,67	12,50	61,67	22,55	24,00	19,05
13022	70,00	5,00	53,33	20,82	15,67	12,90
S/A	78,33	2,89	73,33	7,64	31,67	15,28

*12006 : Código de arete para la identificación de la alpaca suri color marrón

*S/A : “Sin arete” identificación de la alpaca suri color negro

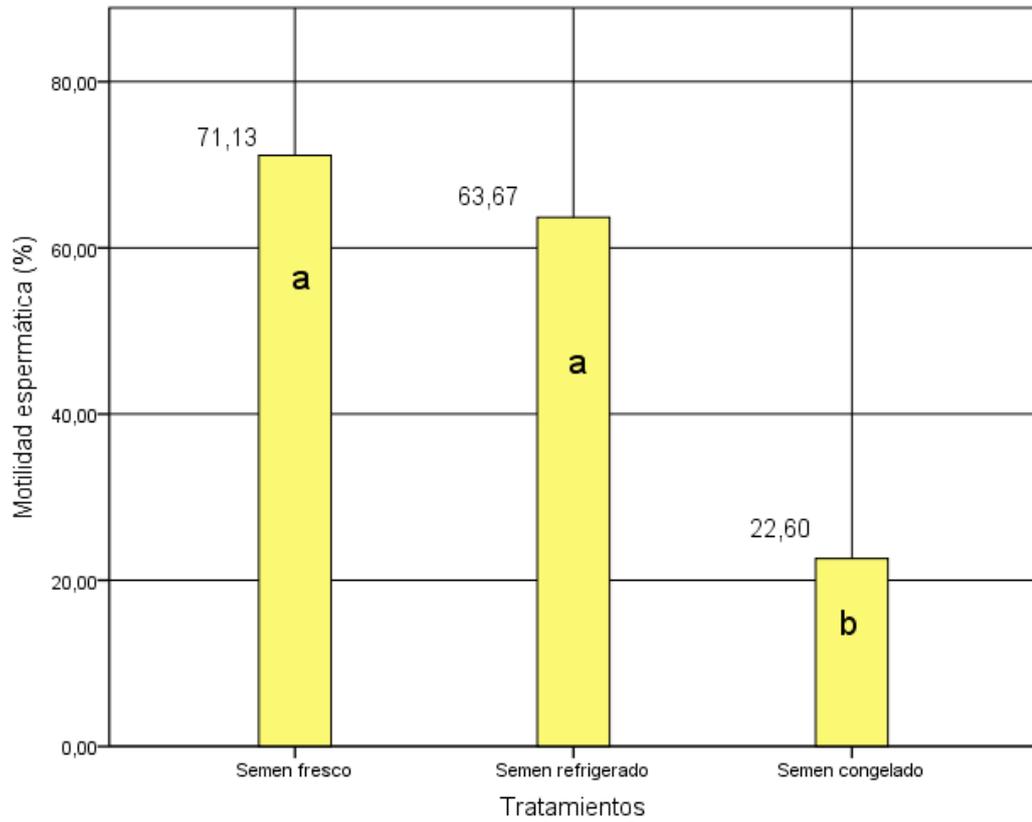
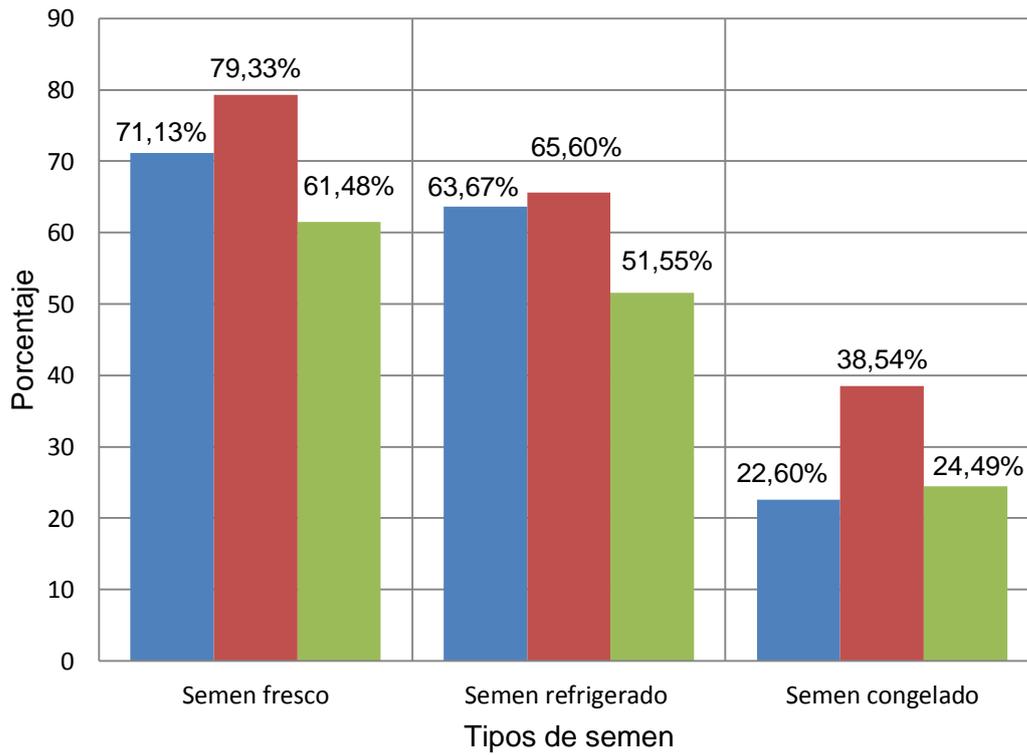


Figura 6. Valores promedios del porcentaje de motilidad individual de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” evaluados en tres etapas de conservación de semen. Ayacucho, 2018. Las categorías a,a asignadas por la prueba estadística muestran igualdad, mientras a,b muestran diferencias significativas.



■ Motilidad espermática ■ Integridad acrosomal ■ Integridad de membrana espermática

Figura 7. Promedios en porcentaje de la motilidad, integridad de membrana espermática e integridad del acrosoma en diferentes etapas del procesamiento de semen de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* "alpaca", INIA - Ayacucho, 2018.

Tabla 6. Valores promedio y desviación típica de las características seminales de cada uno de los cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca” colectados por vagina artificial de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA-Ayacucho, 2018.

Alpaca	Volumen (mL)		Concentración (x 10 ⁶)		Vitalidad (%)	
	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
643	2,33	1,04	149,00	108,76	71,33	3,51
9210	1,23	0,46	163,00	62,55	64,67	5,77
12006	0,83	0,58	264,33	130,27	75,33	13,28
13022	0,97	0,29	175,33	42,78	70,67	7,57
S/A	0,73	0,25	219,33	81,62	80,67	10,69
Promedio	1,22		194,20		72,53	

*12006 : Código de arete para la identificación de la alpaca suri color marrón

*S/A : “Sin arete” identificación de la alpaca suri color negro

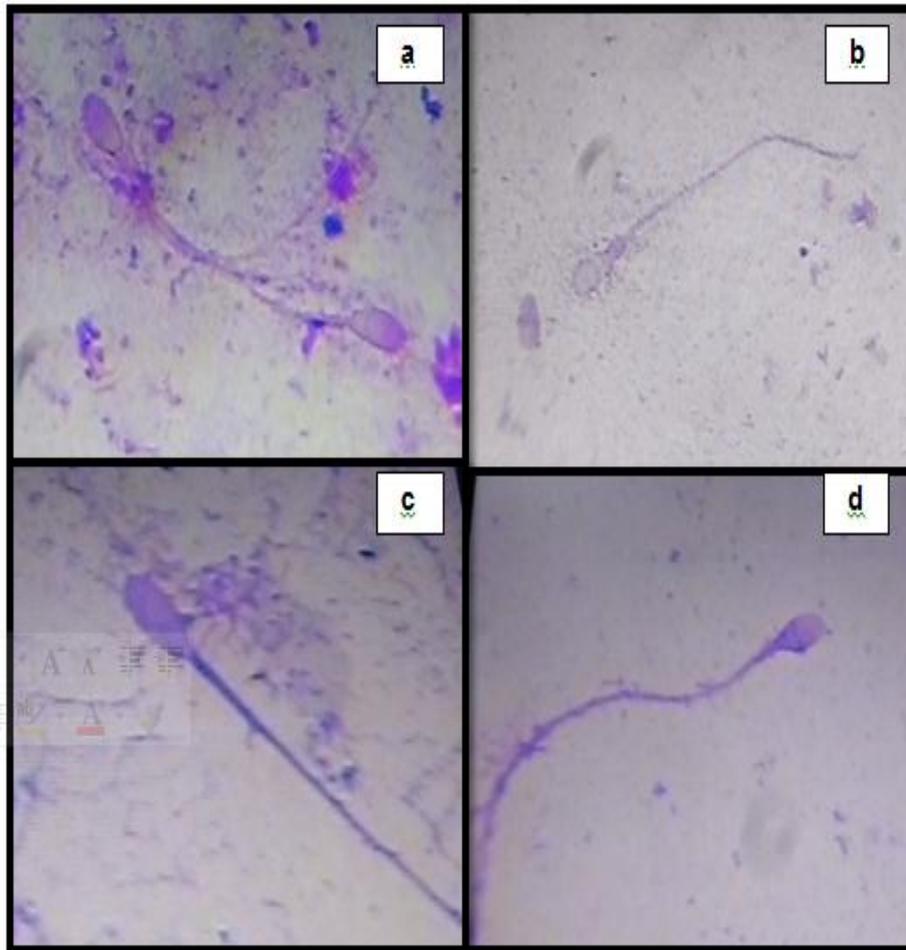


Figura 8. Espermatozoides de alpaca teñidos con la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa. a) Espermatozoide vivo con acrosoma intacto. b) Espermatozoide vivo sin acrosoma. c) Espermatozoide muerto con acrosoma intacto. d) Espermatozoide muerto sin acrosoma.

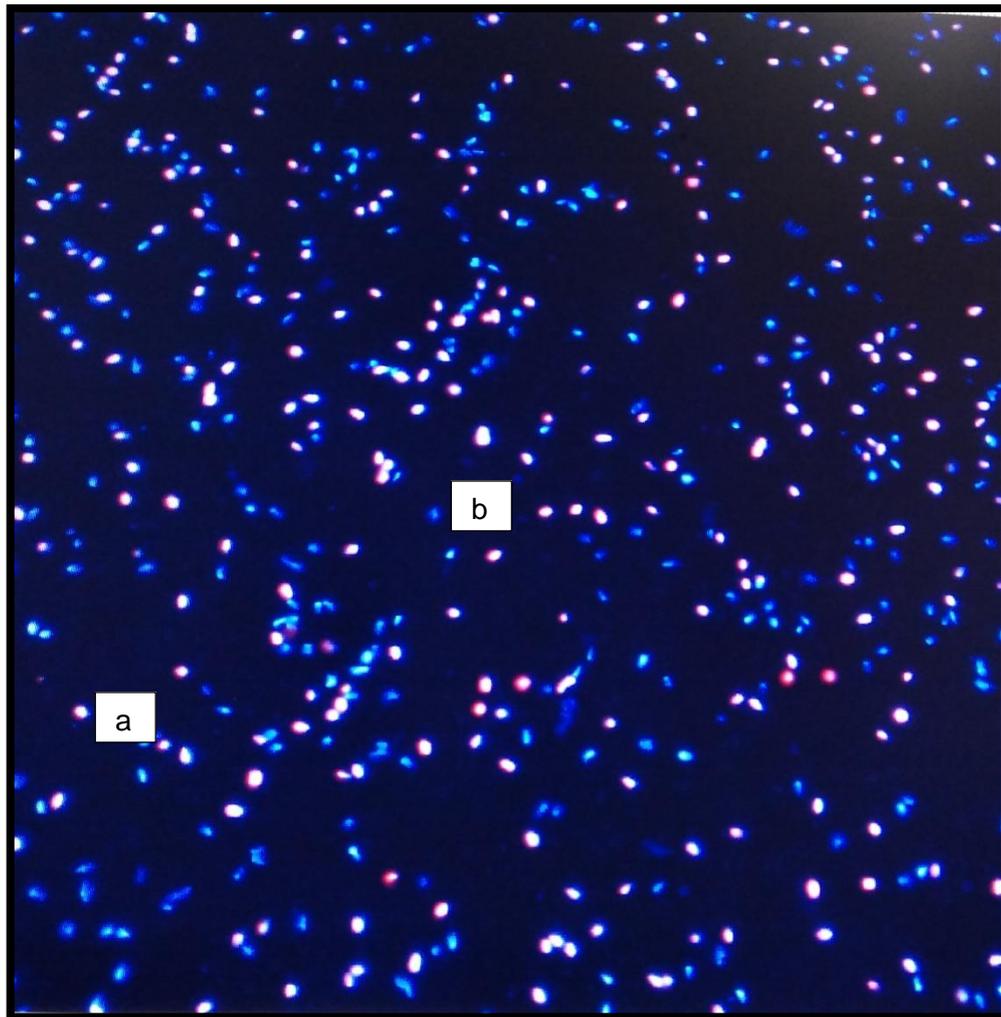


Figura 9. Espermatozoides de alpaca teñidos con el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI, analizados en el AndroVision sistema CASA. a) espermatozoides viables o con membrana celular intacta se observó de color azul. b) espermatozoides no viables o con membrana celular dañada se observó de color rojo.

V. DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos del estudio realizado, se muestran los promedios y desviación típica de espermatozoides vivos con acrosoma integro, en cada uno de los cinco machos de *Vicugna pacos* "alpaca" evaluados en semen fresco, refrigerado y congelado tal como se observa en la tabla 3, la alpaca sin código (S/A) obtuvo un 83,33% de integridad del acrosoma siendo este el mayor valor en semen fresco, asimismo obtuvo los valores promedios más altos en semen refrigerado y congelado con valores promedios 68,66% y 48,67% respectivamente. Estas diferencias en el porcentaje se deben a que luego de la refrigeración y del congelamiento profundo se ha observado que los espermatozoides de varias especies evidencian cambios similares a los de la capacitación, efecto que se ha llamado "criocapacitación".⁵⁰

En espermatozoides criopreservados cuya mayor permeabilidad al calcio, inducida por las bajas temperaturas, posibilitan reacciones capacitantes anticipadas que menguarían el potencial fecundante del espermatozoide.⁵¹

Los valores promedios del porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides vivos de cinco alpaca machos evaluados en semen fresco, refrigerado y congelado como se muestra en la figura 4, se observa que el porcentaje promedio de integridad del acrosoma en semen fresco fue 79,33%, mientras en semen refrigerado fue 65,60% y en semen congelado se obtuvo 38,54%.

Al realizar la prueba de Shapiro-Wilk, se determinó que todos los tratamientos presentaron distribución normal (Anexo 4), por lo que se procedió a realizar la Prueba de ANVA para diseño en bloques completamente al azar y la prueba de Tukey, donde se halló diferencia estadísticamente significativa entre los tres tipos de semen ($p < 0,05$), siendo el semen fresco el que mayor integridad del acrosoma registró en comparación con el semen refrigerado y congelado, resultando mayor diferencia entre semen refrigerado y congelado que entre el

semen fresco y refrigerado. Los resultados demuestran que los procesos de refrigeración a 5°C por 2 h y congelación en nitrógeno líquido a -196°C por 30 min son factores que causan la pérdida del capuchón acrosomal en los espermatozoides de alpaca; sin embargo la refrigeración a 5°C por 2 h no causa mucho daño a los espermatozoides de alpaca manteniendo gran cantidad de espermatozoides con acrosoma íntegro.

Morton *et al.*⁵² reportó una integridad del acrosoma del 92,3% en espermatozoides de alpaca de semen fresco, colectados a partir de espermatozoides de epidídimos, los datos reportados por el autor son mayores en comparación al presente trabajo. Estas diferencias se deben a la adición de antioxidante Equex STM®, al dilutor comercial usado Biladyl® y al tipo de tinción usado eosina – nigrosina.⁵²

El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro en semen fresco obtenidos en el presente trabajo son superiores a lo reportado por Calderón⁸ quien obtuvo 44,78% de integridad del acrosoma, a partir de espermatozoides vivos de alpaca. Estas diferencias en el porcentaje se deben a la metodología usada para la recolección de semen que fue la desviación de los conductos deferentes, también al uso de dilutor Tris-YH y la técnica usada para la tinción ya que fue la eosina – nigrosina.⁸

Respecto al semen refrigerado y congelado el mismo autor con las mismas condiciones obtuvo 41,26% y 25,12%; respectivamente de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro, siendo estos resultados menores a lo obtenidos en la presente investigación.⁸ Estas diferencias en el porcentaje se deben al tiempo de refrigeración del semen a 5°C por 4 h y al tipo de congelación descrito por dicho autor.⁸

El tiempo de refrigeración de semen a 5°C por más de tres horas aumenta los niveles intracelulares de calcio ocasionando cambios de permeabilidad en la membrana. A 5°C la permeabilidad al Ca²⁺ crece significativamente, superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de Ca²⁺. Así, el Ca²⁺ se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos. Es posible que el acrosoma sufra más, con estas alteraciones, una pérdida mayor de capacidad fecundante de la que sería esperada de la reducción de la motilidad.⁵³ En la célula espermática, los lugares primarios de daños causados por la crioconservación son las membranas: plasmática y acrosomal, estructuras celulares importantes para la sobrevivencia y fertilidad de los espermatozoides.¹⁵

Ugarelli *et al.*⁴ obtuvo el 61,13% de integridad del acrosoma de espermatozoides vivos de alpaca recuperados de semen refrigerado, estos valores reportados son similares en relación con el presente trabajo de investigación. Estas pequeñas diferencias se deben al tipo de muestras obtenidas como los epidídimos de alpaca y a la evaluación de las muestras con citometría de flujo usando el colorante fluorescente FITC-PSA.⁴

También Vargas⁹ reportó una integridad del acrosoma de 50,60% en espermatozoides de carnero de semen refrigerado, siendo estos datos menores en relación a este trabajo de investigación. Estas diferencias en el porcentaje se deben al uso de dilutor Tris, a la técnica usada para la tinción que fue con eosina – nigrosina – Giemsa y el factor especie.⁹

La misma autora con las mismas condiciones reportó una integridad del acrosoma de 24,33% en espermatozoides de carnero de semen congelado, siendo este valor menor en relación a lo obtenido en este trabajo de investigación. Estas diferencias se deben a tipo de congelación y las diferencias experimentales realizadas en cada trabajo de investigación.⁹

Asimismo Valdez¹⁵ reportó 44,97% de integridad acrosomal en espermatozoides de semen congelado de carnero, estos resultados son superiores en comparación con la presente investigación. Estas diferencias se deben al uso del dilutor Andromed, tipo de técnica de tinción eosina-nigrosina y factor especie.¹⁵

La conservación de las células espermáticas se basa, esencialmente, en el uso de dilutores que proporcionen los nutrientes que neutralicen los cambios de pH producidos por el metabolismo de los azúcares (efecto tampón), que protejan a los espermatozoides del descenso de la temperatura durante el proceso de congelación.⁵⁴

Los promedios y desviación típica de espermatozoides vivos con membrana celular intacta, en cada uno de los cinco machos de *Vicugna pacos* “alpaca” evaluados en semen fresco, refrigerado y congelado como se muestra en la tabla 4, se encontró que el macho alpaca con código 12006 tuvo 73% de integridad de membrana espermática, siendo este valor el mayor registrado en semen fresco, también tuvo valores promedios más altos en semen refrigerado con 67,6% y 27,93% en semen congelado, este último similar a lo registrado por el macho alpaca con código 13022, en la que se ve claramente que la integridad de membrana disminuye en semen refrigerado y aún más en congelado.

La baja viabilidad se debe a factores como: cambio de temperatura, estrés osmótico, la formación de hielo intracelular y la toxicidad. El cambio de temperatura produce un estrés en la membrana, posiblemente relacionado con un cambio de fase en los lípidos.⁵⁵

Los procesos de refrigeración y congelación-descongelación seminal afecta considerablemente la integridad estructural y funcional de los dominios de las membranas espermáticas, produciéndose un efecto deletéreo que menoscaba los resultados de la valoración de motilidad y vitalidad espermática.¹³

Los valores de la mediana de la integridad de membrana plasmática de espermatozoides de cinco machos alpaca evaluados en semen fresco, refrigerado y congelado que se observan en la figura 5 obtuvo un 61,73% de integridad de membrana espermática en semen fresco, en semen refrigerado un 51,60% y en semen congelado se obtuvo 26,13%, indicando diferencias en los tres tratamientos.

Al realizar la prueba de Shapiro-Wilk, se determinó que el tratamiento con semen congelado no presentó distribución normal (Anexo 8), por lo que se procedió a realizar la prueba de Friedman para diseño en bloques completamente al azar existiendo diferencia estadísticamente significativa entre los tres tipos de semen ($p < 0,05$), siendo el semen fresco el que mayor integridad de membrana espermática registró en comparación con el semen refrigerado y congelado, siendo mayor la diferencia entre semen refrigerado y congelado que entre el semen fresco y refrigerado. Los resultados demuestran que los procesos de refrigeración a 5°C por 2 h y congelación en nitrógeno líquido a -196°C por 30 min tienen efecto dañino en la membrana celular de los espermatozoides de alpaca, no obstante hay poco efecto de la refrigeración sobre la membrana plasmática de los espermatozoides ya que mantiene porcentajes muy altos de integridad de membrana.

El porcentaje promedio de espermatozoides vivos con membrana espermática integra en semen fresco obtenidos en el presente trabajo de investigación son superiores a lo reportado por Calderón⁸ quien obtuvo 46,63 % de integridad de membrana espermática, a partir de espermatozoides de alpaca. Estas diferencias en el porcentaje se deben a la metodología usada para la recolección de semen que fue la desviación de los conductos deferentes de los machos de alpaca, también al uso de dilutor Tris-YH y la prueba usada el Test-Hipoosmótico de Host.⁸

Respecto al semen refrigerado y congelado el mismo autor con las mismas condiciones obtuvo 33,51% y obtuvo 21,54 %, de integridad de membrana espermática, siendo estos resultados menores a lo obtenido en el presente trabajo de investigación. Estas diferencias en el porcentaje se deben al tiempo de refrigeración de semen a 5°C por 4 h y al tipo de congelación descrito por dicho autor.⁸

Suhevic *et al.*⁵ reportó para semen fresco 59,6% de integridad de membrana espermática y 49,92% de integridad de membrana espermática para semen refrigerado de verraco, estos resultados son similares en comparación a la presente investigación ya que se trabajó con la misma tinción fluorescente Hoechst 33342/PI; sin embargo se usó Androstar® y solución buffer fosfato (PBS) para la dilución, no obstante los procedimientos experimentales ni el factor especie demostraron claramente un efecto en los resultados.⁵

De forma similar Vargas⁹ reportó 49,93% de integridad de membrana celular en espermatozoides de carnero en semen refrigerado, estos resultados del autor son similares en comparación a presente trabajo. Estas pequeñas diferencias se deben al agua de coco usada como dilutor del semen y al factor especie.⁹

No se encontró reportes acerca de integridad de membrana espermática en semen congelado de alpaca usando el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI sin embargo comparando estudios se encontraron reportes donde se trabajó con la prueba hipoosmótica de Host.

Banda *et al.*⁵⁶ reportó una integridad de membrana después de la congelación de 24,3%, a partir de espermatozoides de testículos de alpaca, trasladados y refrigerados con suero fisiológico a 5°C, estos resultados ligeramente menores que obtuvo el autor en comparación a nuestros resultados se debe al uso del dilutor Tris con yema de huevo y al uso de la prueba hipoosmótica de Host.⁵⁶

La membrana citoplasmática en los espermatozoides es una de las estructuras más seriamente afectadas durante los procesos de congelación y descongelación, sin embargo efecto es diferente en cada especie y la manera exacta de determinar es evaluarlo con un método confiable y objetivo.⁵⁷

Los promedios y desviación típica de la motilidad individual de espermatozoides de cinco machos de *Vicugna pacos* “alpaca” evaluados en semen fresco, refrigerado y congelado tal como se muestra en la tabla 5, se observa que el macho alpaca sin código (S/A) obtuvo el 78,33% de motilidad espermática, siendo este valor el mayor registrado en semen fresco, también obtuvo valores

promedios más altos en semen refrigerado con 73,33% y 31,67% en semen congelado, se ve claramente que las motilidades espermáticas disminuye en la refrigeración del semen y aún más en semen congelado.

Se conoce que la motilidad individual total es uno de los parámetros más afectados durante la refrigeración y criopreservación del semen.⁵⁴ Las membranas espermáticas de los mamíferos son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y son sensibles al daño inducido por el oxígeno mediado por la peroxidación lipídica y por lo tanto son sensibles al ataque de especies reactivas al oxígeno (ROS), lo cual resulta en una disminución de la motilidad de los espermatozoides, presumiblemente por la rápida pérdida de ATP intracelular que conduce a daños en el axonema.⁵⁸

Los promedios de la motilidad individual de espermatozoides expresados en porcentaje de cinco machos alpaca evaluados en semen fresco, refrigerado y congelado que se muestran en la figura 6, indican que el porcentaje de motilidad espermática en semen fresco fue 71,13%, mientras en semen refrigerado fue 63,67% y en semen congelado se obtuvo 22,60% de espermatozoides móviles.

Al realizar la prueba de Shapiro-Wilk, se determinó que todos los tres tratamientos para motilidad espermática presentaron distribución normal (Anexo 10), por lo que se procedió a realizar la Prueba de ANVA para diseño en bloques completamente al azar no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre los tres tipos de semen ($p > 0,05$), fue el semen fresco el que mayor motilidad espermática registró en comparación con el semen refrigerado siendo estos dos últimos tratamientos estadísticamente iguales, el semen congelado en comparación con los dos tratamientos anteriores son estadísticamente diferentes. Estos resultados demuestran que la refrigeración a 5°C del semen a 2 h no tiene efecto en la motilidad individual de los espermatozoides de alpaca; sin embargo la congelación en nitrógeno líquido -196°C por 30 min si tiene efecto negativo ya que se reduce considerablemente la motilidad individual en los espermatozoides de alpaca.

Alarcón *et al.*⁴⁷ reportó la motilidad individual de 69% en espermatozoides de semen fresco de alpaca, estos datos son similares a lo obtenido en el presente trabajo, esto debido a que el semen fue colectado con la misma técnica de vagina artificial y se usó el mismo dilutor Andromed.⁴⁷

Los porcentaje promedios de motilidad individual espermática en semen fresco, refrigerado y congelado obtenidos en el presente trabajo son superiores a lo

reportado por Calderón⁸ quien obtuvo 43,98%; 33,24% y 14,46% de motilidad individual respectivamente, a partir de espermatozoides de alpaca. Estas diferencias en el porcentaje de motilidad individual se deben a la metodología de desviación de los conductos deferentes de las alpacas, al uso de dilutor Tris-YH, a la técnica usada para la tinción eosina – nigrosina, al tiempo de refrigeración de semen a 5°C por 4 h, al tipo de congelación y la diferente valoración subjetiva del investigador.⁸

Asimismo García *et al.*⁵⁹ reportó una motilidad de 61,7% en espermatozoides de semen fresco y 48,9% en espermatozoides de semen refrigerado de alpaca, estos datos son menores a lo obtenido en el presente trabajo de investigación, esto debido a factores como la recolección del semen que fue poscópula colectados con un espéculo vaginal, también al uso de un diluyente diferente como la yema de huevo fresco y la diferencias experimentales en la refrigeración del semen.⁵⁹

La menor motilidad después de los procesos de refrigeración y congelación de los espermatozoides se debe a que estos procesos producen cambios en la morfología espermática incluyendo daños en la mitocondrias, el acrosoma y cola del espermatozoide.²⁹

Los porcentajes de la motilidad, integridad del acrosoma e integridad de membrana espermática evaluados en semen fresco, refrigerado y congelado de alpaca que se observan en la figura 7 muestra que en el semen fresco resalta la variable integridad del acrosoma como el valor promedio más alto registrado con un 79,33% seguido por motilidad espermática con 71,13% y la integridad de membrana espermática con un 61,48%, siendo estos valores muy próximos. De igual manera en semen refrigerado la integridad acrosomal es el valor promedio más alto con el 65,60% seguido por la motilidad espermática con 63,67% y la integridad de membrana espermática con un 51,55%, siendo este valor el menor de todos. Asimismo en el semen congelado la integridad acrosomal es el valor promedio alto con el 38,54% seguido por la integridad de membrana espermática con el 24,49% y la motilidad espermática con 22,60%.

De los resultados, se puede decir que la refrigeración causa más daño a la membrana plasmática comparado con la motilidad e integridad acrosomal de los espermatozoides de alpaca. La congelación afecta más a la motilidad comparada con la integridad del acrosoma y de la membrana espermática; de esta manera se puede decir que los procesos de refrigeración y congelación

tienen efecto negativo en la motilidad, integridad del acrosoma e integridad de la membrana espermática provocando que los espermatozoides pierdan su capacidad de fertilizar los ovocitos.

Los promedios y desviación típica de volumen, concentración y vitalidad del semen fresco, para cada uno de las cinco machos de *Vicugna pacos* "alpaca" que se muestran en la tabla 6, se observa que el macho con mayor promedio en tres repeticiones fue el código 243 con un volumen de 2,33 ml, recolectado mediante vagina artificial, mientras que el macho con código 12006 obtuvo un $264,33 \times 10^6$ /ml de concentración espermática, asimismo el macho sin código (S/A) registró el mayor valor promedio en vitalidad siendo 80,67%, los resultados demuestran que las características seminales varía ligeramente en cada alpaca. Asimismo se muestran los promedios totales del volumen, concentración y vitalidad espermática para todos los machos alpaca evaluados donde se obtuvo un volumen promedio total de 1,22 ml, una concentración espermática de 194×10^6 espermatozoides/ml y 72,53% de espermatozoides vivos.

El volumen de semen de alpaca obtenido en este trabajo son inferiores a lo reportado por Alarcón *et al.*⁴⁷ quien obtuvo 1,5 ml de semen también recolectado por vagina artificial, sin embargo el porcentaje de espermatozoides vivos y la concentración espermática obtenidos en esta investigación son ligeramente superiores a lo reportado por el mismo investigador quien obtuvo 70,8% y $80,3 \times 10^6$ /ml respectivamente.⁴⁷

De las características seminales la mayor diferencia se observa en la concentración espermática, esto debido que las evaluaciones fueron realizados con el AndroVision sistema CASA; sin embargo, se comprobaron, utilizando muestras de semen de distintas especies animales, que los CASA tienden a sobreestimar la concentración de espermatozoides de la muestra. El error se atribuye debido a las colisiones espermáticas, el mismo espermatozoide puede ser contabilizado varias veces. Cuanto mayor es la tasa de dilución del semen, los problemas de sobreestimación de la concentración tienden a disminuir puesto que la posibilidad de colisión disminuye.⁶⁰

Se pudo aplicar con éxito la técnica de la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa en espermatozoides de alpaca, pudiendo evaluar el estado acrosomal a través de esta técnica tal como se observa en la figura 8, en las muestras evaluadas se observaron espermatozoides vivos con acrosoma intacto, siendo la región acrosomal de color azul violeta y la región postacrosomal translucido o

ligeramente coloreado, asimismo se observaron espermatozoides vivos con acrosoma reaccionado que se observaron translucidos o ligeramente coloreado, también se encontraron espermatozoides muertos con acrosoma intacto de color azul oscuro o azul violeta en la región postacrosomal y color azul violeta en la región acrosomal, finalmente se observa espermatozoides con muertos con acrosoma reaccionado de color azul oscuro o azul violeta en la región postacrosomal y translucidos en la región del acrosoma.

El uso de esta técnica sencilla permitiría evaluar la calidad de los eyaculados en los camélidos sudamericanos y podría ser utilizada para indicar daño acrosomal, especialmente importante en los espermatozoides que sobreviven luego de procesos de criopreservación espermática como la refrigeración y el congelamiento profundo.⁷

Los espermatozoides de alpaca teñidos mediante el uso de dos fluorocromos combinados como el Hoechst 33342/PI analizados con el sistema AndroVision (CASA) fue un éxito y así lo demuestra la figura 9, donde los espermatozoides teñidos de color azul son los espermatozoides viables con membrana intacta y los espermatozoides que se observa teñidos de color rojo son los no viables con membrana espermática dañada.

La aparición de color azul en la cabeza de los espermatozoides indica que la membrana plasmática se encuentra intacta. El daño en la membrana plasmática se observa como una fluorescencia de color rojo.⁵ El Ioduro de propidio (PI) sólo es capaz de atravesar las membranas plasmáticas dañadas o degeneradas, y por tanto permite identificar las células muertas o en proceso de degeneración, mientras que el Hoechst 33342 es capaz de atravesar membranas celulares intactas y por tanto permite identificar la población de células viables.⁶¹

VI. CONCLUSIONES

1. La integridad del acrosoma y de la membrana plasmática del espermatozoide de alpaca disminuyen conforme baja la temperatura. Así, en integridad de membrana se registró 79,33%; 65,60%; y 38,54% para semen fresco, refrigerado y congelado, respectivamente, existiendo diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0,05$); y para integridad de membrana plasmática se registraron 61,73%; 51,60% y 26,13% para semen fresco, refrigerado y congelado respectivamente, existiendo diferencias significativa entre los tratamientos ($p < 0,05$).
2. La motilidad en los espermatozoides de alpaca fue 71,13%; 63,67% y 22,60% para semen fresco, refrigerado y congelado, siendo estadísticamente iguales ($p > 0,05$) en semen fresco y refrigerado; existiendo diferencias estadísticas entre estos dos tratamientos en comparación con el semen congelado.
3. El volumen promedio semen de los cinco macho alpaca fue 1,22 ml, la concentración espermática fue 194×10^6 espermatozoides/ml y la vitalidad espermática fue 72,53% de espermatozoides vivos.
4. El desbalance de calcio que acompaña la disminución de la integridad acrosomal y de la membrana, probablemente aceleran la capacitación espermática y la reacción acrosomal, con lo cual se afectaría la capacidad fecundante si estos espermatozoides son destinados para Inseminación Artificial (IA), fertilización *in vitro* (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

VII. RECOMENDACIONES

1. Utilizar semen fresco y refrigerado hasta las dos horas de refrigeración en protocolos de inseminación artificial y fecundación *in vitro*.
2. Evaluar la integridad acrosomal y de membrana espermática usando fluorocromos en citometría de flujo, para semen refrigerado y congelado.
3. Evitar trabajar semen de alpaca congelado por 30 min, ya que tiene baja integridad de membrana, integridad de acrosoma y motilidad espermática.
4. No utilizar preparado de colorante Giemsa almacenado por más de 2 días, ya que su calidad tiene un profundo efecto en la nitidez de la tinción.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Didion BA, Dabrinisky J, Giles J, Graves CN. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*. 1989, 22(1):51-57.
2. Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*. 2004; 62(7): 1245-1252.
3. Cabrera P, Pantoja C. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Rev Inv Vet Perú*. 2012; 23(2):192-200.
4. Ugarelli A, Evangelista-Vargas S, Santiani A. Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante Citometría de Flujo. *Rev Inv Vet Perú*. 2017; 28(1):130-40.
5. Suhevic J, Malcervelli D, Torres P, Fratto C, Miguel J, Fischman ML, et al. Determinación de la calidad de las membranas espermáticas porcinas mediante triple tinción fluorocrómica en semen fresco y refrigerado. *Spermova [Internet]*. 2015 [citado el 19 de septiembre del 2018]; 5(1).p.134-8. Disponible en:
<https://www.researchgate.net/publication/282463191/download>.
6. Carretero MI, Fumuso FG, Miragaya M, Giuliano SM. Evaluación del estado acrosomal de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Spermova*. 2015; 5(2):258-63.
7. Fumoso F, Carretero M, Neild D, Miragaya M, Giuliano S. Evaluación de la viabilidad y el estado acrosomal de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Resultados preliminares. En: I Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2015.p.399-402.
8. Calderón Antezana DW. Efecto de la adición del plasma seminal de toro (*Bos taurus*) sobre la viabilidad de los espermatozoides criopreservados colectados de los conductos deferentes en alpacas (*Vicugna pacos*) [Tesis para optar el título profesional de médico veterinario y zootecnista]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2015.
9. Vargas Cahuana P. Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros [Tesis para optar el título profesional de médico veterinario y zootecnista]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2015.
10. Cabrera P, Sánchez R, Risopatrón J. Selección Espermática en Semen Congelado/Descongelado de Equino: Evaluación de las Membranas Plasmática, Acrosomal y Potencial de Membrana Mitocondrial. *Int J Morphol*. 2014; 32(2):725-31.
11. Cheuqueman C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, Risopatrón J. Evaluación de los parámetros de la función espermática y la fragmentación del ADN en esperma de alpaca eyaculado (*Lama pacos*) mediante citometría de flujo. *Reproduction in Domestic Animals*. 2013;48(3):447-53.
12. Díaz-Franco O, Mesa H, Valencia-Mejía JG, Gómez-Londoño G, Henao-Uribe F. Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos reproductores con gotas citoplásmicas persistentes. *FCV-LUZ*. 2009; 19(5):500-505.
13. Rubio-Guillén JL, Quintero-Moreno AA, González Villalobos DM. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Revista Científica*. 2009; 19(4): 382-389.

14. Evangelista Vargas ÓD. Caracterización morfométrica de los espermatozoides en alpacas macho (*Vicugna pacos*) de fertilidad comprobada [Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en Zoología]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.
15. Valdez J D. Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado [Tesis para obtener el título de magister en reproducción animal]. Cuenca- Ecuador: Universidad de Cuenca; 2013.
16. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(4):871-91.
17. Ramalho-Santos J, Schatten G, Moreno R. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosome reaction. *Biology of reproduction.* 2002; 67(4):1043-51.
18. Moreno RD, Alvarado CP. The mammalian acrosome as a secretory lysosome: new and old evidence. *Mol Reprod Dev.* 2006; 73(1):1430-4.
19. Delgado Cáceres BE. Evaluación espermática de semen de ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad [Tesis para optar el Título Profesional de licenciada en Biología]. Lima: Universidad Ricardo Palma; 2013.
20. Rubio-Guillén J, Portillo-Guevara O, Montero M, Velásquez A, W Z, González-Villalobos D, et al. Integridad de la membrana plasmática de espermatozoides recién colectados de ovinos en condiciones de trópico seco. *AIDA.* 2013;1(1):407-9.
21. Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science.* 2008; 104(1): 359-69.
22. WHO (World Health Organization). WHO Laboratory Manual for Examination and Processing of Human Semen. [Internet]. Estados unidos: who.int/en/; 2010 [actualizado el 20 de enero de 2018; acceso 24 de febrero de 2018]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44261/1/9789241547789_eng.pdf.
23. Canorio Pariona NM. Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*) [Tesis para optar el grado académico de Magíster en Biología Molecular]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.
24. Ampudia FT. Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco [Tesis Doctoral]. León: Universidad de León; 2017.
25. Cardozo JA, Velásquez JG, Rodríguez G, Prieto E, Tarazana G, Espitia A, et al. Determinación de la pubertad del macho Bovino. En: Corpoica, editor. Evaluación reproductiva del macho Bovino en condiciones tropicales. Bogotá: Corpoica; 2002.p. 47-48.
26. Hidalgo Ordóñez CO, Tamargo Miguel C, Díez Monforte C. Análisis del semen bovino. 2a ed. Villaviciosa: Serida; 2005.
27. Sumar J. Avances y perspectivas en reproducción de camélidos. En: Avances en reproducción de rumiantes. I Symposium Internacional. Lima: APPA-Perú; 1997.p. 45-56.
28. Bravo PW., Johnson LW. Reproductive physiology of the male camelid. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 1994;10(2):259-64.
29. Mc Clure N, O'connell M, Lewis SE. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod.* 2002; 17(1):704-9.

30. Capcha MR. Efecto de la selección por ganancia media diaria durante el engorde sobre la calidad espermática en conejo [Tesis para optar el grado académico de máster en producción animal]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2016.
31. Kovács A, Foote RH. Viability and Acrosome Staining of Bull, Boar and Rabbit Spermatozoa. *Biotechnic & Histochemistry*. 1992; 67 (3): 119-24.
32. Giuliano SM, Bisiau C, Carretero MI, Arraztoa CC, Neild D. Use of Comassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet*. 2012; 14(1): 279.
33. Gillan L, Evans G, Maxwell W. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. 2005;63(2):445-57.
34. Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*. 1999;48(1):41-7.
35. Rota A, Linde-Forsberg C, Vannozzi J, Romagnoli S, Rodriguez-Martines H. Cryosurvival of Dog Spermatozoa at Different Glycerol Concentrations and Freezing/Thawing Rates. *Reproduction in Domestic Animals*. 1998;33(5): 355–61.
36. Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *J Androl*. 1991;12(1):112-8
37. Smith JF, Murray GR. Evaluation of different staining techniques for determination of membrane status in spermatozoa. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 1997;57:246-50.
38. Manosalva I, Cortés C, Leyva V, Valdivia M, De los Reyes M, Barros C, et al. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Rev Inv Vet Perú* 2005;16(1):114-28.
39. Aisen EG. Recolección y evaluación de semen. En: Aisen EG, director. *Reproducción Ovina y Caprina*. 1a ed. Buenos Aires: Inter-Médica; 2004.
40. Peña A, Linde-Forsberg C. Effect of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 2000; 54(1): 703-718.
41. Arenas Ríos E, Cambron Ruiz A, Ambriz García D, Zuñiga Rubio PJP, Rodríguez Tobón A, Rosado García A. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *ContactoS [Internet]*. 2010 [citado el 27 de febrero de 2018]; 78(1):5–11. Disponible en: <http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n78ne/fisiologica.pdf>.
42. Río M, Godoy A, Toro A, Orellana R, Cortés ME, Moreno RD, et al. La reacción acrosómica del espermatozoide: avances recientes. *Rev Int Androl [Internet]*. 2007 [citado el 27 de febrero de 2018]; 5(4):368-73. Disponible en: www.elsevier.es/es-revista-revista-internacional-andrologia-262-pdf-13115521-S300.
43. Mazon, E. Semen refrigerado e congelado para inseminação artificial em ovinos. Brasil: Universidad Federal de Goiás; 2011.
44. Gonzales Aparicio GW. Evaluación de tres métodos para uso de albúmina sérica bovina en el sexado de espermatozoides de toros [Tesis para optar el grado de magister en producción animal]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina; 2016.
45. Minitube.com. Androvisión -más que un CASA .Alemania: Minitube.com; 2017- [actualizada diciembre de 2017; acceso 1 de marzo de 2018]. Disponible en: https://www.minitube.es/pdf/index/12500010_LeafletandroVision_es_171205.pdf.

46. Muiño Otero R. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas [Tesis doctoral]. Coruña: Universidad de Santiago de Compostela; 2007.
47. Alarcón V, García W, Bravo W. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. Rev Inv Vet Perú [Internet]. 2012[citado el 17 de septiembre del 2018]; 23(1):[58-64 pp.]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v23n1/a07v23n1.pdf>.
48. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna- Austria; 2013. Disponible en: <http://www.R-project.org/>.
49. Balzarini M.G, González L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo JA, Robledo CW. InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina; 2008. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>.
50. Maxwell WMC, Johnson LA. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. Mol. Reprod. Dev. 1997; 46(1): 408-418.
51. Garner D, Hafez E. Espermatozoides y plasma seminal. En: Hafez E, Hafez B, editores. Reproducción e Inseminación Artificial en animales. 7^a Ed. México: McGraw Hill; 2000. p. 33-53.
52. Morton K, Evans G, Maxwell W. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. Theriogenology . 2010; 74(1):311–316.
53. Amann R, Graham J, McKinnon A, Voss J. Spermatozoal function Equine Reproduction. Philadelphia: Lea &Febiger; 1993. p. 715-45.
54. Herrera E. Evaluación de dilutores para la conservación de semen en ovinos [Tesis de Bachiller en medicina veterinaria]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 1986.
55. Watson P. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science. 2000: 60(61); 481-92.
56. Banda R, Evangelista V, Ruiz G, Sandoval M, Rodríguez LL, Valdivia C, et al. Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y Leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca. Rev. Inv. Perú. 2010;21(1):145-153.
57. Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. Biol Reprod. 2003;68(5):1828–35.
58. Bansal A, Bilaspuri G. Effect of ferrous ascorbate on *in vitro* capacitation and acrosome reaction in cattle bull spermatozoa. Animal Science Report. 2007;1(2): 69 – 77.
59. García WV, Alarcón VB, Bravo WM. Inseminación Artificial de Alpacas con Semen Refrigerado y con Inclusión de Dos Tipos de Yema de Huevo. Rev Inv Vet Perú [Internet]. 2017 [citado el 19 de septiembre del 2018]; 28(2).p. 337. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n2/a13v28n2.pdf>.
60. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzer in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 2002; 57(1): 149-179.
61. Muiño R, Fernández M, Areán H, Viana JL, López M, Fernández A, et al. Nuevas tecnologías aplicadas al procesado y evaluación del semen bovino en centros de Inseminación Artificial. ITEA. 2005;101(3):175-91.

ANEXOS

Anexo 1. Registro total de datos de las características seminales y valores en porcentaje de la integridad acrosomal y de membrana plasmática de espermatozoides de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca” sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen, en las diferentes fechas de evaluación. Ayacucho, 2018.

Fecha	N° Alpaca	Parámetros seminales				Semen Fresco		Semen refrigerado			Semen congelado		
		Volumen (mL)	Vitalidad (%)	Concentración (x 10 ⁶)	Motilidad (%)	Integridad		Motilidad (%)	Integridad		Motilidad (%)	Integridad	
						Acrosomal (%)	de Membrana (%)		Acrosomal (%)	de Membrana (%)		Acrosomal (%)	de Membrana (%)
26/06/2018	12006	1,5	83	248	60	64	68,4	60	53	65,8	35	24	34,4
05/07/2018	13022	0,8	62	181	65	71	62,2	60	61	46,2	5	32	24,2
24/07/2018	643	3,5	75	76	60	85	54	60	63	47,8	10	31	36,4
01/08/2018	643	2	71	274	70	83	55,4	70	66	53,2	45	54	23,4
02/08/2018	S/A	0,5	74	130	80	86	69,8	80	68	37,2	15	41	33
03/08/2018	13022	0,8	76	130	75	79	62,2	30	60	53,6	12	27	37,6
06/08/2018	9210	0,7	68	102	60	83	62,6	60	65	46,8	8	26	18,6
07/08/2018	S/A	0,7	93	238	75	85	69,8	65	70	69,8	35	51	29,2
09/08/2018	12006	0,5	60	143	57	74	82,4	40	59	75,6	2	27	20,6
10/08/2018	9210	1,5	58	160	85	85	51,8	70	72	43,4	55	53	16,2
13/08/2018	S/A	1	75	290	80	79	52,6	75	68	47,8	45	54	16,2
14/08/2018	643	1,5	68	97	80	80	62,4	60	72	38,8	5	28	17
16/08/2018	13022	1,3	74	215	70	81	60,8	70	77	61,2	30	52	22,8
20/08/2018	12006	0,5	83	402	80	86	68,2	85	75	61,4	35	56	28,8
21/08/2018	9210	1,5	68	227	70	69	39,6	70	55	24,6	2	22	9

Anexo 2. Registro de datos de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y reaccionado, espermatozoides muertos con acrosoma intacto y reaccionado de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen, en las diferentes fechas de evaluación. Ayacucho, 2018.

Fecha de evaluación	Alpaca	Semen fresco				Semen refrigerado				Semen congelado			
		vivo con acrosoma (%)	vivo sin acrosoma (%)	muerto con acrosoma (%)	muerto sin acrosoma (%)	vivo con acrosoma (%)	vivo sin acrosoma (%)	muerto con acrosoma (%)	muerto sin acrosoma (%)	vivo con acrosoma (%)	vivo sin acrosoma (%)	muerto con acrosoma (%)	muerto sin acrosoma (%)
24/07/2018	643	85	7	6	2	63	6	15	16	31	2	31	36
01/08/2018	643	83	3	9	5	66	5	14	15	54	5	14	27
14/08/2018	643	80	4	9	7	72	4	14	10	28	3	34	35
06/08/2018	9210	83	8	4	5	65	5	17	13	26	4	38	32
10/08/2018	9210	85	3	10	2	72	2	9	17	53	4	17	26
21/08/2018	9210	69	3	13	15	55	2	18	25	22	1	31	46
26/06/2018	12006	64	17	13	6	53	10	14	23	24	6	27	43
09/08/2018	12006	74	7	13	6	59	5	23	13	27	5	33	35
20/08/2018	12006	86	2	9	3	75	0	14	11	56	4	22	18
05/07/2018	13022	71	12	13	4	61	6	17	16	32	6	29	33
03/08/2018	13022	79	4	10	7	60	7	19	14	27	0	37	36
16/08/2018	13022	81	5	11	3	77	3	13	7	52	5	25	18
02/08/2018	S/A	86	4	7	3	68	4	14	14	41	4	25	30
07/08/2018	S/A	85	3	9	3	70	3	14	13	51	3	18	28
13/08/2018	S/A	79	5	14	2	68	5	16	11	54	4	14	28

Anexo 3. Registro de datos de espermatozoides con integridad de membrana plasmática (Viables) y espermatozoides con membrana plasmática desintegrada (No viables) de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen, en las diferentes fechas de evaluación. Ayacucho, 2018.

Fecha de evaluación	Semen fresco		Semen refrigerado		Semen congelado		
	Alpaca	Viables (%)	No viables (%)	Viables (%)	No viables (%)	Viables (%)	No viables (%)
24/07/2018	643	54,0	46,0	47,8	52,2	36,4	63,6
01/08/2018	643	55,4	44,6	53,2	46,8	23,4	76,6
14/08/2018	643	62,4	37,6	38,8	61,2	17,0	83
06/08/2018	9210	62,6	37,4	46,8	53,2	18,6	81,4
10/08/2018	9210	51,8	48,2	43,4	56,6	16,2	83,8
21/08/2018	9210	39,6	60,4	24,6	75,4	9,0	91,0
26/06/2018	12006	68,4	31,6	65,8	34,2	34,4	65,6
09/08/2018	12006	82,4	17,6	75,6	24,4	20,6	79,4
20/08/2018	12006	68,2	31,8	61,4	38,6	28,8	71,2
05/07/2018	13022	62,2	37,8	46,2	53,8	24,2	75,8
03/08/2018	13022	62,2	37,8	53,6	46,4	37,6	62,4
16/08/2018	13022	60,8	39,2	61,2	38,8	22,8	77,2
02/08/2018	S/A	69,8	30,2	37,2	62,8	33,0	67,0
07/08/2018	S/A	69,8	30,2	69,8	30,2	29,2	70,8
13/08/2018	S/A	52,6	47,4	47,8	52,2	16,2	83,8

Anexo 4. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para integridad del acrosoma de espermatozoides vivos de *Vicugna pacos* “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen. Ayacucho, 2018.

Parámetros estadísticos	Tratamientos		
	Semen fresco	Semen refrigerado	Semen congelado
N	5	5	5
Media	79,33	65,60	38,54
Mediana	79,00	66,00	37,00
Desviación estándar	3,69	2,49	5,87
Mínimo	74,67	62,33	33,67
Máximo	83,33	68,67	48,67
Estadístico de prueba	0,93	0,98	0,79
Sig. Asintótica (bilateral)	0,62	0,95	0,07

Anexo 5. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para integridad del acrosoma de espermatozoides vivos de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca”, evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018.

Parámetros estadísticos	Bloques				
	643	9210	12006	13022	S/A
N	3	3	3	3	3
Media	62,45	58,89	57,56	60,00	66,89
Mediana	67,00	64,00	62,33	66,00	68,67
Desviación estándar	22,84	23,09	19,93	20,66	17,40
Mínimo	37,67	33,67	35,67	37,00	48,67
Máximo	82,67	79,00	74,67	77,00	83,33
Estadístico de prueba	0,97	0,96	0,96	0,94	0,99
Sig. Asintótica (bilateral)	0,67	0,63	0,60	0,51	0,83

Anexo 6. Prueba de DBCA de integridad del acrosoma de espermatozoides vivos de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* "alpaca" evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	4309,266	2	2154,633	313,440	,000
Bloques	161,913	4	40,478	5,888	,016
Error	54,993	8	6,874		
Total	60628,240	15			

a. R al cuadrado = ,999 (R al cuadrado ajustada = ,998)

Anexo 7. Prueba comparación de medias de HSD Tukey de integridad del acrosoma de espermatozoides vivos de *Vicugna pacos* “alpaca” evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018.

Integridad del acrosoma

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Semen congelado	5	38,54		
Semen refrigerado	5		65,60	
Semen fresco	5			79,33
Sig.		1,00	1,00	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

Anexo 8. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para integridad de membrana plasmática de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen. Ayacucho, 2018.

Parámetros estadísticos	Tratamientos		
	Semen fresco	Semen refrigerado	Semen congelado
N	5	5	5
Media	61,48	51,55	24,49
Mediana	61,73	51,60	26,13
Desviación estándar	8,07	10,76	5,64
Mínimo	51,33	38,27	14,60
Máximo	73,00	67,60	28,20
Estadístico de prueba	0,99	0,97	0,72
Sig. Asintótica (bilateral)	0,98	0,88	0,02

Anexo 9. Prueba de Friedman para integridad de membrana plasmática de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018.

Tratamiento	Suma (rangos)	Media (rangos)	N	1	2	3
Semen congelado	5	1	5	A		
Semen refrigerado	10	2	5		B	
Semen fresco	15	3	5			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,050$)

Anexo 10. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para motilidad individual de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”, sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen. Ayacucho, 2018.

Parámetros estadísticos	Tratamientos		
	Semen fresco	Semen refrigerado	Semen congelado
N	5	5	5
Media	71,13	63,67	22,60
Mediana	70,00	63,33	21,67
Desviación estándar	4,60	7,30	5,91
Mínimo	65,67	53,33	15,67
Máximo	78,33	73,33	31,67
Estadístico de prueba	0,92	0,99	0,96
Sig. Asintótica (bilateral)	0,53	0,96	0,82

Anexo 11. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para motilidad individual de espermatozoides vivos de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca”, evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018.

Parámetros estadísticos	Bloques				
	643	9210	12006	13022	S/A
N	3	3	3	3	3
Media	51,11	53,34	50,45	46,33	61,11
Mediana	63,33	66,67	61,67	53,33	73,33
Desviación estándar	27,15	27,54	22,99	27,83	25,62
Mínimo	20,00	21,67	24,00	15,67	31,67
Máximo	70,00	71,67	65,67	70,00	78,33
Estadístico de prueba	0,85	0,82	0,82	0,95	0,83
Sig. Asintótica (bilateral)	0,24	0,17	0,17	0,58	0,19

Anexo 12. Prueba de DBCA de motilidad individual de espermatozoides vivos de cinco machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca” evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018.

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
tratamiento	6828,964	2	3414,48	338,45	0,000
bloqe	357,008	4	89,25	8,85	0,005
Error	80,710	8	10,09		
Total	48558,998	15			

a. R al cuadrado = ,998 (R al cuadrado ajustada = ,997)

Anexo 13. Prueba de comparación de medias de HSD Tukey para la motilidad individual de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” evaluados en tres etapas de conservación del semen. Ayacucho, 2018.

Motilidad espermática

HSD Tukey^a

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Semen congelado	5	22,60	
Semen refrigerado	5		63,67
Semen fresco	5		71,13
Sig.		1,00	0,17

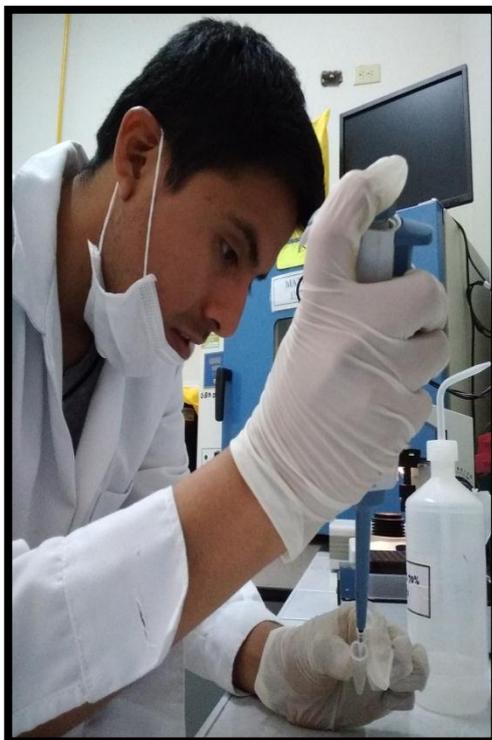
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

Anexo 14. Armado de la vagina artificial y recolección de semen de *Vicugna pacos* “alpaca” de la Estación Experimental Agraria Canaán. Ayacucho, 2018.



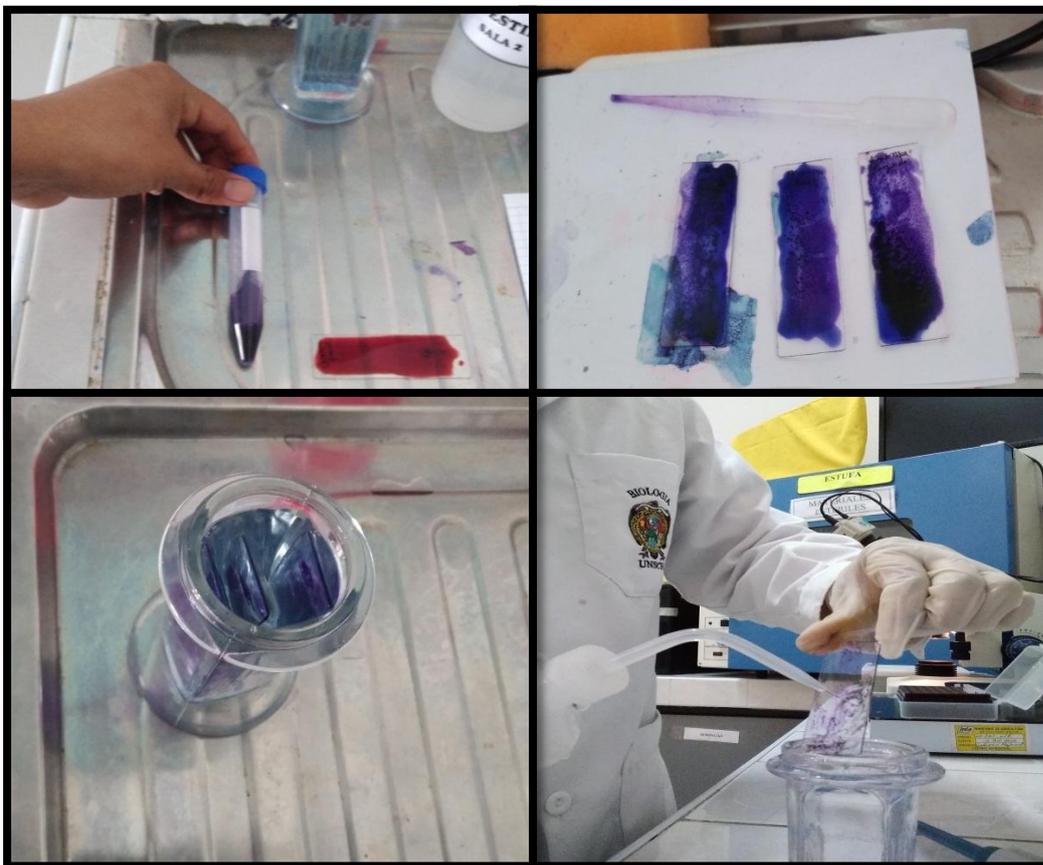
Anexo 15. Procesamiento de muestras de semen de alpaca para su evaluación de integridad del acrosoma y membrana espermática en la Estación Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.



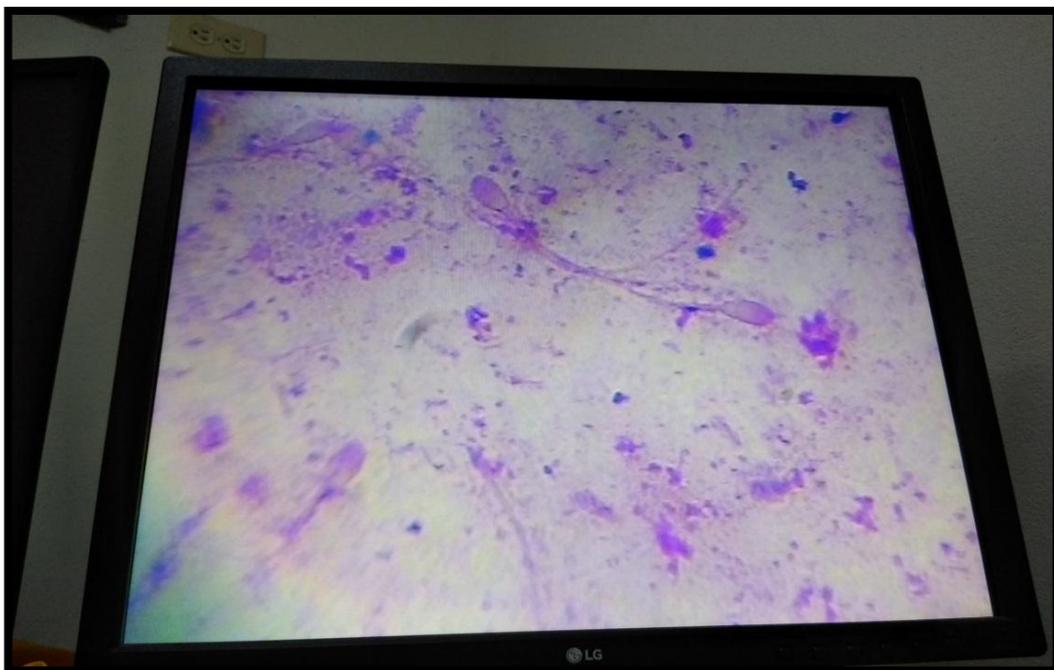
Anexo 16. Preparación de los colorantes azul de tripán, rojo neutro y Giemsa para evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”. Ayacucho, 2018.



Anexo 17. Procesos de la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa para evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” en la Estación Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.



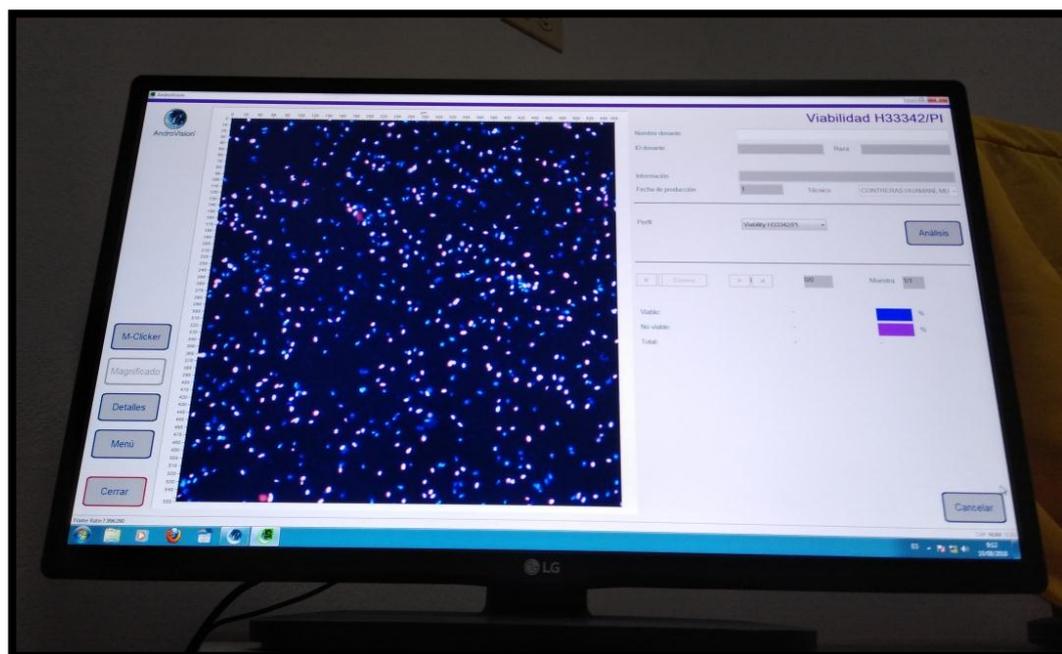
Anexo 18. Observación microscópica de espermatozoides de alpaca vivos y muertos con y sin acrosoma, utilizando la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa en la Estación Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.



Anexo 19. Equipo de AndroVision (Sistema CASA) para la evaluación de la integridad de membrana espermática (viabilidad) en la Estación Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.



Anexo 20. Proceso de preparación y observación microscópica de espermatozoides con membrana intacta y dañada en el equipo de AndroVision (Sistema CASA) usando el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI en la Estación Experimental agraria Canaán. Ayacucho, 2018.



Anexo 21. Matriz de Consistencia

Título: Integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” recuperados de semen fresco, refrigerado y congelado. Ayacucho – 2018

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Existirán diferencias en la integridad acrosomal y en la integridad de membrana plasmática en espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” recuperados de semen fresco refrigerado y congelado?	<p>Objetivos generales: Evaluar la integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de alpaca en semen fresco, refrigerado y congelado.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Determinar la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca usando la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa en semen fresco, refrigerado y congelado. 2. Determinar la integridad de membrana espermática usando la tinción fluorescente de Hoechst 33342/PI con el módulo AndroVision (Sistema CASA), en semen fresco, refrigerado y congelado. 3. Determinar la motilidad espermática en semen fresco, refrigerado y congelado. 4. Evaluar el volumen, concentración y vitalidad espermática de la alpaca 	<p>ANTECEDENTES MARCO CONCEPTUAL Espermatozoide Semen Viabilidad espermática Refrigeración del semen Congelación del semen Acrosoma Membrana espermática Motilidad espermática Integridad de membranas BASES TEÓRICAS <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” Fisiología reproductiva del macho Características seminales Integridad de acrosoma Integridad de membrana espermática Refrigeración del semen Congelación del semen Colorantes evaluar la integridad de acrosoma y membrana espermática AndroVision sistema CASA</p>	<p>Los valores de la integridad acrosomal e integridad de membrana espermática son diferentes en espermatozoides evaluados en semen fresco, refrigerado y congelado de alpaca, por lo cual el proceso de refrigeración y descongelación tienen efecto sobre la membrana espermática y sobre la membrana acrosomal del espermatozoide de alpaca</p>	<p>Variable independiente Etapa de la conservación del semen Indicadores: Semen fresco Semen refrigerado Semen congelado Variable dependiente Integridad acrosomal Integridad de membrana espermática Indicadores: Espermatozoides con membrana intacta (%) Espermatozoides con acrosoma intacto (%)</p>	<p>Tipo de investigación: Básica Nivel de investigación: Experimental básica Diseño: Experimental Muestreo: Aleatorio Técnicas: Observación Determinación Instrumentos: Observación Triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa tinción fluorescente de Hoechst 33342/PI</p>

Autor: Bach. CUEVA HURTADO, Ricardo César Próspero