

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS:

Efecto del tiempo de centrifugación en el gradiente de Percoll sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal de *Vicugna pacos* “alpaca”. Ayacucho - 2023.

Para optar el título profesional de:

BIÓLOGA, ESPECIALIDAD: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. Yedixa Rosalinda QUISPE VILCHEZ

ASESOR:

Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA

COASESOR:

Dr. Mijaíl CONTRERAS HUAMANÍ

AYACUCHO - PERÚ

2025

A Dios por darme el don de la vida.

A mis padres y a mis amigos por
brindarme siempre su apoyo
incondicional.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por haberme acogido en sus aulas durante mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología y en especial mención a mi elegida especialidad de Biotecnología, de igual manera a todos los docentes que me inculcaron valores y conocimientos científicos durante mi carrera universitaria.

Agradezco a la Estación Experimental Agraria Canaán de Ayacucho, Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), al Dr. Mijaíl Contreras Huamaní por haberme permitido usar las instalaciones, equipos y materiales necesarios para hacer posible el presente trabajo de investigación.

Al Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua asesor del presente trabajo por su apoyo y disponibilidad de tiempo para concretizar y finalizar el presente trabajo.

De igual manera agradezco a Dios por darme una familia maravillosa que fue un apoyo incondicional, especialmente a mis queridos padres que son el impulso y la fuerza para seguir y culminar el trabajo de investigación. A todas aquellas personas especiales que llegaron a mi vida y me brindaron su amistad y aportaron sus valiosos conocimientos y consejos contribuyendo en mi deseo de superación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	ix
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	23
3.1. Ubicación de la zona de estudio	23
3.2. Población y muestra	23
3.3. Metodología y colección de datos	24
3.4. Preparación de los reactivos para el análisis seminal	29
3.5. Separación seminal por la gradiente de Percoll a diferentes tiempos de centrifugación	31
3.6. Tipo de investigación	32
3.7. Análisis estadístico	32
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	47
VI. CONCLUSIONES	53
VII. RECOMENDACIONES	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas del semen de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” (n=5; r=4). Los valores están expresados en promedio y desviación estándar INIA - Ayacucho 2023.	34
Tabla 2. Concentración seminal ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” (n=5; r=4), después de la centrifugación a 700 x g. Los valores están expresados en promedio y desviación estándar. INIA - Ayacucho 2023.	35
Tabla 3. Movilidad espermática (%) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” (n=5; r=4), después de la centrifugación a 700 x g. Los valores están expresados en promedio y desviación estándar. INIA - Ayacucho 2023.	37
Tabla 4. Integridad de membrana espermática (%) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” (n=5; r=4), después de la centrifugación a 700 x g. Los valores están expresados en promedio y desviación estándar. INIA - Ayacucho 2023.	39
Tabla 5. Integridad acrosomal (%) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” (n=5; r=4), después de la centrifugación a 700 x g. Los valores expresados en promedio y desviación estándar. INIA - Ayacucho 2023.	41
Tabla 6. Medio base TALP-SPERM 10X para 40 ml.	60
Tabla 7. Medio base de TALP-FIV para 50 ml	60
Tabla 8. Stock de cloruro de magnesio 0.1M para 10 ml.	61
Tabla 9. Stock de cloruro de calcio 1M para 5 ml.	61
Tabla 10. Percoll de 90%.	62
Tabla 11. Percoll de 45%.	62
Tabla 12. Datos generales de las evaluaciones de las muestras seminales de cada ejemplar de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” (n=5; r=4). INIA - Ayacucho.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura del espermatozoide me mamíferos.	11
Figura 2. Organización de la cabeza de espermatozoide de mamífero.	16
Figura 3. Características de las muestras espermáticas sometidas al procesos de triple tinción con, azul de Tripán, Rojo neutro y solución Giemsa.	22
Figura 4. Colecta de semen de alpaca	25
Figura 5. Promedio de la concentración seminal ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) en los tres tiempos de centrifugación (min) a 700 x g de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA - Ayacucho 2023.	36
Figura 6. Promedio de la movilidad espermática (%) en los tres tiempos de centrifugación (min) a 700 x g de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA - Ayacucho 2023.	38
Figura 7. Promedio de la integridad de membrana espermática (%) en los tiempos de centrifugación (min) a 700 x g de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA - Ayacucho 2023.	40
Figura 8. Promedio de la integridad acrosomal (%) en los tres tiempos de centrifugación (min) a 700 x g de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA - Ayacucho 2023.	42
Figura 9. Comparación de la muestra control con los tres tiempos de centrifugación (min) a 700 x g de la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA - Ayacucho 2023.	43
Figura 10. Comparación de las muestras control con los tres tiempos de centrifugación (min) a 700 x g de la movilidad (%), integridad de membrana espermática (%) e integridad acrosomal (%) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA - Ayacucho 2023.	44
Figura 10. Espermatozoides teñidos con el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI, analizados con el programa AndroVisión sistema CASA. INIA - Ayacucho 2023.	45
Figura 11. Espermatozoides teñidos con triple tinción azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa. INIA Ayacucho 2023.	46

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Preparación de los medios de cultivo	60
Anexo 2. Preparación de los Stock	61
Anexo 3. Preparación de Percoll de 90% y 45%	62
Anexo 4. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	64
Anexo 5. Prueba de igualdad de varianzas por el método de Levene de la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	65
Anexo 6. Prueba de análisis de Varianza ANVA de un DBCA para la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	66
Anexo 7. Prueba de comparación por pareja utilizando el método de Tukey y un nivel de confianza de 95% para la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) espermática de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	66
Anexo 8. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para la movilidad (%) de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	67
Anexo 9. Prueba de igualdad de varianzas por el método de Bartlett de la movilidad (%) de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	68
Anexo 10. Prueba de análisis de Varianza ANVA de un DBCA para la concentración de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	69
Anexo 11. Prueba de comparación por pareja utilizando el método de Tukey y un nivel de confianza de 95% para la movilidad (%) de espermatozoide de <i>Vicugna paco</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	69
Anexo 12. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para la integridad de membrana espermática (%) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	70
Anexo 13. Prueba de igualdad de varianzas por el método de Bartlett de la integridad de membrana espermática (%) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	71
Anexo 14. Prueba de análisis de Varianza ANVA de un DBCA para la integridad de membrana espermática (%) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	72

Anexo 15. Prueba de comparación por pareja utilizando el método de Tukey y un nivel de confianza de 95% para la integridad de membrana espermática de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, INIA Ayacucho 2023.	72
Anexo 16. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para la integridad acrosomal (%) espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	73
Anexo 17. Prueba de igualdad de varianzas por el método de Bartlett de la integridad acrosomal (%) de espermatozoide de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	74
Anexo 18. Prueba de análisis de Varianza ANVA de un DBCA para la integridad acrosomal (%) de espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA Ayacucho 2023.	75
Anexo 19. Prueba de comparación por pareja utilizando el método de Tukey y un nivel de confianza de 95% para la integridad acrosomal de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” INIA Ayacucho 2023.	75
Anexo 20. Flujograma del análisis macroscópico y microscópico del semen de alpaca en ” INIA Ayacucho 2023.	76
Anexo 21. Proceso de gradiente de Percoll y centrifugación para la evaluación de los parámetros espermáticos de alpaca en INIA Ayacucho 2023.	77
Anexo 22. Matriz de consistencia	78

RESUMEN

Una de las limitantes en la Inseminación Artificial (IA) es la obtención de espermatozoides de alta calidad ya que para la Fertilización *In Vitro* (FIV) es fundamental contar con espermatozoides capaces de fertilizar el ovocito, por ello se realiza una previa capacitación para seleccionar aquellos aptos y en cuyo proceso estos sufren un estrés físico y químico, que puede ocasionar daños en la estructura de la membrana espermática y pérdida del acrosoma. En el presente trabajo de investigación se tuvo como objetivo evaluar el efecto del tiempo de centrifugación en el gradiente de Percoll sobre la movilidad, integridad de la membrana espermática y acrosomal en espermatozoides de alpaca. Se usó la triple tinción azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa para la evaluación de la integridad acrosomal, y la tinción fluorescente de Hoechst 33342/PI para evaluar la integridad de membrana espermática. La concentración y movilidad, fueron analizados con el programa AndroVisión (sistema CASA). Se trabajó con 20 muestras de semen colectadas de cinco alpacas machos (n=5) mediante vagina artificial con cuatro repeticiones para cada uno (r=4) y la evaluación de los tiempos de centrifugación en el gradiente de Percoll fueron de 10, 20 y 30 min a 700 x g. El porcentaje promedio de la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$), movilidad (%), integridad de membrana espermática (%) y acrosomal (%) antes de la centrifugación fueron de 151.95×10^6 , 76.81%, 63.46% y 73.47%, mientras que los promedios de la concentración espermática centrifugados por 10, 20 y 30 min fueron de 169.40×10^6 , 170.84×10^6 y 102.03×10^6 , lo cual refleja que en la centrifugación por 20 min hay una diferencia estadística significativa con respecto al control, para la movilidad de los espermatozoides centrifugados por 10, 20 y 30 min respectivamente, fueron de 82.87%, 71.63% y 34.13%, observándose una diferencia estadística significativa entre sí y con la muestra control. El porcentaje de integridad de membrana espermática intacta tuvo un promedio de 66.64%, 56.31% y 22.69% para espermatozoides centrifugados en 10, 20 y 30 min respectivamente, observándose una diferencia estadística significativa entre sí. Para el caso de la integridad acrosomal, el porcentaje promedio fue de 83.04%, 66.45% y 33.86%; respectivamente, para cada tiempo, existiendo diferencia significativa entre los resultados y con la muestra control. La movilidad, la integridad de membrana espermática y acrosomal obtuvieron mejores resultados para una selección de espermatozoides mediante el gradiente de Percoll centrifugados por 10 min, mientras que la concentración refleja mejores resultados a una centrifugación a 20 min, pero a 30 min se obtuvo una drástica reducción. En conclusión, una centrifugación prolongada causa daños en la movilidad de los espermatozoides y también produce ruptura de la membrana espermática y acrosomal en los espermatozoides.

Palabra clave: Gradiente de Percoll, centrifugación, integridad de membrana, integridad acrosomal.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes retos que afronta la crianza de Camélidos Sudamericanos (CSA) es su reproducción y la obtención de fibra de calidad, lo que ha impulsado las investigaciones y programas de mejoramiento genético; sin embargo, sus características reproductivas dan un rendimiento pobre en comparación a otras especies domésticas. Esta deficiencia reproductiva de los camélidos es el principal factor para el desarrollo de nuevas opciones tecnológicas, y poder fomentar programas de mejora genética de estos animales y hacer de su crianza una actividad competitiva y rentable para el desarrollo de las comunidades altoandinas y del país.

La Fertilización *In Vitro* (FIV) en CSA surgió como una tecnología para obtener tasas altas de embriones y solucionar la problemática de la deficiencia reproductiva. Es una técnica de reproducción asistida, que consiste en la capacitación de espermatozoides para fecundar ovocitos maduros con el objetivo de producir embriones que luego serán transferidos a una hembra receptora, aplicando semen seleccionado de nivel superior. Dicha capacitación de espermatozoides es un proceso de selección, donde los espermatozoides experimentan un estrés físico y químico y desde luego durante la separación espermática ya sea haciendo uso de la técnica del gradiente de Percoll u otras técnicas, los espermatozoides son sometidos a un proceso de lavado y separación por centrifugación lo que puede ocasionar daños en la membrana plasmática que produciría variación en su permeabilidad, lo que a su vez produce alteraciones de sus funciones metabólicas, deteriorando la movilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides, también se puede generar daño en el acrosoma, que sería esta la causa principal para una baja fertilización *in vitro* o *in vivo* en esta especie donde también afecta significativamente en la fragmentación del DNA. (Restrepo et al., 2016).

La mayoría de los estudios realizados se fundamentan en evitar daños durante el proceso de selección y separación espermática que se pueden prevenir parcialmente o evitar aplicando parámetros de análisis seminal investigados previamente con mejores resultados, en tal sentido, la evaluación de estos parámetros representa indicadores fundamentales para el proceso de fecundación. El efecto de la centrifugación depende de la fuerza, tiempo y el medio utilizado, algunos estudios indican que reduce la movilidad, vitalidad y el potencial de membrana, así como el DNA. Por tanto, se recomienda optimizar las condiciones de centrifugación y utilizar medios protectores que minimicen el estrés oxidativo y daño celular (Giuliano et al., 2010).

Por ello, los métodos y tinciones que se usan para la evaluación deben ser confiables y eficientes como el uso del colorante Hoechst 33342/PI para evaluar la integridad de la membrana espermática y la triple tinción con azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa para la integridad acrosomal (Urrego et al., 2008). En consecuencia, en la presente investigación se evaluó el efecto del tiempo de centrifugación con gradiente de Percoll sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal, con miras a considerarlo como un nuevo parámetro en el análisis seminal.

Se propone los objetivos siguientes:

Objetivo general

Evaluar el efecto del tiempo de centrifugación en el gradiente de Percoll sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Objetivos específicos

1. Evaluar los parámetros de movilidad espermática luego de someter a diferentes tiempos de centrifugación por gradiente de Percoll.
2. Evaluar la integridad de la membrana espermática luego de someter a diferentes tiempos de centrifugación por gradiente de Percoll.
3. Evaluar la integridad de la membrana acrosomal luego de someter a diferentes tiempos de centrifugación por gradiente de Percoll.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Urrego en el año 2008, en una investigación titulada Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el DNA de espermatozoides bovinos realizada en Colombia, determinó si la integridad de la membrana plasmática y del DNA espermático pueden ser perjudicados por la centrifugación durante el proceso de separación mediante gradiente de Percoll, concluyó que, efectivamente la centrifugación de los espermatozoides durante 10, 20 y 45 min a 700 x *g* tiene un efecto deletéreo sobre el DNA de los espermatozoides y que la centrifugación por un tiempo de 45 min, además de causar daño en el DNA produce una pérdida en la integridad de membrana plasmática. Para ello, el estudio utilizó como control negativo espermatozoides no centrifugados y como control positivo espermatozoides sometidos a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), evaluándose la integridad de membrana espermática mediante la prueba hipoosmótica (HOST) y para evaluar la fragmentación del DNA se utilizó el ensayo cometa. Los resultados obtenidos constataron que la centrifugación durante 10, 30 y 45 min, a 700 x *g* presentó un efecto estadísticamente significativo sobre el daño en el DNA respecto a aquellos espermatozoides no centrifugados ($p < 0.05$), además existe una diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los espermatozoides centrifugados a diferentes tiempos con respecto al control positivo con (H₂O₂), pero el gradiente diferencial de Percoll a menores tiempos (10 y 30 min) no tuvo diferencia estadística significativa entre los espermatozoides centrifugados y no centrifugados pero si en espermatozoides centrifugados por 45 min, evidenciándose que la centrifugación a mayor tiempo además de causar

daño en el DNA también produce la pérdida de la integridad de la membrana espermática.

Restrepo et al. (2016), evaluó el efecto de la centrifugación sobre la integridad y funcionalidad de espermatozoides equinos en Colombia, las muestras obtenidas de semen, tres fueron centrifugadas de forma separada por 600, 1200 y 1800 x *g* durante 10 min y la cuarta muestra no fue centrifugada (control). Se evaluó la movilidad total y progresiva, el potencial de membrana mitocondrial, la vitalidad y la integridad del acrosoma. Los resultados fueron que, en el semen de equino, la centrifugación es intrínsecamente nociva y puede generar variaciones celulares y que la fuerza y tiempo de centrifugación prolongada es perjudicial sobre los distintos parámetros de integridad y funcionalidad espermática, para todos los tratamientos (600 x *g*, 1200 x *g* y 1800 x *g*) por 10 min respecto al semen no centrifugado. Se observó incluso que la menor fuerza de centrifugación produjo una disminución en la integridad y funcionalidad espermática y una centrifugación a 1000 x *g* durante 20 min, también se redujeron los porcentajes de movilidad y la velocidad de movimiento. De este estudio se deduce que los niveles de fuerza y tiempo de centrifugación logran alterar la movilidad espermática y el potencial de la membrana interna mitocondrial de los espermatozoides equinos.

Samudio, (2020) en su trabajo de investigación en Honduras, evaluó el efecto de diferentes tiempos de centrifugación utilizando el gradiente de Percoll de 45 y 90% sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante la prueba de HOST. Como control positivo se usó semen descongelado y los tratamientos fueron semen descongelado y centrifugado en gradiente Percoll a lo largo de 5, 10, 15 minutos a 200 x *g*, los resultados concluyen que no hay diferencia estadística significativa entre los tres tratamientos, pero si con respecto al control que fue mucho mayor. Por tanto, la centrifugación en estos rangos de tiempo no afecta la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos. Para el caso de la Movilidad Individual (MI) y la viabilidad los valores obtenidos fueron mayores al 90% y 70% respectivamente, entre los tratamientos, por tanto, no hay diferencia estadística significativa entre sí, pero si con respecto a la muestra control (69.5%) (56.63%). En conclusión, la práctica de cualquiera de los tiempos de centrifugación (5, 10 y 15 minutos a 200 x *g*) en el gradiente de Percoll 45 y 90% mejora la endosmosis positiva y en cuanto a la movilidad

individual y la viabilidad con respecto al control dan como resultado valores superiores.

Mena, (2014) en su investigación realizada en Ecuador, tuvo como objetivo comparar el impacto de la centrifugación de semen bovino en gradiente Percoll de 45 y 90% y la otra con adición de bicarbonato de sodio para incrementar la viabilidad de espermatozoides X para poder tener crías hembras en vacas primerizas, aquellos espermatozoides sometidos a las columnas de Percoll se centrifugó a 1000 x g por 10 min y para el otro tratamiento además de centrifugar por gradiente Percoll se adicionó una solución de bicarbonato de sodio a una dosis por vaca. Los resultados demuestran que en el tratamiento 1 (semen centrifugado por gradiente Percoll de 90 y 45%), de 30 vacas inseminadas hubo concepción en 19 de ellas, 5 gestaciones de crías machos y 14 de hembras. En el tratamiento 2 (semen centrifugado en Percoll a 90 y 45% con adición de bicarbonato de sodio), 20 vacas de las 30 inseminadas, se obtuvo 2 gestaciones de crías machos y 18 de hembras. Se concluyó que el uso de la centrifugación por gradiente Percoll y añadiendo agentes protectores además de seleccionar semen de calidad garantiza la obtención de embriones seleccionados según el sexo y haciendo adición de soluciones como el bicarbonato de sodio se logra alterar el pH de los fluidos uterinos para incrementar en número de crías hembras.

Parrish et al., (1995) en su investigación realizada en Virginia, evaluó el efecto de la separación de espermatozoides bovinos congelados y descongelados en un gradiente de Percoll de 45 y 90% y luego se comparó la separación seminal mediante swim - up para fertilizar ovocitos *in vitro*. Los resultados arrojaron que la centrifugación durante 15 minutos a 700 x g en el gradiente Percoll fue suficiente para obtener una recuperación óptima de los espermatozoides móviles que se encontraban en la parte inferior del gradiente, mientras que el porcentaje de recuperación de espermatozoides mediante swim – up fue mucho menor, no obstante, se observó una diferencia estadística significativa de aquellos espermatozoides seleccionados mediante swim-up que penetraron ovocitos en un 74% con respecto a aquellos seleccionados mediante el gradiente de Percoll que penetraron ovocitos en un 52%. Sin embargo, se encontró que los espermatozoides separados mediante Percoll no es la causa de la disminución de la penetración a los ovocitos por parte de estos espermatozoides, ya que se pudo evidenciar que en 2 a 3 toros probados, la disminución de la penetración a los

ovocitos por parte de los espermatozoides separados por Percoll podría superarse aumentando la concentración de los espermatozoides durante la fertilización.

Heutelbeck et al., (2015) en su trabajo de investigación en Alemania, tuvo como objetivo evaluar si la selección de espermatozoides en equinos mediante centrifugación de densidad a $700 \times g$ por 10 min, produce mayores tasas de supervivencia cuando se lleva a cabo después de un día de almacenamiento a 5°C . Se puso especial atención en comparar la centrifugación del día de la recolección de semen con la centrifugación después de un día refrigerado. La morfología y la movilidad que presentaron el esperma, así como la integridad de la membrana y el acrosoma se evaluaron antes y después de la centrifugación, se encontró que tanto en el procesamiento de centrifugación de dos capas como el de una sola capa antes del almacenamiento dieron como resultado porcentajes más altos de espermatozoides morfológicamente normales y móviles con mayor integridad de la membrana y acrosoma, en comparación con la centrifugación de las muestras diluidas. El procesamiento de centrifugación de los espermatozoides directamente después de la recolección del semen dió como resultado los porcentajes más altos con membrana plasmática intactos con respecto, a aquellos centrifugados después de la descongelación. En conclusión, para la criopreservación retardada, es mejor realizar la centrifugación por densidad directamente después de la recolección ya que muestra mayor tolerancia al efecto de la centrifugación en la movilidad y en la integridad de sus membranas.

Carretero et al., (2015) en su investigación experimental en Buenos Aires, realizado en espermatozoides de llama, se estipuló el estado acrosomal mediante dos técnicas de microscopia de campo claro. La primera se usó para estimar la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal haciendo uso de la tinción con Coomassie Blue en muestras de semen fresco, incubado con colagenasa, semen refrigerado y semen congelado-descongelado, la otra técnica es la técnica de Triple Tinción (TT), que permite estipular el estado acrosomal y la viabilidad espermática al mismo tiempo, hay 4 patrones que se usan en la TT Espermatozoides vivos con acrosoma intacto (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma púrpura-violeta), por otro lado los espermatozoides vivos con acrosoma dañado (región post acrosomal celeste o azul claro y acrosoma lavanda o translúcido); espermatozoides muertos con acrosoma intacto (región post acrosomal azul oscuro-violeta y acrosoma púrpura-violeta), los

espermatozoides muertos con acrosoma dañado (región post acrosomal azul oscuro y acrosoma violeta claro o translúcido). En conclusión, el análisis de múltiples características seminales es importante para determinar los posibles daños a los espermatozoides que causan los diferentes procesos *IN VITRO*.

Ángel et al., (2009) en su estudio de investigación en Colombia, evaluó el efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el DNA de semen bovino sexado haciendo uso de la prueba del test hiposmótico (HOST) y el ensayo cometa. Las muestras de semen fueron sometidas por gradiente de Percoll de 45% y 90%, a una centrifugación de 700 x g por 10 min. Los tratamientos usados fueron 3, espermatozoides sin centrifugar (tratamiento 1), espermatozoides lavados y seleccionados mediante Percoll (tratamiento 2) y espermatozoides sometidos a estrés oxidativo con H₂O₂ (tratamiento 3). En los resultados se observó que hay diferencia ($p \geq 0.05$) entre el tratamiento 1 y 2, pero no hay una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre el semen centrifugado y el semen no centrifugado, con respecto al control positivo, en conclusión, el estudio demuestra que la técnica de acondicionamiento, a través de Percoll no altera la integridad de la membrana plasmática y tampoco tiene un efecto deletéreo en el DNA bajo ciertas condiciones como 10 minutos de centrifugación a 700 x g.

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Semen

El semen es la suspensión celular líquida que comprende a los espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor del macho, la fracción líquida de dicha suspensión, se le percibe como el plasma seminal (Hafez et al., 2007). El semen en camélidos es sumamente viscoso y una baja concentración de espermatozoides, esta viscosidad es el mayor reto en la tecnología de reproducción asistida de CSA (Ciprian, 2019).

2.2.2. Movilidad de los espermatozoides

Los espermatozoides móviles se les considera a aquellos que presentan un movimiento activo, es un indicador más cercano para medir la viabilidad de los espermatozoides y la observación visual es el criterio comúnmente usado para la estimación (Cueva, 2018).

En el caso de camélidos se le denomina movilidad individual debido a la elevada viscosidad que presenta el semen y el tipo de movimiento es oscilatorio y muy lento, esta prueba se usa para evaluar la calidad del semen y a mayor porcentaje

de movilidad mayor índice de fertilidad de los espermatozoides ya que aumenta la capacidad de penetración al ovocito (Contreras, 2018).

2.2.3. Integridad de las membranas

Para la valoración de la integridad funcional de membranas se usa pruebas específicas para ver el mantenimiento intacto, sin lesiones o daños de la membrana. La integridad de la membrana plasmática y acrosomal son los indicadores de valoración seminal más revisados por su importante rol en la fecundación y ser responsable de la interacción entre células para que dicho proceso ocurra (Cueva, 2018).

2.2.3.1. Membrana espermática

Es aquella membrana que engloba todo el espermatozoide protegiendo y separando del ámbito exterior, principalmente compuesto por una bicapa lipídica que se caracteriza por tener una parte hidrofílica y otra hidrofóbica. Dicha membrana tiene un importante rol en los procesos de reconocimiento celular y adhesión durante la penetración del espermatozoide al ovocito y la lesión o daño influye directamente en la fertilidad del macho (Rubio et al., 2009).

2.2.3.2. Membrana acrosomal

Los espermatozoides poseen una doble membrana acrosomal que deriva del complejo de Golgi y contiene distintas enzimas hidrolíticas que contribuyen en la penetración del espermatozoide al ovocito al ser responsable de la proteólisis de la zona pelúcida durante la fecundación; por tal motivo, la evaluación seminal hace hincapié en la valoración de la lesión o daño de la membrana ya que altos porcentajes de espermatozoide con el acrosoma dañado conlleva a la baja tasa de fertilidad, incluso investigaciones indican que solo tales espermatozoides con acrosoma intacto pueden fusionarse a la membrana de la zona pelúcida (Hidalgo et al., 2005).

2.2.4. Gradiente Percoll

Es una técnica de capacitación espermática que permite separar espermatozoides con capacidad de fecundar el óvulo, se basa en la sedimentación-centrifugación en virtud a la velocidad potencial de los espermatozoides según sus gradientes de densidad. Esta técnica permite seleccionar espermatozoides que puedan dominar la dificultad que presenta los gradientes de densidad y arribar al fondo mediante la fuerza de la centrifugación, los espermatozoides muertos o con baja movilidad

van quedando en las fases del gradiente, por ello, esta técnica es una de las más usadas en el campo de la reproducción asistida en animales (Salazar, 2019).

El Percoll está compuesto por una solución acuosa de silica coloidal recubierta por polivinilpirrolidona (PVP) y diatrizoato de meglumina, que se mezcla con una solución de sacarosa para crear una gradiente de densidad (Álvarez, 2005).

2.2.5. Centrifugación seminal

Es un procedimiento para aislar espermatozoides de las demás partículas que se encuentran en el plasma seminal, si bien la centrifugación es un proceso imperativo para la separación seminal, no es un proceso inocuo al espermatozoide ya que, altos niveles o tiempos prolongados de centrifugación puede incitar la peroxidación lipídica de las membranas espermáticas, por ello, se sugiere trabajar con fuerzas de centrifugación sutiles e intervalos de tiempo cortos. Otro efecto de la centrifugación es que puede concebir daño a la membrana plasmática de los gametos masculinos aumentando la producción basal de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), los metabolitos producidos durante este proceso generan radicales libres citotóxicos que ocasionan daño e inducen una pérdida de la función espermática, puesto que anula las funciones necesarias para permitir la fertilización del ovocito (Ochoa, 2016).

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Espermatozoide

El espermatozoide son células elongadas altamente perceptibles, que son resultado final de un proceso complejo altamente auténtico, donde existen fracciones y reorganización estructurales celulares que ocurren en los testículos, llamado espermatogénesis, son original y autónoma que forman parte del soma que tienen el deber de mantener la identidad de los organismos diploides abasteciendo el 50% del material genético nuclear a su descendencia (Gosálvez et al., 2015).

Los espermatozoides están conformados por la cabeza que comprende el núcleo, algunas estructuras del citoesqueleto y citoplasma, la cola o flagelo que contiene el mecanismo para la movilidad celular y el cuello que se une a la cabeza y a la cola (flagelo) del espermatozoide (Hafez et al., 2007).

- **Cabeza espermática**

Posee forma aplanada oval, donde está el núcleo con la cromatina altamente compactada que contiene el DNA de tipo haploide, ya que tiene la mitad de cromosomas del núcleo de las células somáticas de la misma especie, también se encuentran las proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas (Hafez et al., 2007).

El acrosoma se ubica en el extremo anterior del núcleo espermático, se encuentra como un saco membranoso de doble capa, membrana acrosomal interna y membrana acrosomal externa, que se forma a partir del complejo de Golgi de las espermáticas y contienen acrosina (isoenzima específica del espermatozoide que facilita la fecundación), hialuronidasa y otras enzimas hidrolíticas que cumplen una función en la penetración de la zona pelúcida del ovocito durante la fase de la fecundación; el segmento ecuatorial del acrosoma es fundamental al igual con el segmento anterior de la región posacrosómica ya que durante la fecundación se fusionan con la membrana del ovocito. Por otra parte, las lesiones en la membrana del acrosoma son irreversibles, ya que tienen causas diversas entre las que se encuentran cambios osmóticos, cambios de pH y shock térmico que pueden causar una pérdida prematura del acrosoma de los espermatozoides (Hafez et al., 2007).

- **Cuello del espermatozoide**

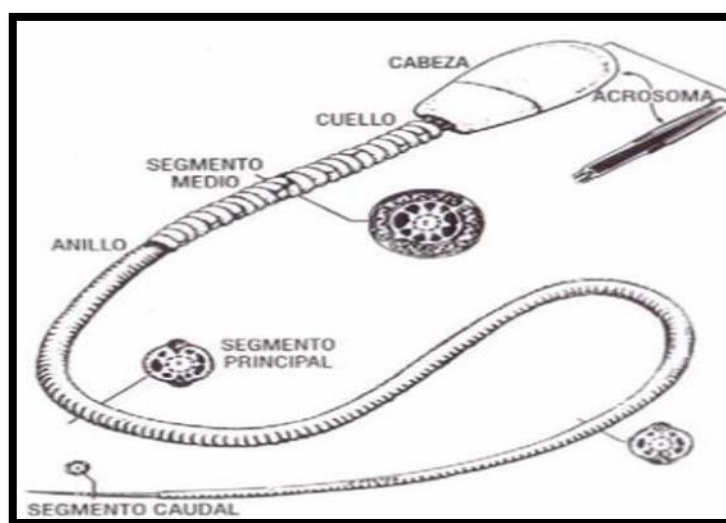
Forma la unión de la cabeza y el flagelo, constituido por fibras densas, mitocondrias, el centriolo proximal y una gama de columnas segmentadas que da elasticidad a los espermatozoides, desde el centriolo se originan las fibras y microtúbulos que forman la cola y sirve como un centro operacional en la formación del axonema y las columnas estriadas (Contreras, 2018).

- **Flagelo del espermatozoide**

Es el propulsor del movimiento y lo constituyen 3 regiones: el segmento intermedio, el segmento principal y el caudal o terminal. El segmento intermedio abarca entre el cuello y el anillo citoplasmático y se caracteriza por la presencia de una doble hélice de mitocondrias, causantes del metabolismo energético y de la regulación de la muerte celular por ello, es el principal surtidor de energía para la movilidad espermática; el segmento intermedio junto con toda la longitud de la cola abarca el axonema. El axonema se integra de nueve pares de microtúbulos longitudinales formando fibras densas que rodean el axonema (Hafez et al., 2007).

El segmento principal, que continua en sentido posterior desde el anillo citoplasmático hasta casi el vértice de la cola, constituye la porción mayor de la cola, está constituido por el axonema asociadas a fibras densas que van reduciendo su tamaño hasta desaparecer al final del segmento principal. El segmento caudal o terminal constituye la parte final de la cola y contiene el axonema central sin vaina fibrosa envuelto por la membrana plasmática (Hafez et al., 2007).

Figura 1. Estructura del espermatozoide de mamíferos (Hafez et al., 2007).



2.3.2. Características del semen de alpaca

El plasma seminal de los camélidos posee una composición bioquímica que contiene calcio, cloruros, proteínas, lípidos y glucosa en concentraciones parecidas a los examinados en el semen de carnero y toro, sin embargo, la concentración de la fructuosa y el ácido cítrico es mucho menor en el plasma seminal de las alpacas y los camellos, es probable que se deba a la carencia de las glándulas vesiculares que son la principal fuente de ácido cítrico y la fructuosa en distintas especies. El semen en camélidos es sumamente viscoso y una baja concentración de espermatozoides, esta viscosidad es el principal reto en la tecnología de reproducción asistida de CSA (Ciprian, 2019).

2.3.2.1. Características macroscópicas

a) Color

El color de los eyaculados permuta de blanco lechoso a blanco translúcido, según la concentración de espermatozoides y la magnitud de contaminación con otros fluidos que pueden a ver en la eyaculación, la tonalidad crema es un indicativo de

la existencia de altas concentraciones de espermatozoides en el eyaculado (Ciprian, 2019).

b) Volumen

El volumen de semen recibido se aprecia en un tubo colector graduado, y se observa que cambia según el estado fisiológico del macho, la edad, raza, alimentación, ritmode colección y tipo de colección. En camélidos poco más o menos el 85% de la eyaculación es plasma seminal y el 15% restante son células del espermatozoide, en alpacas el volumen encontrado oscila entre 1 a 4 mL (Cueva, 2018).

c) Viscosidad y filancia

Esta característica es habitual en semen de camélidos que le confiere un aspecto similar a un gel obstaculizando una combinación homogénea del semen con el diluctor, lo que restringe el contacto entre la membrana del espermatozoide y los componentes crioprotectores que se usan en la congelación (Ciprian, 2019).

2.3.2.2. Características microscópicas

La estimación de estas características es importante para la activación de planes de manejo reproductivo y hacer un cálculo eficiente principalmente en la valoración de la movilidad, la morfología de espermatozoides y el número absoluto de espermatozoides (Giuliano et al., 2010).

a) Concentración espermática

La concentración se refleja en la proporción de espermatozoides por unidad de volumen (millones por mililitro de eyaculado esp/ml), la concentración en alpacas permuta de 30 000 a 150 millones de espermatozoides por ml. Uno de los métodos más aceptados para la estimación de la concentración en una muestra seminal es la microscopía óptica, aplicando el método hemocitométrico, haciendo uso de una cámara de Neubauer, Burker o Thoma para el recuento. El otro método se basa en la aplicación de sistemas computarizados de recuento celular en tiempo real, además el sistema convida una amplia gama de índices cinéticos (Ciprian, 2019).

b) Movilidad

La movilidad de los espermatozoides es significativa en la evaluación para apreciar la calidad del semen, estudios demuestran que el semen recibido por vagina artificial en alpacas no muestra movilidad total, por tal motivo, es mejor referirse como movilidad individual con un desplazamiento oscilatorio y muy lento debido a la viscosidad del semen. La evaluación debe ser inminente a la colección

para apreciar la magnitud del movimiento espermático, el diseño más usado para la apreciación de la movilidad es la valoración subjetiva, que consiste en estimar el porcentaje de espermatozoides móviles, así como el prototipo de movimiento que presenta (Contreras, 2018).

Por otro lado, también se realiza la evaluación de la movilidad mediante el uso del sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), que consta de varias unidades independientes que se conecta a un microscopio y envía la imagen a un monitor de TV, donde el analizador digital captura imágenes mediante fotografías de cada campo microscópico seleccionado y usando un software margina a los espermatozoides de otras partículas que pueden estar presentes para determinar la movilidad de acuerdo a su velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual (Serrano, 2018).

c) Integridad de membrana espermática

La membrana es una estructura dinámica que envuelve a todo el espermatozoide, permanece intacta, menos en el área del acrosoma previo a la fertilización o como producto de la muerte del espermatozoide, se implica en el reconocimiento y transporte de moléculas, estas funciones permiten al espermatozoide adaptar su metabolismo al medio periférico y activar un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito (Hidalgo et al., 2005).

Estructuralmente compuesto por tres zonas: una bicapa lipídica que actúa como barrera, una interfase de fosfolípidos, agua y glicocáliz. La bicapa lipídica se subdivide en fosfolípidos polares, que se caracterizan por poseer cabezas polares hidrofílicas, se sitúa exteriormente y las cadenas de ácidos grasos están adiestradas internamente unas a otras ya que actúan como colas hidrofóbicas. La mayoría de los fosfolípidos más frecuentes son la fosfatidilcolina (actúa como cabeza hidrofílica), también se encuentran los colesteroles, el grado de fluidez de la membrana depende de su composición fosfolipídica principalmente del colesterol y de la naturaleza de las colas carbonadas. El colesterol, por consiguiente, actúa junto con las proteínas integrales presentes en la membrana como un estabilizador garantizando una configuración laminar de los fosfolípidos y de la bicapa, las proteínas cumplen muchas funciones; algunas contribuyen en el anclaje de la membrana a macromoléculas presentes, otros actúan como receptores de señales químicas y algunos como enzimas que catalizan reacciones

específicas (Cueva, 2018).

La glicocálix es una capa externa compuesto por hidratos de carbono, contribuye a proteger la superficie de las células de agresiones mecánicas y químicas, además tiene un papel importante en los procesos de reconocimiento y adhesión celular y en la permeabilidad celular. En la glicocálix encontramos uniones de proteínas periféricas que actúan como estabilizadores del espermatozoide durante su tránsito por el tracto masculino y femenino (Cueva, 2018).

La membrana espermática íntegra cumple funciones importantes que permiten que el espermatozoide ajuste su metabolismo al medio circundante concediendo un sistema molecular para el reconocimiento y unión a la zona pelúcida, penetración y fusión con el ovocito en el transcurso de la fecundación. La estimación morfológica o estructural del espermatozoide, hace relieve en la valoración del grado de lesión en la membrana plasmática ya que un espermatozoide con membrana dañada no es capaz de mantener las concentraciones citoplasmáticas de iones y de cofactores fundamentales para realizar la contracción y movimiento flagelar, además esta integridad es importante para una adecuada capacitación y reacción acrosómica, por tanto, influye en la fertilidad del macho (Rubio et al., 2009).

Dentro de las pruebas desarrolladas, se encuentra el test de endosmosis, que se basan en la capacidad del espermatozoide para percibir agua en un medio hiposmótico y que la hinchazón osmótica está afiliada en el enrollamiento de la cola del espermatozoide y que se desenrolla en un medio isosmótico, por otro lado, se desarrollaron tinciones vitales fluorescentes como el Hoescht 33342/Ioduro de propidio, que pueden fraccionarse en dos grupos: permeables (tiñen las células vivas) y no permeables (tiñen las células muertas). La irradiación de la fluorescencia con la tinción de células vivas precisa de las bombas iónicas funcionales que se encuentran solo en las células viables, por lo tanto, son criterios de la integridad de la membrana plasmática (Sánchez, 2016).

d) Integridad del acrosoma espermático

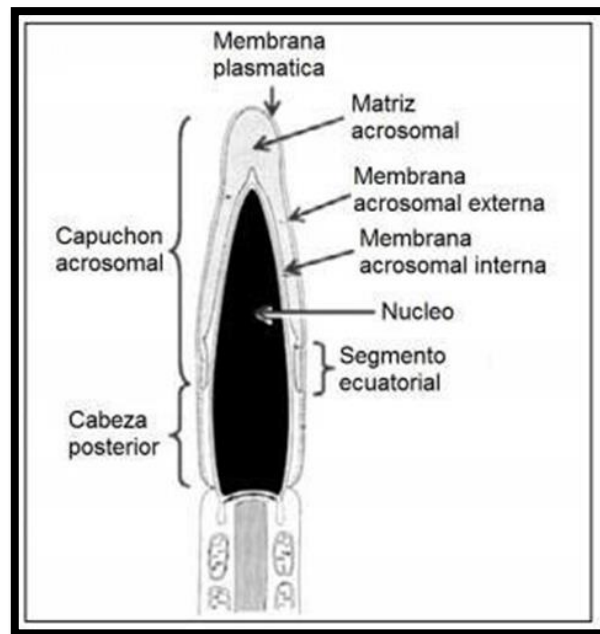
La importancia de la estimación de este componente espermático es intrínseca ya que juega un rol fundamental en el suceso de la fecundación del ovocito. El acrosoma es un organelo membranoso de doble capa derivado del complejo de Golgi, que se ubica en la zona apical de la cabeza espermática que consta de una membrana acrosomal interna que es continua a la membrana acrosomal externa,

durante la reacción acrosomal existe una fusión entre la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática, dando como resultado una liberación del contenido acrosomal al medio extracelular (Pérez et al., 2020).

En espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas capacidades, se distingue tres regiones en la cabeza: la zona acrosomal con un borde apical, la zona posacrosomal, y el segmento ecuatorial entre ambas. Durante la reacción acrosomal intervienen una serie de eventos y cambios bioquímicos y fisiológicos, que involucran muchas enzimas, que están presente en el acrosoma, el más nombrado es la acrosina, que pertenece a la superfamilia de la serina proteasa que solo está presente en las células espermáticas; esta contribuye en la penetración del espermatozoide en el cigoto al ser la responsable de la proteólisis en la zona pelúcida, otra enzima presente es la hialuronidasa específica del espermatozoide, variedades de enzimas hidrolíticas, que cumplen un rol necesario para deshacer la conformación de la zona pelúcida y posibilitar el ingreso al espacio perivitelino y péptidos del acrosoma. La glicoproteína ZP3 presente en la zona pelúcida de los mamíferos, es la proteína de los ovocitos que inducen a la reacción acrosomal, que activa una cascada de señalización de membrana, que a su vez conlleva al aumento de la cantidad de calcio intracelular, para llevarse a cabo la fusión de la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática del espermatozoide (Delgado, 2019).

Los ejemplares seminales con altos porcentajes de acrosomas dañados o carentes conllevan a la baja tasa de fertilidad, incluso investigaciones en espermatozoides de ratones demuestran que solo aquellos con acrosomas intactos pueden adherirse a la membrana de la zona pelúcida; por tal motivo, la determinación del estado acrosomal es necesario y útil, son diversas las técnicas que se desarrollaron para este fin y los métodos deben ser eficaces e inocuos, entre ellas tenemos a la microscopía de campo (MC), la microscopía de fluorescencia (MF), las diferentes tinciones, como la eosina/verde, Giemsa, la eosina/nigrosina, las dobles y triples tinciones, la citometría de flujo permite una estimación más segura; recientemente se han hecho uso de anticuerpos acrosomales específicos perceptibles con fluorescencia. La técnica de triple tinción (azul de Tripán, rojo neutro y solución Giemsa) basa su metodología en la tinción de los espermatozoides con azul de Tripán en combinación con otros colorantes y tinciones comerciales (Hidalgo et al., 2005).

Figura 2. Organización de la cabeza de espermatozoide de mamífero (Rodríguez, 2012).



2.3.3. Técnicas de separación de los espermatozoides

Las técnicas habituales de selección de espermatozoides en reproducción asistida son el Swim-up y gradiente de densidad Percoll, que se sustentan en la recuperación o separación de los espermatozoides con mayor movilidad y morfología, dentro de estas técnicas se incluyen la separación mediante centrifugación ya que se requiere la recuperación de un elevado porcentaje de espermatozoides con características funcionales capaces de fecundar al ovocito y que estén dispensado de desechos celulares y de espermatozoides muertos (Sánchez et al., 2017).

Inicialmente los gradientes de densidad fueron ideados utilizando Percoll como matriz de preparación para los gradientes. Sin embargo, en 1993 el fabricante retiró del mercado el producto para uso de reproducción asistida en humanos, debido a que existen riesgos de contaminación con endotoxinas inherentes a su fabricación, aunque su uso aun es permitido en reproducción asistida para animales (Salazar 2019).

- **Gradiente de Percoll**

Esta técnica de capacitación se fundamenta en el principio de sedimentación-centrifugación en virtud de su velocidad potencial de células espermáticas según

sus gradientes de densidad, las células se consolidan en un gradiente que se encuentra en equilibrio equivalente con su propia densidad, de tal manera, que esta técnica permite discernir a aquellos espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presenta los gradientes de densidad y llegar hasta el fondo del tubo mediante la fuerza de centrifugación, además que actúa como un filtro para el plasma seminal, células epiteliales, espermatozoides con baja movilidad o muertos (Auquilla, 2011).

Un gradiente de densidad, es un solvente dispuestos en una columna donde contiene diferentes concentraciones, la parte inferior contiene el solvente con mayor densidad mientras que en la parte superior disminuye la concentración, así se evita efectos de mezcla y oclusión de aire. Por tal motivo, por este método el semen diluido en medio de capacitación, es situado en la parte superior del Percoll en volumen equivalente al de las gradientes, la concentración inferior es de 90% mientras la superior es de 45%, procediendo luego a la centrifugación y por la fuerza de gravedad los espermatozoides con mayor movilidad y morfología se desplazan hacia las gradientes de mayor densidad, concentrándose en el fondo del tubo, quedando en las fases del gradiente los espermatozoides muertos de baja movilidad, el plasma seminal y otros constituyentes (Contreras, 2018).

La principal ventaja de este método es que se pueden usar en eyaculados de baja concentración espermática y de movilidad reducida, sin embargo, por otro lado, la desventaja radica en su valor es de alto costo y la difícil preparación de las gradientes de densidad (Contreras et al., 2021).

2.3.4. La centrifugación seminal

Entre las técnicas no traumáticas de evasión de viscosidad, se describe la técnica de centrifugación del semen, se realiza con el objetivo de excluir el contenido de espermatozoides del plasma seminal en el semen, pero al mismo tiempo para aparatar espermatozoides capaces de fecundar y en semen de camélidos y camellos se han recurrido a bajas y altas fuerzas de centrifugación (Giuliano et al., 2010).

La centrifugación es un procedimiento de separación, que se usa para aislar partículas suspendidas en un medio líquido aprovechando las diferentes velocidades de desplazamiento según su forma, tamaño o peso al ser sometidos a una fuerza centrífuga. La fuerza centrífuga es provista por una máquina llamada centrifugadora que mediante un rotor se encarga de ejercer esta fuerza mediante

movimientos de rotación, de tal manera que se puede aumentar la fuerza de gravedad efectiva en el tubo cónico para producir una precipitación del sedimento en la base del tubo de manera más veloz y efectiva a una determinada velocidad o revoluciones por minuto (Peña et al., 2014). La fuerza ejercida sobre las partículas se llama Fuerza Centrífuga Relativa (FCR), pongamos el caso de, una FCR de 500 x g indica que se aplica una fuerza centrífuga 500 veces mayor a la fuerza gravitacional de la tierra (9.8). Mediante la centrifugación se han implementado técnicas para la selección espermática como gradiente de Percoll para el tratamiento del semen y así poder garantizar su almacenamiento, refrigeración y congelación para la inseminación artificial (Auquilla, 2011).

Sobre todo, en alpacas los eyaculados que producen son muy viscosos y filantes, debido a ello fueron necesarios implementar métodos prácticos de campo, para superar los inconvenientes creados por la naturaleza viscosa del plasma seminal, entre ellos se han investigado la centrifugación a diversas disposiciones de fuerza y tiempos para aislar espermatozoides con el menor daño posible, sin embargo, siempre existe el riesgo de dañar las estructuras de esta, por ello la evaluación del efecto de la centrifugación se ha vuelto un tema de investigación en las distintas especies de animales y encontrar un protocolo adecuado que se ajuste a cada tipo de especie para obtener muestras aptas para la inseminación artificial y minimizar los daños (Gómez, 2020).

2.3.5. Efecto de la centrifugación sobre el espermatozoide

La centrifugación es un paso fundamental en el lavado y selección de los espermatozoides en el cual se puede genera lesión a la membrana plasmática de los gametos masculinos e incrementar la producción basal de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Las ERO son especies de moléculas químicas o átomos que contienen electrones desapareados en su orbital externo lo que le da una reactividad química que desencadena a actuar rápidamente con otras moléculas. Los metabolitos producidos por el oxígeno que tiene una reducción de uno de sus electrones son, el radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las ERO reacciona indiscriminadamente con cualquier molécula con la que tenga fricción, le extraen electrones y generan nuevos radicales libres citotóxicos (Montesa, 2011).

Las ERO tienen un efecto dual sobre las células espermáticas ya que son primordiales para los procesos de capacitación y reacción acrosómica, por el

contrario, sus altas concentraciones inducen a una pérdida de la función espermática, puesto que anula las funciones suficientes y necesarias para permitir la fertilización del ovocito. En la membrana plasmática de los espermatozoides el radical hidroxilo inicia la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las cadenas laterales de las membranas, en un proceso que se conoce como la peroxidación lipídica. Esto es debido a que cada ácido graso que padece la peroxidación genera un radical con el potencial suficiente para producir peroxidación en otro ácido graso, este fenómeno es altamente deletéreo que se traduce estructuralmente como una disminución en la fluidez de la membrana y funcionalmente es una reducción de la capacidad fecundativa de la célula espermática. La integridad del DNA espermático, así como de la membrana acrosomal también, es afectada por la alta concentración de ERO, las cuales dependen de los niveles de estrés que se producen durante la centrifugación cuyos factores pueden ser un tiempo prolongado, la fuerza ejercida durante la separación seminal o por la exposición a sustancias nocivas, además estos pueden desencadenar un aumento significativo en la fragmentación del DNA y una pérdida riguroso de la movilidad (Urrego et al., 2008).

2.3.6. Técnicas para la evaluación de la integridad de la membrana espermática y acrosomal

La evaluación de la membrana plasmática refleja la viabilidad espermática, por ello resulta importante la evaluación de la integridad de la membrana, más aún si se sabe que los daños se ocasionan a nivel de la cabeza y el flagelo espermático, pueden ocurrir independientemente uno del otro y la presencia de la membrana flagelar intacta, no sugiere necesariamente la integridad de la membrana acrosomal (Zhu et al., 2000).

Las tinciones tales como Eosina/Nigrosina (EN) y Tripán-Blue (TB), han sido utilizada durante mucho tiempo con el fin de estimar la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, también se hizo uso del colorante Eosina/Nigrosina/Giemsa, SYBR- 14/Ioduro de propidio, Hoechst 33342/Ioduro de propio y el test hipo-osmótico conocido como HOST, lo que se evidencia por el enrollamiento del flagelo (Sánchez, 2016).

Para la evaluación de integridad acrosomal se pueden usar diferentes técnicas, entre ellas el azul de Coomassie para evaluar la presencia y/o ausencia del capuchón acrosomal, también es valorada mediante lectinas conjugadas

fluorescentes ya que la desaparición de la fluorescencia es indicativa de un acrosoma intacto, mientras que la fluorescencia indica la ruptura del acrosoma o de la reacción acrosómica. Otra técnica habitualmente utilizada es la citometría de flujo o microscopia de fluorescencia que se interpreta que cuando la tinción acrosómica tiene lugar en espermatozoides fijados y permeabilizados, todos los acrosomas fluorescentes son distinguibles como intactos, mientras los acrosomas con baja o solo con una banda de tinción fluorescente muestra señales de ruptura o reacción (Sánchez, 2016).

Existen otros test fluorescentes para estimar el acrosoma, como la tinción de clortetraciclina (CTC), en la que la fluorescencia se activa cuando cohesiona a iones de calcio y cuando se combinan con otras tinciones fluorescentes, como Hoechst 33258 se logran diferenciar subpoblaciones espermáticas (Sánchez, 2016). En llamas se usaron técnicas de tinción, como el azul Tripán, rojo neutro y solución Giemsa (Giuliano et al., 2010).

2.3.6.1. Tinción fluorescente Hoechst 33342/PI

El colorante Hoechst 33342 es un fluorocromo permeable a la membrana plasmática, de tal manera que penetra a todas las células y presenta peculiaridad por los pares de bases A – T uniéndose y tiñendo al DNA, de modo que todos los espermatozoides son perceptibles de color azul. La longitud de onda de excitación es de 532 nm, siendo la emisión a 461 nm aproximadamente. El colorante PI (Ioduro de Propidio) solo traspasa las membranas dañadas ya que se superpone al colorante azul Hoechst, aquellos espermatozoides con membrana dañada se pigmentan de color rojo/violeta. Sobre esta base el programa AndroVision® estipula el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta o defectuosa (Cueva, 2018).

El Ioduro de propidio es una contratinción popular cromosómica, utilizado para la identificación de células muertas, permitiendo evaluar la viabilidad mediante la apreciación de la membrana plasmática y nuclear, este compuesto ingresa en los espermatozoides con la membrana plasmática deteriorada y se fusiona al núcleo, de manera que al ser excitados por la longitud de onda adecuada (510 – 560 nm) difunde fluorescencia roja (Álvarez, 2019).

El uso del Hoechst 33342 es limitado debido a que la longitud de onda de su espectro de excitación, se encuentra en un rango UV y la mayoría de los citómetros cuentan de un láser con una longitud de onda de 488 nm y para estimar

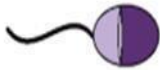
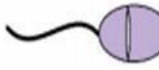
aquellas muestras señaladas con este fluorescente es preciso habilitar de un láser de menor longitud de onda (Cueva, 2018).

2,3,6.2. Triple tinción con azul de Tripán, rojo neutro y solución de Giemsa

Es una técnica de microscopía óptica capaz de evaluar el estado acrosomal y la viabilidad espermática al mismo tiempo, ya que el azul de Tripán es indicador de vitalidad y el Giemsa se anexa a la matriz acrosomal, en el caso de los camélidos sudamericanos se han podido reconocer cuatro patrones haciendo uso de la triple tinción:

- Espermatozoides vivos con acrosoma presente, se observa que la región acrosomal se tiñe de púrpura y la zona post acrosomal se tiñe de azul claro o blanquecino.
- Espermatozoides vivos con acrosoma dañado o suelto, se observa que la zona acrosomal se tiñe de rosa pálido y la zona post acrosomal de azul claro o blanquecino.
- Espermatozoides muertos con acrosoma presente, se observa que la zona acrosomal se tiñe de púrpura y la región post acrosomal de azul oscuro.
- Espermatozoides muertos con acrosoma dañado o suelto, la zona acrosomal se tiñe de rosa pálido o violeta claro mientras que la zona post acrosomal se tiñe de azul oscuro (Carretero et al., 2015).

Figura 3. Características de la muestra espermática sometidas al proceso de triple tinción con azul de Tripán, Rojo neutro y solución Giemsa (Cueva, 2018).

	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

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

El presente 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

Estación Experimental Agraria Canaán – INIA, se localiza en la Av. Abancay a 20 min de la Plaza Mayor de Huamanga, ubicada al sureste de la Provincia de Huamanga, región Ayacucho.

Latitud sur : 13°09'48" S.

Longitud Oeste : 74°11'53" W.

Altitud : 2736 msnm.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

La población de estudio integra todos los espermatozoides presentes en los eyaculados de semen que fueron captados mediante la vagina artificial de 5

alpacas machos (n=5) con cuatro repeticiones (r=4), de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA - Ayacucho.

3.2.2. Muestra

El tamaño muestral consistió en 20 muestras de semen de alpaca, cuya movilidad fue mayor al 50 % y la concentración mayor a $80 \times 10^6/\text{ml}$ de semen, que serán considerados como criterios de inclusión, de los cuales se tomarán 100 μl para la capacitación mediante Percoll y 10 μl para la estimación de la integridad de membrana espermática y acrosomal. Los ejemplares de semen fueron colectados mediante la técnica de la vagina artificial a partir de 5 machos cuya frecuencia de colecta fue 2 veces por semana, por cada macho de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA - Ayacucho.

3.2.3. Sistema de muestreo

La colecta de muestras de semen de alpaca, fueron a través de la vagina artificial a partir de los 5 machos entrenados de los cuales se escogió de manera aleatoria a tres de ellos para la recolección que fue 2 veces a la semana por cada número de arete del macho.

3.3. Metodología y colección de datos

3.3.1. Armado de la vagina artificial

- En un tubo rígido de PVC de 7 cm de diámetro por 25 cm de largo se introdujo por la parte interna una funda de látex y se dobló en uno de los extremos.
- Una bolsa previamente cortada de polietileno, se adhirió en uno de los extremos de un tubo Falcón y se unió con una cinta másquin.
- La bolsa con el tubo Falcón se sujetó al tubo de PVC del lado de la funda doblada y se fijó con una liga.
- Por el otro extremo del tubo se vertió agua caliente de 43 a 50°C en el interior del tubo.
- Inmediatamente se procedió a tirar el látex y doblarlo para luego ser sujetado con una liga de manera que se evita la salida del agua.
- Luego se insufló aire a través del pitón del tubo de manera que se logró una cierta presión en el interior del tubo recreando un ligero ajuste en el interior de la vagina.
- Se situó una especie de capuchón previamente atemperado al tubo Falcón para conservar la temperatura de los espermatozoides que fueron recolectados.

- Se empacó a la vagina artificial en una compresa de caucho que contenga agua caliente a 52°C aproximadamente, seguidamente se envolvió con una frazadilla de franela para conservar la temperatura y se sujetó con ligas firmemente (Espezúa et al., 2021).

3.3.2. Recolección del semen de alpaca

- La vagina artificial armada se transportó al lugar de recolección y se colocó en el interior del maniquí, previamente fue limpiada y desinfectada con alcohol e incluso en algunos casos se agregó gel para facilitar el ingreso de la vagina al maniquí.
- Una vez que se comprobó que la vagina este firme en el maniquí, este se colocó en una posición de cubito ventral.
- Luego se seleccionó a los machos respectivos y se procedió a la monta y cópula.
- Una vez que el macho logró penetrar se anotó el tiempo de cópula que tuvo una duración de 10 a 40 min aproximadamente y también se anotó la raza y el número de arete de cada macho respectivamente.
- Finalmente, cuando el macho se levantó inmediatamente se llevó la vagina al laboratorio para su análisis macroscópico y microscópico del semen.

Figura 4. Colecta de semen de alpaca **A)** Armado de la vagina artificial, **B)** Monta de la alpaca macho en el maniquí.



3.3.3. Análisis macroscópico del semen

Tan pronto como, el tubo Falcón con la muestra se retiró de la vagina artificial seguidamente se procedió a colocar en baño maría a 37°C para iniciar con el análisis de sus características macroscópicas, seguida del análisis microscópico. Como dato importante se tomó en consideración que las muestras seminales no fueron expuestas a la temperatura ambiental por tiempo prolongado y se evadió el contacto directo con la luz solar.

a) Color

El color se determinó mediante la observación a simple vista y se clasificó como, blanco lechoso (indica una concentración alta), blanco semi lechoso y un color cristalino o transparente (indica una concentración baja).

b) Volumen

Se observó directamente del tubo Falcón graduado, se diferenció el semen de la espuma del eyaculado para determinar el volumen. El volumen de semen en alpacas varía entre 0.8 mL a 3 mL aproximadamente.

c) Filancia

Se introdujo una micropipeta al semen colectado, luego se extrajo un poco de muestra y se colocó sobre un portaobjeto, se esperó unos segundos y luego se jaló hasta el punto de despliegue, mediante una regla se determinó la longitud máxima que el semen alcanzó hasta su despliegue.

Esta acción determinó la propiedad de viscosidad del semen recolectado, en algunos casos hubo ausencia de filancia.

3.3.4. Análisis microscópico del semen

3.3.4.1. Movilidad

La movilidad de un espermatozoide es un parámetro que indicará la vitalidad de la célula espermática, el semen de alpaca presenta un movimiento oscilatorio debido a su viscosidad (Espezúa et al., 2021).

- Se tomó una gota de la muestra seminal con la micropipeta y se colocó en una lámina portaobjeto que previamente fue atemperada a 37°C.
- Se observó el semen fresco y también el semen luego de la selección mediante Percoll y centrifugación a diferentes tiempos, a través del microscopio óptico a 40X, y se determinó los valores en porcentaje de 0 a 100% según su movilidad.

- Para la determinación de la movilidad se puede realizar haciendo una estimación subjetiva, pero para obtener valores más exactos se realizó por medio del sistema CASA.

3.3.4.2. Concentración

La concentración espermática indica el número de espermatozoides presentes en eleyaculado.

- Se tomó 10 µl de muestra seminal con una micropipeta.
- En un lamina portaobjeto previamente atemperada a 37°C y se cubrió con una laminilla.
- Finalmente, se observó mediante el microscopio óptico a 40X para el análisis en el AndroVision sistema CASA, se seleccionó el programa movilidad y concentración, se hizo la evaluación de 5 campos de la muestra y el sistema determinó los patrones de movimiento dando la estimación respectiva (Espezúa et al., 2021).

3.3.4.3. Evaluación de la integridad de membrana espermática (Tinción fluorescente Hoechst 33342/PI)

- En un tubo Eppendorf atemperado se colocaron 10 µl de semen seleccionado por Percoll y seguidamente se añadió 1.5 µl de Hoechst 33342/PI, luego se homogenizó lentamente.
- Al tubo Eppendorf se forró con papel aluminio para protegerlo de la luz y se incubó a 37° C por 15 minutos.
- Una vez, cumplido el lapso de tiempo se extrajo una gota de la muestra y se colocó sobre un portaobjeto y se cubrió con un cubreobjeto.
- Luego, se observó en el microscopio a 200X y se encendió el modo de luz UV para ser analizado mediante el sistema CASA.
- Se ingresó, al sistema AndroVisión CASA luego en “Análisis avanzado”, después modulo “viabilidad”.
- Aquellos espermatozoides con la membrana dañada se pigmentó de color rojo o rosado y los espermatozoides con la membrana intacta fueron de color azul.

- El análisis de la integridad de membrana espermática se operó en semen fresco y en espermatozoides centrifugados por espacio de 10, 20 y 30 minutos respectivamente.
- Además, para el recuento de espermatozoides viables con integridad de membrana espermática se analizó en 5 campos y para estimar el porcentaje de los espermatozoides viables se empleó la siguiente fórmula (Cueva, 2018).

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

3.3.4.4. Evaluación de la integridad acrosomal (triple tinción con azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa)

- Con la ayuda de una micropipeta, se extrajo una gota de semen seleccionado mediante Percoll y se colocó en un portaobjeto atemperado.
- Luego, se añadió una gota de azul de tripán al 0,2% (preparación a partir de 0,4% SIGMA T-8154 diluido con 0,9% de NaCl en proporción 1:1).
- Seguidamente, con la ayuda de la micropipeta se homogenizó y con otro portaobjeto se extendió mediante un frotis por toda la superficie del portaobjeto.
- Se dejó secar verticalmente a temperatura ambiente por 3 minutos.
- Luego se fijó con una solución de rojo neutro al 0,2% (SIGMA N° 2889) por 5 minutos.
- Después con una piseta se enjuagó 3 veces con agua destilada y se dejó secar verticalmente.
- Finalmente, se coloreo con Giemsa al 7,5% (preparación al momento del uso 11.5 ml de agua destilada y 1 ml de Giemsa), se dejó secar por 24 horas.
- Se enjuagó con agua destilada 4 veces.
- Se realizó la evaluación en un microscopio a 1000X con aceite de inmersión.
- La evaluación de la integridad acrosomal se realizó en semen fresco, semen seleccionados por gradiente de Percoll y centrifugados a 10, 20 y 30 minutos respectivamente.

- Para la obtención del porcentaje de espermatozoide vivos con membrana acrosomal integro se aplicó la siguiente fórmula (Cueva, 2018).

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

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

3.4. Preparación de los reactivos para el análisis seminal

Los reactivos usados como el Percoll se prepararon con anterioridad al proceso de extracción del semen y la preparación fue de acuerdo a cada protocolo, se tuvo en cuenta las medidas de bioseguridad implementadas para el laboratorio (Anexo 1).

3.4.1. Preparación de TALP-SPERM 10X

- Se desinfectó el área de trabajo con alcohol antes de la preparación.
- Se encendió la balanza analítica 2 horas antes de realizar la calibración para pesar.
- Se procedió a pesar todos los reactivos según la cantidad correspondiente para un determinado volumen de preparación.
- En un tubo Falcón previamente lavado y desinfectado se colocó cada uno de los reactivos pesados y se enrazó con agua de mili Q y finalmente se añadió con una micropipeta lactato de sodio.
- Luego se llevó al vortex para la homogenización y evitar la formación de grumos.
- Finalmente, se midió el pH a 7,4 y se filtró con membrana de 0,22 µm.
- Se rotuló y se colocó en la refrigeradora para su conservación a 5°C (Palomino, 2019).

3.4.2. Preparación de Percoll de 90%

- Antes de empezar la preparación se desinfectó el área de trabajo con alcohol.
- Se encendió la balanza analítica 2 horas antes de realizar la calibración.
- Una vez que la balanza se calibró, se procedió a pesar NaHCO_3 .
- Se vertió a un vaso precipitado previamente lavado y desinfectado en la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación.
- Luego se añadió Sperm-TALP 10X mediante una micropipeta de 1000 μl .
- Seguidamente se agregó el lactato de Na y el Percoll.
- Finalmente se añadió $\text{MgCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CaCl}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$.
- Una vez, se tubo todos los reactivos se llevó al vórtex para su homogenización durante 5 minutos.
- Se midió el pH a un rango de 7,3 – 7,45.
- Luego se realizó la filtración con membrana de 0,22 μm .
- Por último, se almacenó en un tubo Falcon, se rotuló y se llevó a refrigerara 5°C para su conservación (Gómez et al., 2014).

3.4.3. Preparación de Percoll de 45%

- Se desinfectó el área de trabajo con alcohol antes de la preparación.
- Se encendió la cámara de flujo laminar.
- Luego se procedió a medir el Percoll de 90% y se colocó en un tubo Falcon previamente lavado y desinfectado.
- Finalmente, se añadió el Sperm –TALP 10X y se llevó al vórtex para su homogenización.
- Se selló con una tira de Parafilm.
- Se rotuló con los datos correspondientes y se llevó a refrigerar a 5°C para su posterior conservación.

3.4.4. Preparación del medio Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato (TALP-FIV)

- Se desinfectó el área de trabajo con alcohol antes de la preparación.
- Se encendió la balanza analítica 2 horas antes de realizar la calibración.
- Una vez, que la balanza se encontró calibrado, se procedió a pesar cada uno de los reactivos según la cantidad para un volumen de preparación determinado.
- Todos los reactivos pesados se disolvieron en agua mili Q y con la ayuda de una micropipeta se añadió el lactato de sodio.
- Luego, se colocó en un tubo esterilizado y se llevó al vortex para su completa homogenización.
- Finalmente, se filtró con una membrana de 0,22 μm , se rotuló y se almacenó en la refrigeradora a 5°C para su conservación (Palomino, 2019).

3.5. Separación seminal por la gradiente de Percoll a diferentes tiempos de centrifugación.

- Antes del uso, el Percoll de 45% y 90%, Sperm – TALP y TALP-FIV se procedió a calentar a 38°C.
- En la cámara de flujo laminar previamente desinfectado con alcohol, se depositó en el fondo del tubo cónico de 1.5 ml 100 μl de Percoll de 90% y en la parte superior, otros 100 μl de Percoll de 45% de manera que se formó un menisco entre los dos gradientes.
- Seguidamente, con mucho cuidado se depositó 100 μl de semen sobre el gradiente Percoll de 45%.
- Luego se procedió a realizar la centrifugación a 700 x g por espacio de 10, 20 y 30 minutos, para cada caso respectivamente.
- Se eliminó el sobrenadante y se adicionó 100 μl de Sperm -TALP, para luego volver a centrifugar a 350 x g por espacio de 5 minutos.
- Se volvió a eliminar el sobrenadante y se adicionó 50 μl del medio TALP FIV.

- Seguidamente, se realizó la extracción de 10 µl de muestra en un portaobjetos atemperado para la evaluación correspondiente como la motilidad, concentración, integridad de la membrana espermática e integridad acrosomal (Contreras et al., 2021).

3.6. Tipo de investigación

El tipo de investigación del siguiente estudio fue básica – experimental. Se denomina básica, ya que la principal aportación fue nuevos conocimientos de parámetros para la selección mediante gradiente de Percoll y centrifugación a cortos tiempos para evitar y prevenir el daño de la membrana espermática y acrosomal de los espermatozoides. Mientras que la investigación tipo experimental es debido a la manipulación de variable independiente de tiempos para la centrifugación y observar el efecto sobre la variable dependiente integridad de la membrana espermática e integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca.

3.7. Análisis estadístico

Los datos alcanzados fueron necesarios para el establecimiento de tablas estadísticas en el programa software Excel para luego ser ordenados y exportados al programa estadístico de Minitab, ahí se efectuó la prueba de normalidad para ver si los datos cumplían los principios de distribución normal y se realizó la prueba de normalidad de Anderson-Darling. También se usó un intervalo de confianza de Bonferroni del 95 % para desviación estándar. Para la prueba de igualdad de varianzas se usó el método de Bartlett para datos paramétricos y la prueba de Levene para datos no paramétricos, luego de contrastar que dichos datos de las variables cumplían una distribución normal, se pasó a comparar los promedios mediante un análisis de varianza (ANVA) para un Diseño en Bloques Completamente Aleatorio (DBCA) y se usó la prueba de Tukey con la finalidad de comparar parejas para la concentración, movilidad, integridad de membrana espermática e integridad acrosomal, en los tres tiempos.

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas del semen de *Vicugna pacos* “alpaca” (n=5; r=4). Los valores están expresados en promedio y desviación estándar. INIA - Ayacucho 2023.

Macho	Código de arete	Color	Volumen (ml)	Filancia (cm)	Concentración (x10 ⁶ /ml de semen)		Movilidad (%)		Integridad de membrana espermática (%)		Integridad acrosomal (%)	
1	12006	Blanco lechoso	1.50	2.3	112.78	±8.06	76.75	±3.76	63.50	±2.31	73.00	±2.47
2	9184	Blanco semi lechoso	0.83	1.5	174.30	±6.23	79.75	±1.98	64.50	±2.98	75.00	±4.34
3	9210	Blanco lechoso	1.85	1.9	197.40	±6.48	75.05	±4.00	63.57	±3.12	71.73	±2.32
4	13022	Blanco semi lechoso	1.50	1.0	164.40	±5.20	76.18	±4.22	62.63	±2.07	73.55	±3.06
5	S/A	Blanco semi lechoso	1.65	1.0	110.85	±7.93	76.33	±2.59	63.08	±1.90	74.08	±2,91
Promedio					151.95	±6.78	76.81	±3.31	63.46	±2.48	73.47	±3.05

Tabla 2. Concentración seminal ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) de *Vicugna pacos* “alpaca” ($n=5$; $r=4$), después de la centrifugación a $700 \times g$. Los valores están expresados en promedios y desviación estándar. INIA – Ayacucho 2023.

Macho	Código de arete	Tiempo de centrifugación (min)					
		10		20		30	
1	12006	140.5	± 8.02	152.4	± 8.71	93.90	± 4.32
2	9184	191.1	± 8.76	183.2	± 6.45	107.5	± 6.45
3	9210	194.9	± 3.82	193.9	± 4.36	106.2	± 6.31
4	13022	176.2	± 8.20	178.5	± 7.27	103.0	± 6.57
5	S/A	144.5	± 9.79	146.2	± 6.54	99.53	± 5.94
Promedio		169.4	± 7.72	170.8	± 6.67	102.0	± 5.92
		A		A		B	

*S/A : “Sin arete” (identificación de la alpaca suri negra).

A y B : Indica una diferencia estadística significativa entre sí.

Figura 5. Promedio de la concentración seminal ($\times 10^6/\text{ml}$) en los tres tiempos de centrifugación (min) a $700 \times g$ de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA – Ayacucho 2023.

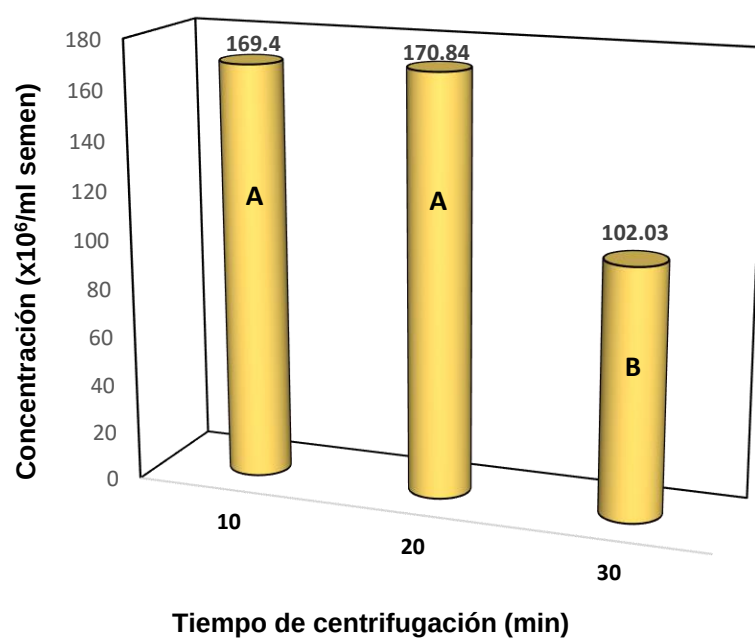


Tabla 3. Movilidad espermática (%) de *Vicugna pacos* “alpaca” (n=5; r=4) después de la centrifugación a 700 x g. Los valores están expresados en promedios y desviación estándar. INIA – Ayacucho 2023.

Macho	Código de arete	Tiempo de centrifugación (min)					
		10		20		30	
1	12006	81.82	±4.81	69.48	±4.43	29.73	±4.22
2	9184	86.97	±5.16	74.53	±2.68	39.48	±3.19
3	9210	81.80	±6.83	69.38	±6.55	34.23	±8.11
4	13022	82.88	±3.29	73.63	±2.75	33.20	±6.05
5	S/A	80.88	±3.89	71.13	±4.15	34.00	±6.13
Promedio		82.87	±4.80	71.63	±4.11	34.13	±5.54
		A		B		C	

*S/A : “Sin arete” (identificación de la alpaca suri negra).

A, B y C : Indica una diferencia estadística significativa entre sí.

Figura 6. Promedio de la movilidad espermática (%) en los tres tiempos de centrifugación (min) a 700 x g de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA – Ayacucho 2023.

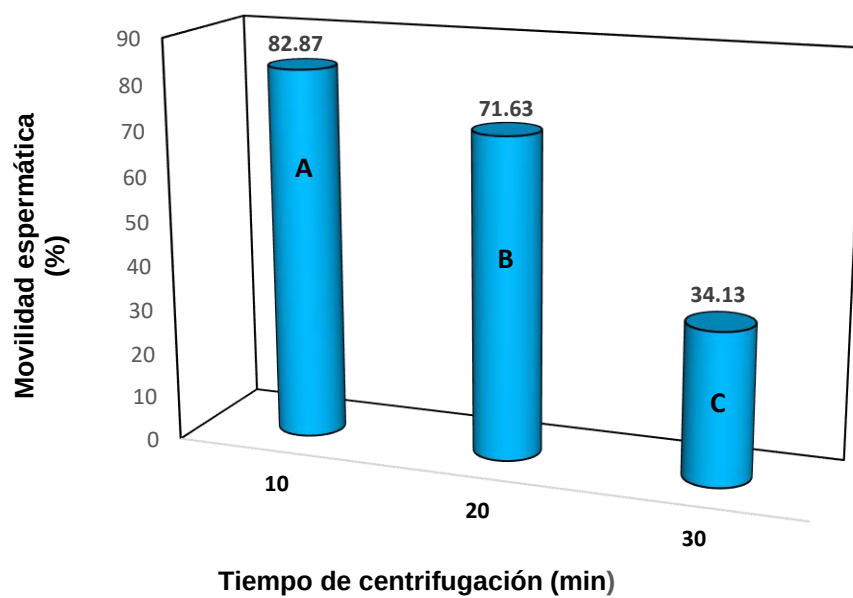


Tabla 4. Integridad de membrana espermática (%) de *Vicugna pacos* “alpaca” (n=5; r=4), después de la centrifugación a 700 x g. Los valores están expresados en promedios y desviación estándar. INIA – Ayacucho 2023.

Macho	Código de arete	Tiempo de centrifugación (min)					
		10		20		30	
1	12006	65.40	±2.86	58.33	±5.23	24.15	±4.75
2	9184	68.05	±3.86	60.55	±4.89	28.70	±4.28
3	9210	68.13	±7.93	57.43	±6.16	21.88	±4.82
4	13022	67.25	±4.40	53.43	±4.49	18.35	±2.23
5	S/A	64.38	±1.91	51.80	±2.94	20.35	±3.21
Promedio		66.64	±4.19	56.31	±4.74	22.69	±3.86
		A		B		C	

*S/A : “Sin arete” (identificación de la alpaca suri negro).

A, B y C : Indica una diferencia estadística significativa entre sí.

Figura 5. Promedio de la integridad de membrana espermática (%) en los tres tiempos de centrifugación (min) a $700 \times g$ de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA – Ayacucho 2023.

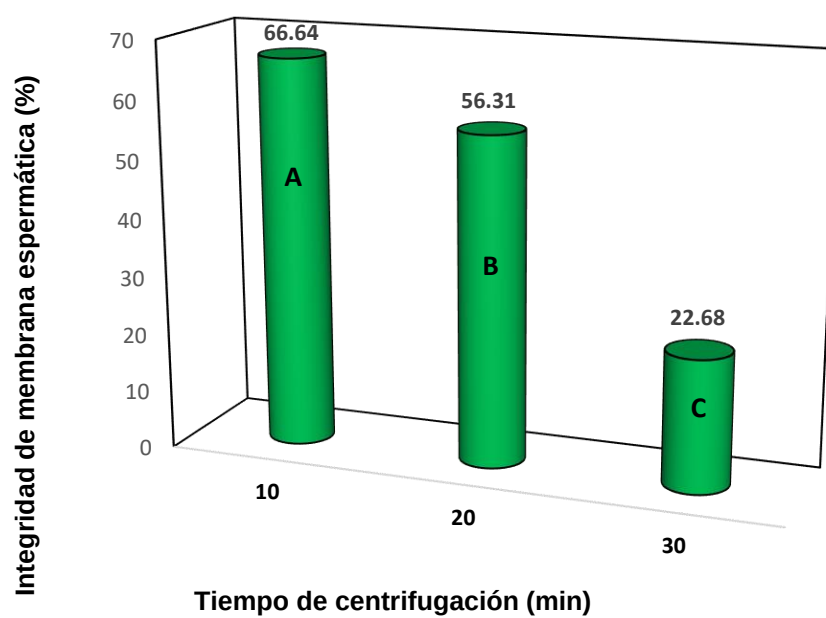


Tabla 5. Integridad acrosomal (%) de *Vicugna pacos* “alpaca” (n=5; r=4), después de la centrifugación a 700 x g. Los valores están expresados en promedios y desviación estándar. INIA – Ayacucho 2023.

Macho	Código de arete	Tiempo de centrifugación (min)					
		10		20		30	
1	12006	83.80	±3.74	65.15	±2.44	31.48	±2.74
2	9184	82.03	±5.42	68.15	±3.75	36.20	±6.29
3	9210	84.05	±2.52	66.67	±3.81	34.23	±5.45
4	13022	83.05	±3.34	65.80	±3.84	34.00	±5.84
5	S/A	82.25	±3.13	66.45	±2.95	33.38	±4.36
Promedio		83.04	±3.63	66.45	±3.36	33.86	±4.94
		A		B		C	

*S/A : “Sin arete” (identificación de la alpaca suri negro).

A, B y C : Indica una diferencia estadística significativa entre sí.

Figura 6. Promedio de la integridad acrosomal (%) en los tres tiempos de centrifugación (min) a 700 x g de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA – Ayacucho 2023.

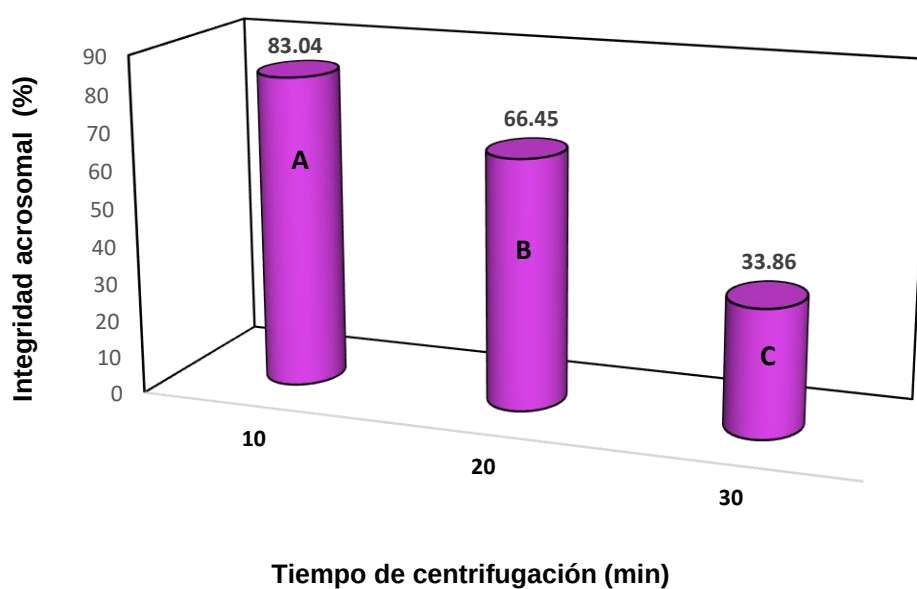


Figura 7. Comparación de la muestra control con los tres tiempos de centrifugación (min) a 700 x g de la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$) de *Vicugna pacos* “alpaca” INIA – Ayacucho 2023.

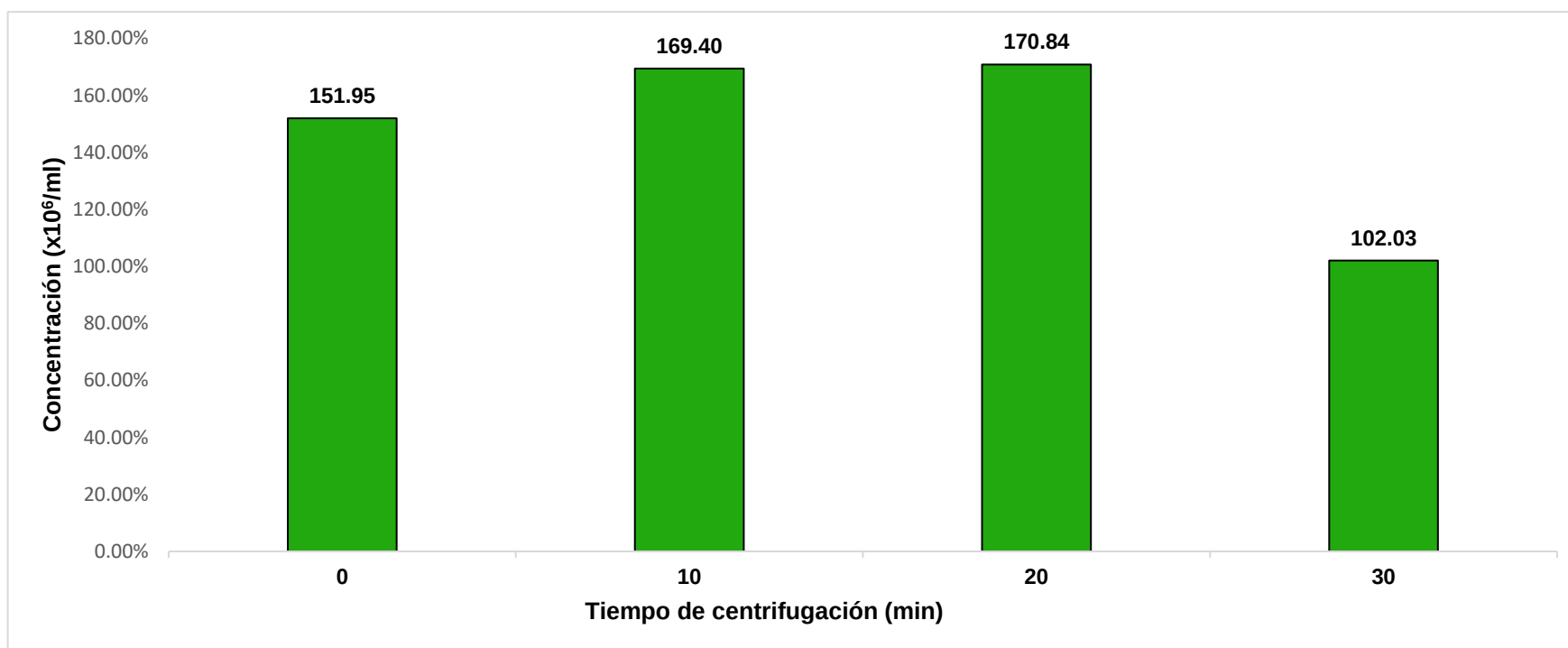


Figura 10. Comparación de las muestras control con los tres tiempos de centrifugación (min) a 700 x *g* de la Movilidad (%), Integridad de membrana espermática (%) e Integridad acrosomal (%) de *Vicugna pacos* “alpaca” INIA – Ayacucho 2023.

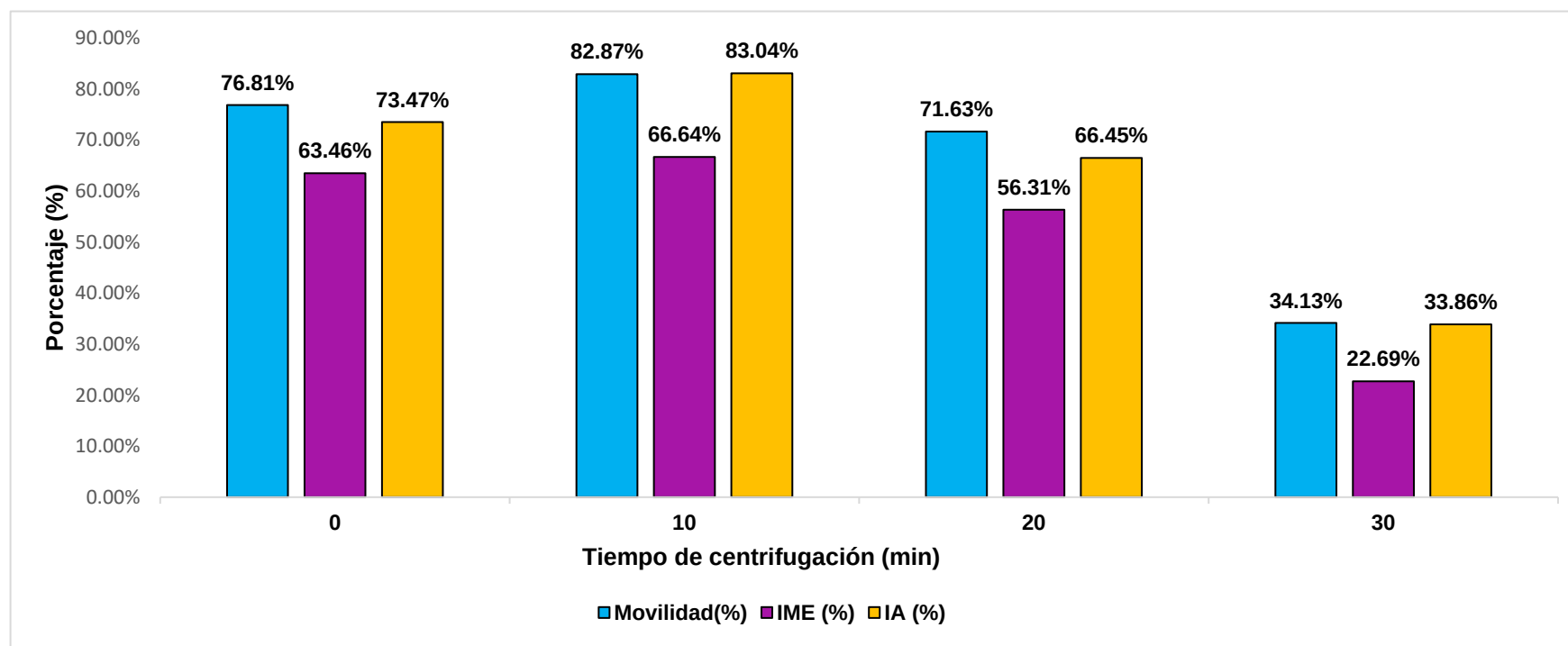


Figura 11. Espermatozoides teñidos con el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI, analizados con el programa AndroVisión sistema CASA. **Color azul:** Espermatozoide viable con membrana espermática intacta, se observó en la imagen de color azul. **Color rojo:** Espermatozoide no viable con membrana espermática dañada, se observó en la imagen de color rosado.

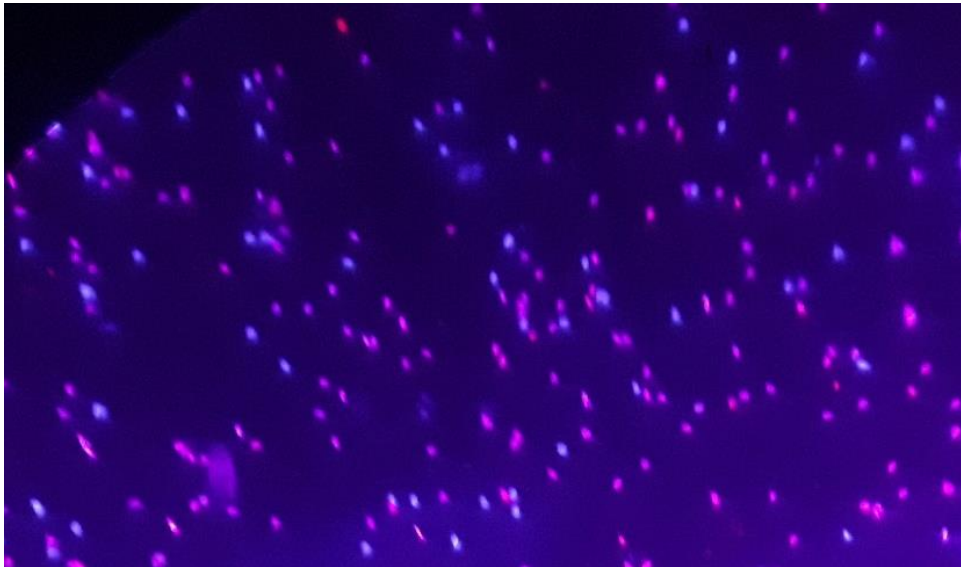
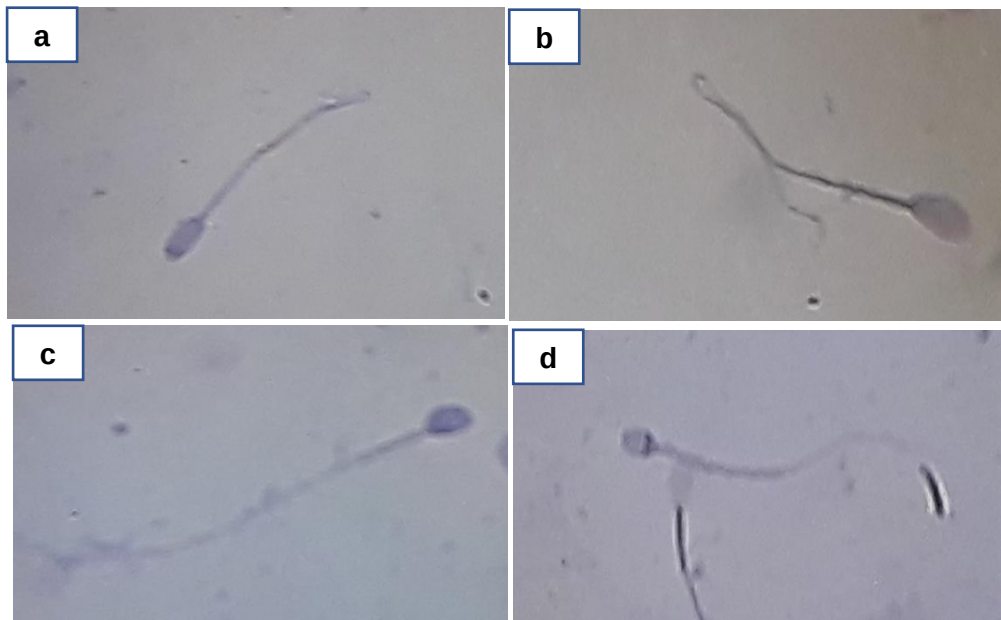


Figura 12. Espermatozoides teñidos con triple tinción Azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa. INIA - Ayacucho 2023. **a)** Espermatozoide vivo con acrosoma intacto (acrosoma azul violeta y región post acrosomal translucido ligeramente coloreado); **b)** Espermatozoide vivo sin acrosoma (acrosoma translucido y región post acrosomal translucido ligeramente coloreado); **c)** Espermatozoide muerto con acrosoma intacto (acrosoma azul violeta y región post acrosomal azul oscuro o azul violeta); **d)** Espermatozoide muerto sin acrosoma (acrosoma translucido y región post acrosomal azul oscuro o azul violeta).



V. DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos de la investigación realizada, en la Tabla 1, se observan los resultados de las características macroscópicas y microscópicas del semen como son el promedio y desviación estándar (DE) que fue de $151.95 \pm 6.78 \times 10^6/\text{mL}$ de la concentración, para la movilidad el promedio y DE fue de $76.81 \pm 3.31\%$, para la integridad de membrana espermática el promedio y DE fue de $63.46 \pm 2.48\%$, y para la integridad acrosomal con promedio y DE fue de $73.47 \pm 3.05\%$. Estos parámetros reflejan la buena calidad del semen fresco ya que son requerimientos que ha de reunir un espermatozoide para ser apto y fecundar a un ovocito; la movilidad es todavía uno de los parámetros más utilizados para valorar la calidad del eyaculado.

Se puede corroborar con las investigaciones de Linares (2020) que obtiene similares resultados en cuanto al volumen con un promedio de 1.22 ml y la filancia 1.33 cm en semen fresco de alpaca en la región de Ayacucho, también se observa un aumento en la concentración con $211.30 \times 10^6/\text{ml}$, la movilidad con 71.65% y una ligera disminución con respecto a la integridad de membrana espermática con promedio y DE que fue de $57.65 \pm 16.79\%$ analizados mediante Hoechst y colectados en condiciones similares mediante vagina artificial. Sin embargo, hay reportes como de Ramírez, (2017) que encontró en la movilidad un promedio de 52.50 % en finales de época reproductiva mediante vagina artificial, esta se debe probablemente a la colecta frecuente de cada macho y el tiempo prolongado de la cópula ya que a mayor tiempo se reduce significativamente la movilidad de los espermatozoides.

También hay otro trabajo similar de Zirena, (2014) que reportó porcentajes bajos de reacción positiva al test de endosmosis (HOST) en semen fresco con un promedio de $43.13 \pm 17.59\%$, y movilidad de 43.33% colectados mediante vagina artificial, este valor inferior seguramente se deba a la frecuencia de colección de 6 a 7 colectas por semana y también a que el uso de Hoechst 33342 para evaluación de integridad de membrana espermática es más exacta a comparación del HOST. Por otro lado, en la investigación de Mendoza (2015), se encontró porcentajes superiores de $79,6\%$ de movilidad, esto se debe a que el autor logró la muestra en poco tiempo y además hizo uso de una frazadilla eléctrica el cual mantuvo una temperatura constante la muestra seminal.

En la Tabla 2, el promedio más alto de la concentración fue de $170.8 \pm 6.67 \times 10^6/\text{ml}$ a los 20 min de centrifugación, mientras, que a los 10 min fue de $169.40 \pm 7.72 \times 10^6/\text{ml}$ por ende, no hay diferencia estadística significativa entre ambos, a los 30 min hubo un descenso a $102.0 \pm 5.92 \times 10^6/\text{ml}$, donde si hay una diferencia estadística significativa con respecto a los 10 y 20 minutos de centrifugación. En la Figura 5, se muestra las comparaciones gráficas de los promedios en los diferentes tiempos de centrifugación (min). Un mayor tiempo de centrifugación no siempre se traduce a una mayor concentración de espermatozoides como lo señala el trabajo de Álvarez, (2005) en mamíferos, donde demuestra que el semen puede tener una alta concentración, pero si la movilidad, viabilidad o integridad de membranas y DNA son bajas, la calidad seminal no será óptima, de hecho, un tiempo excesivo puede ser perjudicial ya que puede provocar pérdida de espermatozoides al adherirse en la capa de leucocitos que se acumulan en el fondo del tubo durante la centrifugación, también un tiempo excesivo de centrifugación provoca sedimentación excesiva y reduce la recuperación.

También en otro estudio de Contreras, (2018), se encontró bajos porcentajes de concentración seminal en alpacas luego de una centrifugación por gradiente de Percoll a 1500 rpm durante 10 min, con un promedio y DE que fue de $80.51 \pm 34.53\%$ y en la muestra control (espermatozoide sin centrifugar) $103.40 \pm 51.60\%$, esta disminución de los resultados posiblemente se deba a que se hizo uso de pajillas congeladas de semen de alpaca.

En la Tabla 3, la movilidad luego la de centrifugación por 10 min en la separación espermática mediante gradiente de Percoll muestra el más alto promedio y DE que fue de $82,87 \pm 4.80\%$, esto se debe a que la técnica de gradiente Percoll tiene

como objetivo primordial separar los espermatozoides vivos de los muertos y otros restos celulares, por tanto, los espermatozoides seleccionados mediante esta técnica son en su totalidad espermatozoides vivos, entre tanto, que en la muestra control presenta espermatozoides vivos, muertos y otros restos celulares (Camargo, 2020). Sin embargo, luego de la centrifugación por 30 min se puede observar un notable descenso a un valor de tan solo $34.13 \pm 5.54\%$ de movilidad, en cuanto a los resultados, luego de la centrifugación de 20 min el valor fue $71.63 \pm 4.11\%$, donde se contempla que hay una diferencia estadística significativa entre los 3 tiempos de centrifugación para cada ejemplar de alpaca tal como se puede observar en la Figura 6. Estas diferencias se deben a que la centrifugación prolongada de más de 20 min causa daños en los espermatozoides afectando la movilidad por el aumento de las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) que causa daño oxidativo en las membranas alterando su estructura y reduciendo su movilidad, también inicia una peroxidación lipídica de las membranas y el estrés oxidativo Montesa, (2011).

Zhana et al., (2023), en su investigación sobre espermatozoides en mamíferos se logró observar que las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) además de alterar la función de la mitocondria, también activa las caspasas que son enzimas involucradas en la apoptosis lo que lleva a la muerte de espermatozoides y reduce la movilidad. En estudios recientes en bovinos, haciendo uso de protectores de membrana como la BSA que actúa como un componente conservador se puede minimizar los daños ocasionados por la centrifugación (Martínez et al., 2022).

Otros autores como Munera et al., (2023) realizaron investigaciones en otras especies de roedores concuerdan que la centrifugación puede ocasionar daños a los espermatozoides promoviendo lesiones mecánicas, estructurales, cambios en el acrosoma y una reducción sustancial de la movilidad; sin embargo, indican que una centrifugación por 20 min (a $600 \times g$) con gradiente de densidad de una sola capa (SLC) en semen congelado permite tener muestras de calidad espermática superiores en movilidad y funcionamientos de membrana. Gómez, (2020) reporta que el uso de altas fuerzas de centrifugación ($4448 \times g$) por tiempos cortos como 7 min, permiten una tasa de recuperación de hasta 98% con una depreciación en la pérdida de movilidad de los espermatozoides de alpaca (3,5%), por tanto, una centrifugación a altas fuerzas por cortos tiempos y haciendo uso de

medios protectores posibilitan separar espermatozoides con la mínima pérdida postcentrifugación.

En la tabla 4, se muestra los promedios (%) y la DE de la integridad de membrana espermática. En ella se observa que el porcentaje promedio más alto a 10 min de centrifugación fue de $66.64 \pm 4.19\%$, en la centrifugación de 20 min fue de $56.31 \pm 4.74\%$ y en 30 min fue de $22.69 \pm 3.86\%$, observándose una diferencia estadística significativa entre los tres tiempos de centrifugación, tal como se muestra en la Figura 7; mientras el valor en cuanto al control fue de $63.46 \pm 2.48\%$, lo cual evidencia que se halló una mejora en la proporción de espermatozoides con integridad de membrana espermática intacta en aquellos que fueron separados por gradiente Percoll a 10 min, resultados que concuerdan con otros autores en otras especies (Munera et al., 2023). Sin embargo, se observa que hay un mayor daño de la membrana espermática a mayor tiempo de centrifugación y se obtiene mejores promedios para una centrifugación de 10 min. Camargo, (2020) en su investigación reporta que la técnica de centrifugación con Percoll desde 5 minutos hasta 15 minutos no impacta la integridad de la membrana ni causa daños en la morfología de la cabeza de los espermatozoides bovinos.

Estos resultados difieren con los hallazgos de Restrepo et al., (2016) que trabajaron en semen de equinos lo cual señala que inclusive a bajos niveles de fuerza de centrifugación ($600 \times g$, $1200 \times g$ y $1800 \times g$) por 10 min logran perturbar la movilidad espermática, la integridad del acrosoma y el potencial de la membrana interna acrosomal de los espermatozoides equinos en todos los tratamientos, en relación al semen no centrifugado (control). Del mismo modo también difiere con los resultados de Urrego et al., (2008) que en su investigación en bovinos señala que se encontró diferencia significativa en cuanto al daño de la membrana plasmática evaluado por HOST entre aquellos espermatozoides centrifugados por 45 min ($700 \times g$) con respecto a los no centrifugados, pero que no hubo diferencias significativas entre los no centrifugados y los centrifugados por 10 y 30 min. Estas diferencias de los resultados con respecto al presente trabajo indican que los espermatozoides de otras especies como bovinos son mucho más tolerantes al daño producido por la centrifugación que afecta la membrana plasmática, membrana acrosomal ya que la membrana plasmática tiene una alta concentración de ácidos grasos polinsaturados, los cuales inician una peroxidación lipídica en presencia de la ERO.

Según Deori et al., (2020). en su investigación reciente se comprobó que un mayor tiempo de centrifugación afecta negativamente la integridad de la membrana espermática produciendo daño mecánico debido a la fuerza de centrifugación prolongada que conlleva a la formación de poros o la pérdida de integridad, además ocasiona un desorden de la membrana lo cual afecta la estructura y se produce una pérdida lipídica esencial en la membrana y un estrés oxidativo que afecta su capacidad fertilizante del espermatozoide.

En la Tabla 5, se expone los promedios (%) y la DE de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro individualmente en 5 machos analizados, el valor más alto a los 10 min de centrifugación con Percoll fue de $83.04 \pm 3.63\%$, así mismo se obtuvieron valores promedio a los 20 min de centrifugación de $66.45 \pm 3.36\%$, y a los 30 min $33.86 \pm 4.94\%$, con respecto al valor de la muestra sin centrifugación fue de $73.47 \pm 3.05\%$. Esto marca una diferencia estadística significativa en relación a la centrifugación de 10 min, mientras que también existe una diferencia estadística significativa a los 20 y 30 min donde se puede observar una reducción de la integridad de la membrana acrosomal, tal como se puede observar gráficamente en la Figura 8. Todas las características microscópicas evaluadas reflejan una varianza en los valores promedio con respecto a la muestra control y los centrifugados a diferentes tiempos como se puede apreciar en la Figura 9. Algunos estudios concuerdan y se puede considerar que una fuerza de centrifugación alta o tiempo prolongado es perjudicial, en semen centrifugado a $1000 \times g$ durante 20 min los valores obtenidos de los niveles de integridad acrosomal, serían equivalentes a los alcanzados después de 48 horas de refrigeración (Restrepo et al., 2016).

En la investigación realizada por Gómez, et al., (2014) indica que la centrifugación a $900 \times g$ durante 10 min en semen caprino usando medios protectores se adquirió un decremento de la integridad acrosomal. En especies como el perro, los tiempos cortos de centrifugación habrían hecho posible una mengua en la pérdida de la funcionalidad integral de la membrana plasmática y acrosomal; de otro modo, en semen de bovinos empleando tiempos cortos pero altas fuerzas de centrifugación ($900 \times g$ por 5 min) en gradiente de Percoll se contempló una disminución de la integridad de la membrana hasta en un 22.85%.

Se entiende que la centrifugación es intrínsecamente nociva y puede concebir perturbaciones celulares generales dependiendo de la especie. En el Percoll, se

realiza doble centrifugación. En la primera centrifugación, se elimina el sobrenadante y el sedimento resultante se vuelve a resuspender en un medio de capacitación volviendo a centrifugarse y como una alternativa opcional se realizan trabajos en miniPercoll reduciendo el tiempo y aumentando la fuerza de centrifugación. Souza, (2019) en su investigación en ovinos indica que al amplificar la centrifugación a 500 x *g* por 5 min haciendo uso de la separación mediante miniPercoll, no obstante, la tasa de recuperación fue baja, los parámetros como la movilidad, integridad de membrana espermática y acrosomal no fueron afectados en semen congelado.

Carretero et al., (2015) en su investigación de la evaluación de la integridad acrosomal en llamas con la tinción de campo claro, accede a estipular el estado acrosomal y la viabilidad simultáneamente por la triple tinción. Los espermatozoides con acrosoma intacto pueden sufrir reacciones acrosómicas durante tiempos prolongados de centrifugación, siendo esencial para la penetración a la zona pelúcida del ovocito.

Cueva, (2018) señala que el uso de técnicas sencillas como la triple tinción para evaluar el estado acrosomal de los espermatozoides y la tinción fluorescente mediante Hoechst 33342/PI analizados con el sistema AndroVision fue un triunfo tal como se muestra en la Figura 10, donde los espermatozoides teñidos de color azul son aquellos espermatozoides con membrana intacta y los espermatozoides teñidos de color rojo/rosado son los no viables con membrana espermática dañada, el Ioduro de propidio (PI) es capaz de atravesar a los espermatozoide con membrana plasmática lesionada y por tanto permite distinguir las células muertas y el Hoechst 33342 es capaz de atravesar la membrana celular intacta.

Lima et al., (2022) en su investigación demuestra que una fuerza y tiempo prolongado de centrifugación además de causar daños mecánicos que conlleva a la pérdida de la integridad, también causa una desorganización de la membrana acrosomal lo que afecta la función y la estructura de esta, del mismo modo, se demostró que puede causar la pérdida de enzimas acrosómicas esenciales lo que afecta la disposición de los espermatozoides para fertilizar el óvulo, también produce una disminución de la capacidad de reacción acrosómica.

VI. CONCLUSIONES

1. La centrifugación mediante gradiente de Percoll en espermatozoides de alpaca durante 10 min a 100 x *g* proporcionó una tasa alta de movilidad espermática, mientras que centrifugación por 20 min indujo una disminución de 9-10% de movilidad; y centrifugación por 30 min mostró que puede causar daños en la movilidad donde se halló diferencia estadística significativa con una disminución de más del 50% con respecto a los resultados de la centrifugación por 10 min.
2. La Integridad de la Membrana Espermática (IME) fue otro de las variables más afectadas por la separación en gradiente de Percoll, con centrifugación prolongada de 30 min a 700 x *g* ocasionó pérdida de la integridad de la membrana espermática existiendo así diferencia estadística significativa entre los tratamientos.
3. En los resultados de la evaluación de la Integridad Acrosomal (IA) arrojaron que a mayor tiempo de centrifugación se produce una pérdida de la integridad acrosomal producto del estrés oxidativo que genera la centrifugación prolongada, afectando en la fusión a la zona pelúcida del óvulo, la centrifugación con Percoll a 10 min dio mejores resultados con diferencia estadística significativa.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la separación espermática mediante gradiente de Percoll con centrifugación por 10 min a 700 x g, lo cual brinda un buen aporte para las evaluaciones de los parámetros seminales en semen de alpaca.
- Es necesario realizar más trabajos de investigación utilizando diferentes tiempos y fuerzas de centrifugación en eyaculados de alpaca para evaluar las características y daños que puede ocasionar esta técnica y que conduzca a una máxima recuperación celular con daños mínimos, así mejorar los índices de eficiencia en la selección mediante gradiente de Percoll que son usadas en los procedimientos de FIV.
- Realizar más trabajos en procedimientos de separación espermática haciendo uso de protectores de membrana en semen de alpaca ya que en esta especie son muy pocos los trabajos realizaron y así encontrar buenos conservadores para minimizar los efectos que ocasiona esta técnica y tener una mejora en la tasa de supervivencia de los espermatozoides y la eliminación de ERO que se produce a consecuencia del estrés oxidativo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Álvarez, J. (2005). Preparación del semen para Técnicas de Reproducción Asistida. Centro de Infertilidad Masculina ANDROGEN.
- Ángel, D., Pérez, N., Pareja, A., Camargo, O., y Urrego, R. (2009). Efecto de la preparación espermática previo a la fertilización in vitro sobre la membrana plasmática y el ADN de semen bovino sexado. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Auquilla, V. (2011). Evaluación de las técnicas swim-up y gradientes de densidades para la capacitación espermática. Universidad de Cuenca. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2439>.
- Camargo, K. (2020). Efecto de diferentes tiempos de centrifugación utilizando el gradiente de Percoll 45-90% sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos. Universidad Zamorano de Honduras.
- Carretero, M., Fumuso, F., Miragaya, M., y Giuliano, S. (2015). Evaluación del estado acrosomal en espermatozoides de llama. SPERMOVA.
- Ciprian, R. (2019). Uso de la Dimetilformamida en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Contreras, M., Naveros, M., y Olaguivel, C. (2021). Efecto del uso de dos técnicas de selección espermática en la producción in vitro de embriones de alpaca.
- Contreras, M. (2018). Efecto de los procedimientos de separación sobre la integridad del DNA espermático de *Vicugna pacos* “alpaca”, Ayacucho 2017. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Cueva, R. (2018). Integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” recuperados de semen fresco, refrigerado y congelado. Ayacucho - 2018. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. <http://biblioteca.unsch.edu.pe>.
- Delgado, J. (2019). Evaluación de la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en muestras frescas sin fijar (0 horas) y muestras fijadas en formaldehído (24 horas y 1 semana) mediante citometría de flujo. Universidad Mayor de San Marcos.

- Doeri, S., Johannisson, A., y Morrell, J. (2020). Single layer centrifugation with 20% or 30% Percicoll separates the majority of spermatozoa from a sample without adversely affecting Sperm quality.
- Espezúa, D., Iquise, A., y Espinoza, L. (2021). Producción de embriones *in vitro* de alpacas.
- Giuliano, S., Carretero, M., Gambarotta, M., Neild, D., Trasorras, V., Pinto, M., y Miragaya, M. (2010). Improvement of llama (*Lama glama*) seminal characteristics using collagenase. *Animal Reproduction Science*.
- Gómez, N., López, Á., Ortiz, L., Bedoya, J., y Penagos, F. (2014). Cultivo de tejidos reproductivos y producción y manipulación de embriones bovinos: Libro de Procedimientos.
- Gómez, E. (2020). Diseño y evaluación de un método de conservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*) en medio sólido. Universidad Agraria La Molina.
<https://repositorio.lamolina.edu.pe>.
- Gosálvez, J., López, C., Fernández, J., Esteves, S., y Johnston, S. (2015). Unpacking the mysteries of sperm DNA fragmentation: Ten frequently asked questions. *Journal of Reproductive Biotechnology and Fertility*
- Hafez, E., y Hafez, B. (2007). Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-Hill.
- Heutelbeck, A., Oldenhof, H., Rohn, K., Martinsson, G., Morrell, J., y Sieme, H. (2015). Use of density centrifugation for delayed cryopreservation of stallion sperm: Perform sperm selection directly after collection or after storage? *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*.
- Hidalgo, C., Tamargo, C., y Díez, C. (2005). Análisis del semen bovino. *Villaviviosa: Serida*.
- Samudio, k. (2020). Efecto de diferentes tiempos de centrifugación utilizando el gradiente de Percoll 45-90% sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos. (Tesis de pregrado).
- Lima, I., Hurri, E., Ntallaris, T., Johannisson, A., Stalhammar, H., y Morrell, J. (2022). Esperm quality in Young bull semen can be improved by single layer centrifugation. *Revista MDPI*.
- Linares, E. (2020) Evaluación de la temperatura sobre la integridad de la membrana plasmática del semen de alpaca criopreservados, Ayacucho 2019.

- López, E. (2019). Métodos para determinar la viabilidad celular con aplicación en odontología. Universidad San Martín de Porres. <https://repositorio.usmp.edu.pe>.
- Martínez, J., Duverger, O., Díaz, N., Interian, L., Denis, R., y Palacios, A. (2022). Efecto de diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina en la congelabilidad del semen caprino. Revista MVZ Córdoba. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2632>.
- Mena, C. (2014). Evaluación de dos tratamientos, solución gradiente Percoll (45-90%) y otra solución con la adición de bicarbonato de sodio en vacas primer parto. Universidad Técnica de Cotopaxi. Ecuador.
- Mendoza, E. (2015). Evaluación de dos protocolos para la congelación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*) 2013. Tesis Med. Vet. UNSCH.
- Montesa, J. (2011). Estudio del estrés oxidativo en pacientes con enfermedad renal crónica: prediálisis, hemodiálisis y diálisis peritoneal.
- Munera, C., y Restrepo B. (2023). Efecto de la separación por gradiente en una sola capa sobre la calidad de espermatozoides criopreservados de *Cuniculus paca*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.
- Ocho, B. (2016). Evaluación de diferentes tiempos y fuerzas *g* en semen equino. Caracterización del sobrenadante. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.
- Palomino, W. (2019). Efecto de la suplementación de dos agentes capacitantes en el medio de fertilización para la producción *in vitro* de embriones de alpaca (*Vicugna pacos*) a 2750 msnm. Ayacucho 2017. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Parrish, J., Krogenaes, A., y Susko, J. (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. Theriogenology. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00271-9).
- Peña, M., y Purizaca, I. (2014). Centrifugación. Universidad Nacional de San Agustín.
- Pérez, M., Román, B., y Santiani, A. (2020). Efecto de la criopreservación en la integridad acrosomal de espermatozoides viables de alpaca evaluada mediante citometría de flujo. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.

- Ramírez, A. (2017). Evaluación de tres tratamientos de semen sobre la filancia, movilidad y vitalidad espermática en alpacas (*Vicugna pacos*) a 2736 msnm. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
- Restrepo, G., Cantero, J., y Montoya, J. (2016). Efecto de la centrifugación sobre la integridad y la funcionalidad de espermatozoides equinos.
- Rodríguez, A., (2012) Eimeriosis en crías de alpacas: prevalencia y factor de riesgo. Universidad Nacional del Altiplano de Puno.
- Rubio, J., Quintero, A., y González, D. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. Revista Científica. <http://ve.scielo.org/scielo>.
- Salazar, J. (2019). Introducción a las técnicas de capacitación espermática: Un proceso in vitro. Rev. Colegio de Microb. Quim. Clínica de Costa Rica.
- Samudio, K. (2020). Efecto de diferentes tiempos de centrifugación utilizando el gradiente de Percoll 45-90% sobre la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos.
- Sánchez, K. (2016). Nuevos métodos integrados de evaluación de la calidad seminal en vacuno. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sánchez, M., Sánchez, I., y Bueno, G. (2017). Técnicas avanzadas para selección de espermatozoides. *Revista del Laboratorio Clínico*.
- Serrano, D. (2018). Activación de espermatozoides de mamíferos con el ionóforo A23187. Universidad Politécnica de Valencia.
- Souza, M. (2019). Producción *In vitro* de embriones ovinos. Manual de procedimientos. Universidad de la República Uruguay.
- Urrego, R., Ríos, A., y Camargo, O. (2008). Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.
- Zaha, L., Muresan M., Tulcán c., Huniadi A., Naghi P., Sandor M., Tripon R., Gaspar C., Major K., Sachelarie L., y Stefan L. (2023) The Role of Oxidative Stress in Infertility. Revista MDPI.
- Zhu, W., y Liu, X. (2000). Cryodamage to plasma membrane integrity in head and tail regions of human sperm. Asian Journal of Andrology.
- Zirena, N. (2014) Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de los medios de cultivo.

Tabla 6. Medio base TALP-SPERM 10X para 40 ml.

Nombre	Fórmula	Cantidad
Cloruro de sodio	NaCl	0.2308 g
Cloruro de potasio	KCl	0.0024 g
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	0.084 g
Fosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄	0.00168 g
Lactato de sodio	NaC ₃ H ₅ O ₃	0.148 ml
Cloruro de calcio	CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.01176 g
Cloruro de magnesio	MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.0089 g
Ácido 4-(2hidroxiethyl) piperazin-1-iletanosulfónico	HEPES	0.10412 g
Ajustar el pH a 7.4, filtrar usando filtro de 0,2 µm y almacenar en la nevera.		

Tabla 7. Medio base de TALP-FIV para 50 ml

Nombre	Fórmula	Cantidad
Cloruro de sodio	NaCl	0.3331 g
Cloruro de potasio	KCl	0.0119 g
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	0.105 g
Fosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄	0.0018 g
Lactato de sodio	NaC ₃ H ₅ O ₃	0.093 ml
Cloruro de calcio	CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.0147 g
Cloruro de magnesio	MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.0051 g
Rojo fenol	C ₁₉ H ₁₄ O ₅ S	0.0005 g
Ajustar el pH a 7.4, filtrar usando filtro de 0,2 µm y almacenar en la nevera.		

Anexo 2. Preparación de los Stock

Tabla 8. Stock de cloruro de magnesio 0.1M para 10 ml.

Nombre	Fórmula	Cantidad
Cloruro de magnesio	MgCl ₂ (6H ₂ O)	0.0203 g
Agua bidestilada	H ₂ O _d	10 ml

Mezclar con vórtex, filtrar con 0.2 µm y almacenar en la nevera

Tabla 9. Stock de cloruro de calcio 1M para 5 ml.

Nombre	Fórmula	Cantidad
Cloruro de calcio	CaCl ₂ (2H ₂ O)	0.735 g
Agua bidestilada	H ₂ O _d	5 ml

Mezclar con vórtex, filtrar con 0.2 µm y almacenar en la nevera

Anexo 3. Preparación de Percoll de 90% y 45%.

Tabla 10. Percoll de 90%.

Nombre	Fórmula	Cantidad
Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato	Talp Sperm 10X	0.5 ml
Cloruro de calcio	CaCl ₂ (2H ₂ O)	9.85 µl
Cloruro de magnesio	MgCl ₂ (6H ₂ O)	19.7 µl
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	10.45 mg
Lactato de sodio	NaC ₃ H ₅ O ₃	18.4 µl
Percoll	* Sigma P4937	4.5 ml

Mezclar con vórtex, ajustar el pH a 7,4 y almacenar.

*Marca y referencia del reactivo

Tabla 11. Percoll de 45%.

Nombre	Fórmula	Cantidad
Tyrode's Albúmina Lactato Piruvato	Talp Sperm 10X	10 ml
Percoll	* Sigma P4937	10 ml

Mezclar con vórtex y almacenar en la nevera.

*Marca y referencia del reactivo

Tabla 12. Datos generales de las evaluaciones de las muestras seminales de cada ejemplar de Vicugna pacos “alpaca” (n=5; r=4). INIA – Ayacucho 2023.

Macho	1	2	3	4	5
Código de arete	12006	9184	9210	13022	S/A
Color	Blanco lechoso	semi lechoso	Blanco lechoso	Blanco semi lechoso	Semi lechoso
Volumen (ml)	1.50	0.83	1.85	1.50	1.65
Filancia (cm)	2.3	1.5	1.9	1.0	1.0
Concentración (x106/ml)	112.78	174.3	197.4	164.4	110.85
Movilidad	76.75	79.75	75.05	76.18	76.33
Integridad de membrana espermática (%)	65.5	64.5	63.57	62.63	63.08
Integridad acrosomal (%)	73.00	75.00	71.73	73.55	74.08

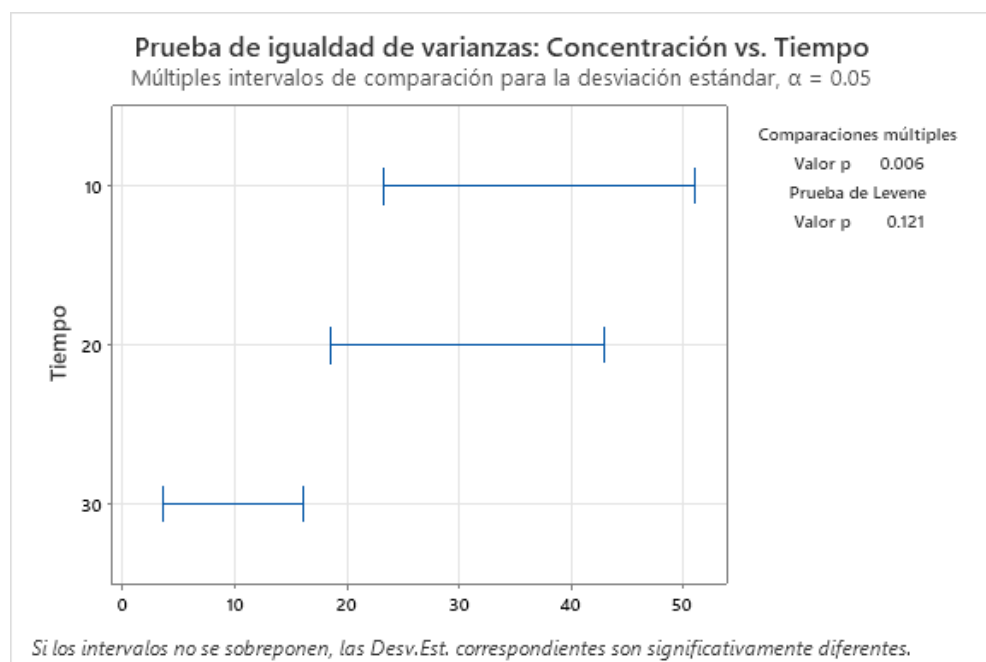
Anexo 4. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) de espermatozoides de Vicugna pacos “alpaca”. INIA – Ayacucho 2023.

Parámetros estadísticos	Tiempo de centrifugación (min)		
	10	20	30
A-cuadrado	0.35	0.31	0.23
Valor p	0.293	0.394	0.641
Media	169.44	170.83	102.03
Desviación estándar	25.13	20.58	5.49
Mediana	176.15	178.5	103
N	5	5	5
Mínimo	140.45	146.15	90.93
Máximo	194.9	193.9	107.5
Intervalo de confianza	95%	95%	95%

Anexo 5. Prueba de igualdad de varianzas por el método de Levene de la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA – Ayacucho 2023.

Prueba

Método	Estadística de prueba	Valor p
Comparaciones múltiples	-	0.006
Levene	2.53	0.121



Anexo 6. Prueba de análisis de Varianza ANVA de un DBCA para la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Bloque	4	3391.6	847.9	7.15	0.009
Tiempo	2	15500.3	7750.2	65.39	0
Error	8	948.1	118.5		
Total	14	19840.1			

Anexo 7. Prueba de comparación por pareja utilizando el método de Tukey y un nivel de confianza de 95% para la concentración ($\times 10^6/\text{ml}$ de semen) espermática de *Vicugna pacos* “Alpaca”.

Comparación por pareja de Tukey: Tiempo (min)			
Tiempo	N	Media	Agrupación
10	5	169.4	A
20	5	170.8	A
30	5	102.0	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparación por pareja de Tukey: Bloque				
Arete	Bloque	N	Media	Agrupación
9184	3	3	165.0	A
13022	2	3	160.4	A
S/A	4	3	152.5	A
9210	5	3	130.5	A
12006	1	3	128.9	A

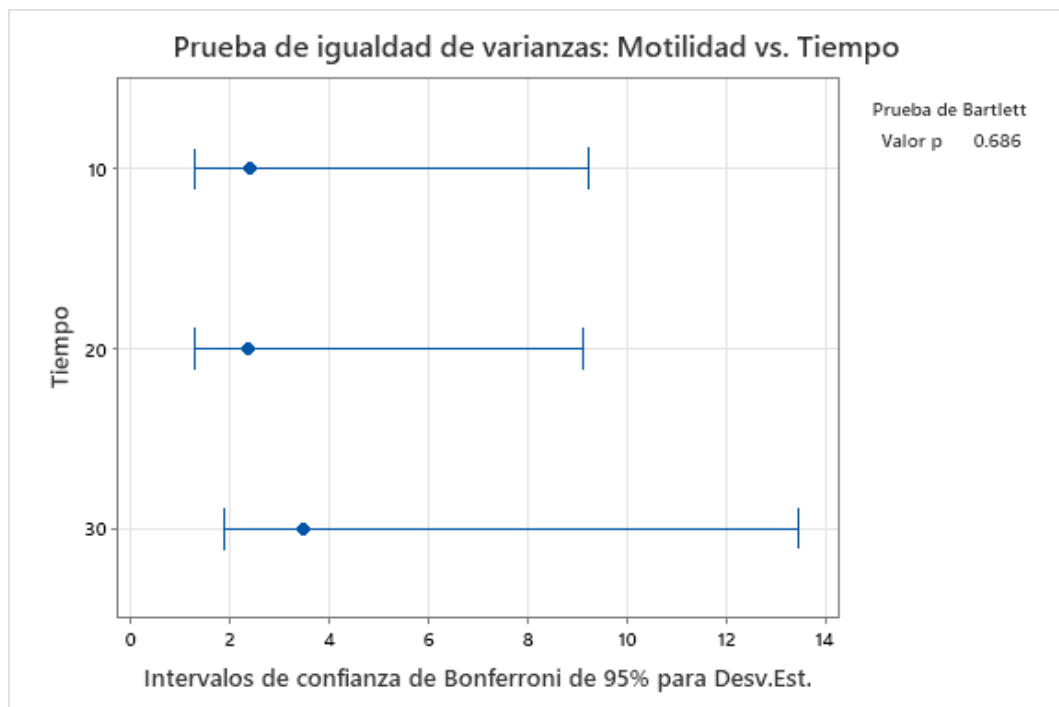
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 8. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para la movilidad (%) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Parámetros estadísticos	Tiempo de centrifugación (min)		
	10	20	30
A-cuadrado	0.55	0.34	0.34
Valor p	0.074	0.322	0.329
Media	82.87	71.63	34.13
Desviación estándar	2.399	2.364	3.496
Mediana	81.83	71.13	34
N	5	5	5
Mínimo	80.88	69.38	29.73
Máximo	86.97	74.53	39.48
Intervalo de confianza	95%	95%	95%

Anexo 9. Prueba de igualdad de varianzas por el método de Bartlett de la movilidad (%) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Prueba			
	Método	Estadística de prueba	Valor p
	Bartlett	0.37	0.686



Anexo 10. Prueba de análisis de Varianza ANVA de un DBCA para la movilidad (%) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Análisis de Varianza:

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Bloque	4	76.23	19.06	8.47	0.006
Tiempo	2	6514.2	3257.1	1446.82	0
Error	8	18.01	2.25		
Total	14	6608.44			

Anexo 11. Prueba de comparación por parejas utilizando el método de Tukey y un nivel de confianza del 95% para la movilidad (%) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Comparación por pareja de Tukey: Tiempo (min)			
Tiempo	N	Media	Agrupación
10	5	82.87	A
20	5	71.63	B
30	5	34.13	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparación por pareja de Tukey: Bloque				
Arete	Bloque	N	Media	Agrupación
9184	2	3	66.9933	A
13022	4	3	63.2367	A
S/A	5	3	62.0033	B
9210	3	3	61.8033	B
12006	1	3	60.3433	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

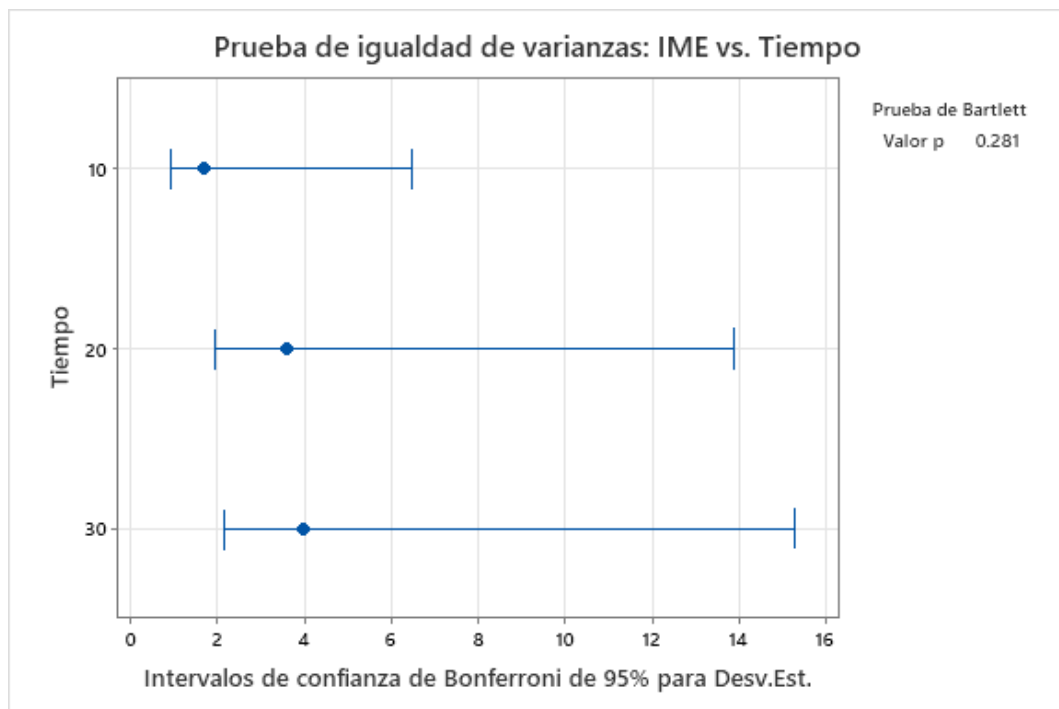
Anexo 12. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para la integridad de membrana espermática (%) de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Parámetros estadísticos	Tiempo de centrifugación (min)		
	10	20	30
A-cuadrado	0.36	0.24	0.2
Valor p	0.29	0.594	0.739
Media	66.64	56.31	22.69
Desviación estándar	1.68	3.61	3.98
Mediana	67.25	56.3	21.88
N	5	5	5
Mínimo	64.38	51.8	18.35
Máximo	68.13	60.55	28.7
Intervalo de confianza	95%	95%	95%

Anexo 13. Prueba de igualdad de varianzas por el método de Bartlett de la integridad de membrana espermática (%) de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Prueba

Método	Estadística de prueba	Valor p
Bartlett	2.54	0.281



Anexo 14. Prueba de análisis de Varianza ANVA de un DBCA para la integridad de membrana espermática (%) de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Análisis de Varianza:

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Bloque	4	90.36	22.59	5.01	0.026
Tiempo	2	5281.78	2640.89	585.44	0
Error	8	36.09	4.51		
Total	14	5408.23			

Anexo 15. Prueba de comparación por parejas utilizando el método de Tukey y un nivel de confianza del 95% para la integridad de membrana espermática (%) de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Comparación por pareja de Tukey: Tiempo				
Tiempo	N	Media	Agrupación	
10	5	66.64	A	
20	5	56.31	B	
30	5	22.69	C	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Comparación por pareja de Tukey: Bloque				
Arete	Bloque	N	Media	Agrupación
9184	2	3	52.4333	A
12006	1	3	49.2933	A B
9210	3	3	49.1433	A B
13022	4	3	46.3400	B
S/A	5	3	45.5083	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

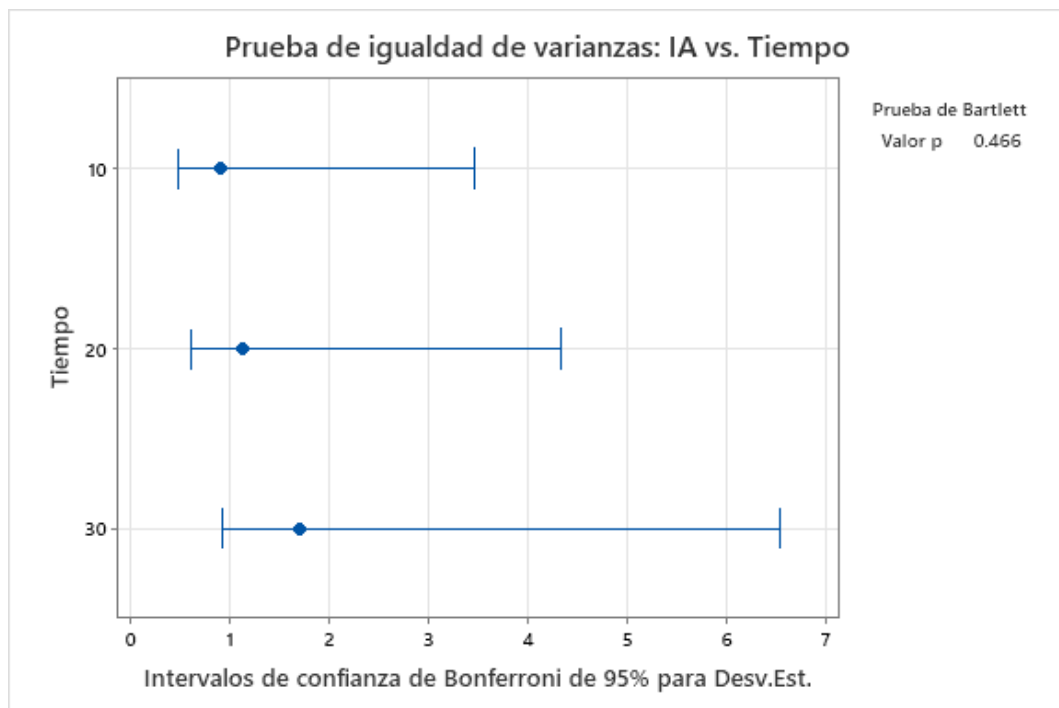
Anexo 16. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para la integridad acrosomal (%) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Parámetros estadísticos	Tiempo de centrifugación (min)		
	10	20	30
A-cuadrado	0.28	0.22	0.23
Valor p	0.495	0.68	0.62
Media	86.04	66.45	33.86
Desviación estándar	0.9	1.124	1.698
Mediana	83.05	66.45	34
N	5	5	5
Mínimo	82.03	65.15	31.48
Máximo	84.05	68.15	36.2
Intervalo de confianza	95%	95%	95%

Anexo 17. Prueba de igualdad de varianzas por el método de Bartlett de la integridad acrosomal (%) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Prueba

Método	Estadística de prueba	Valor p
Bartlett	1.53	0.466



Anexo 18. Prueba de análisis de Varianza ANVA de un DBCA para la integridad acrosomal (%) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Análisis de Varianza:

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor P
Bloque	4	7.38	1.86	1.19	0.387
Tiempo	2	6259.36	3129.68	2012.17	0
Error	8	12.44	1.56		
Total	14	6279.18			

Anexo 19. Prueba de comparación por parejas utilizando el método de Tukey y un nivel de confianza del 95% para la integridad acrosomal (%) de espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca”.

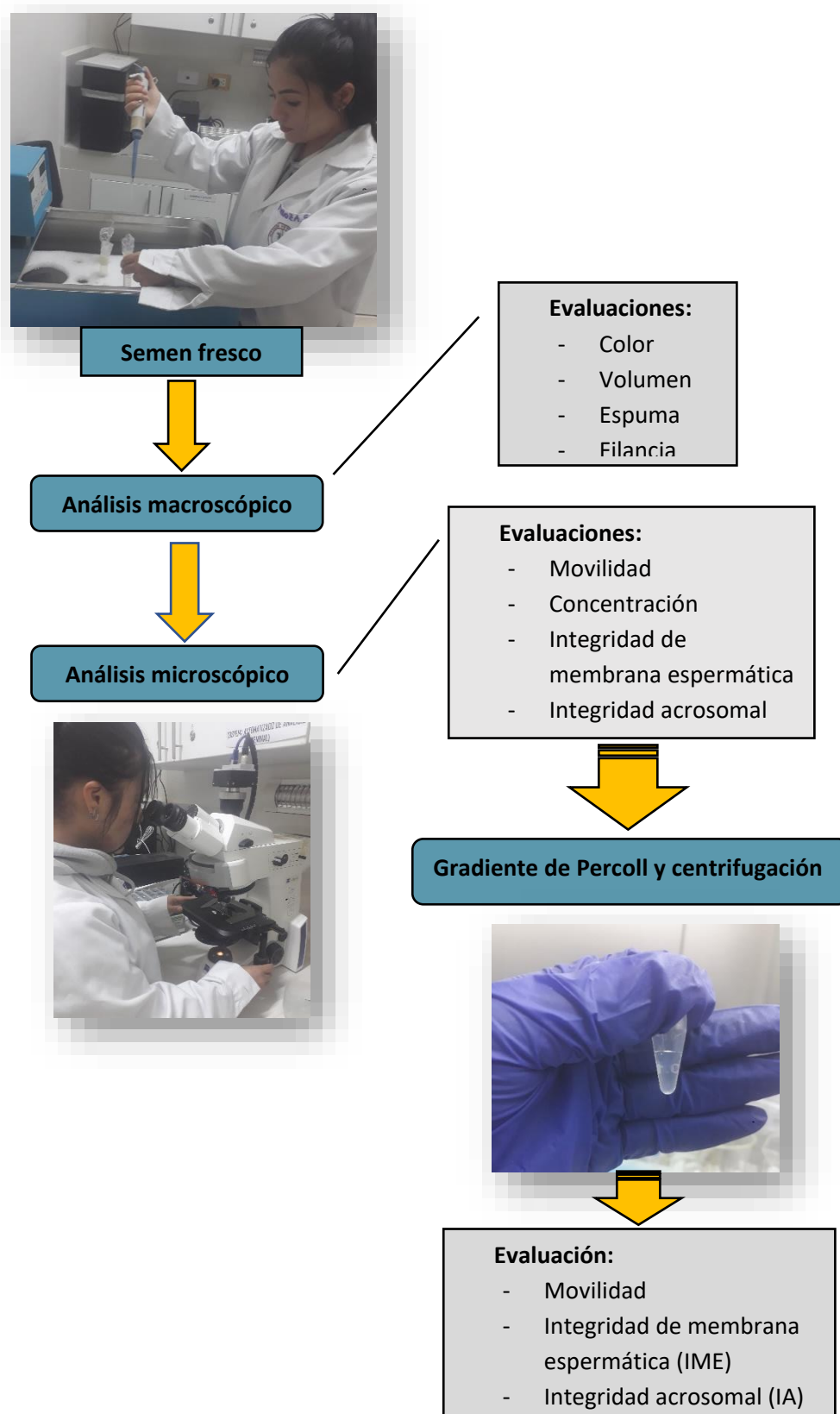
Comparación por pareja de Tukey: Tiempo				
Tiempo	N	Media	Agrupación	
10	5	83.04	A	
20	5	66.45	B	
30	5	33.86	C	

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

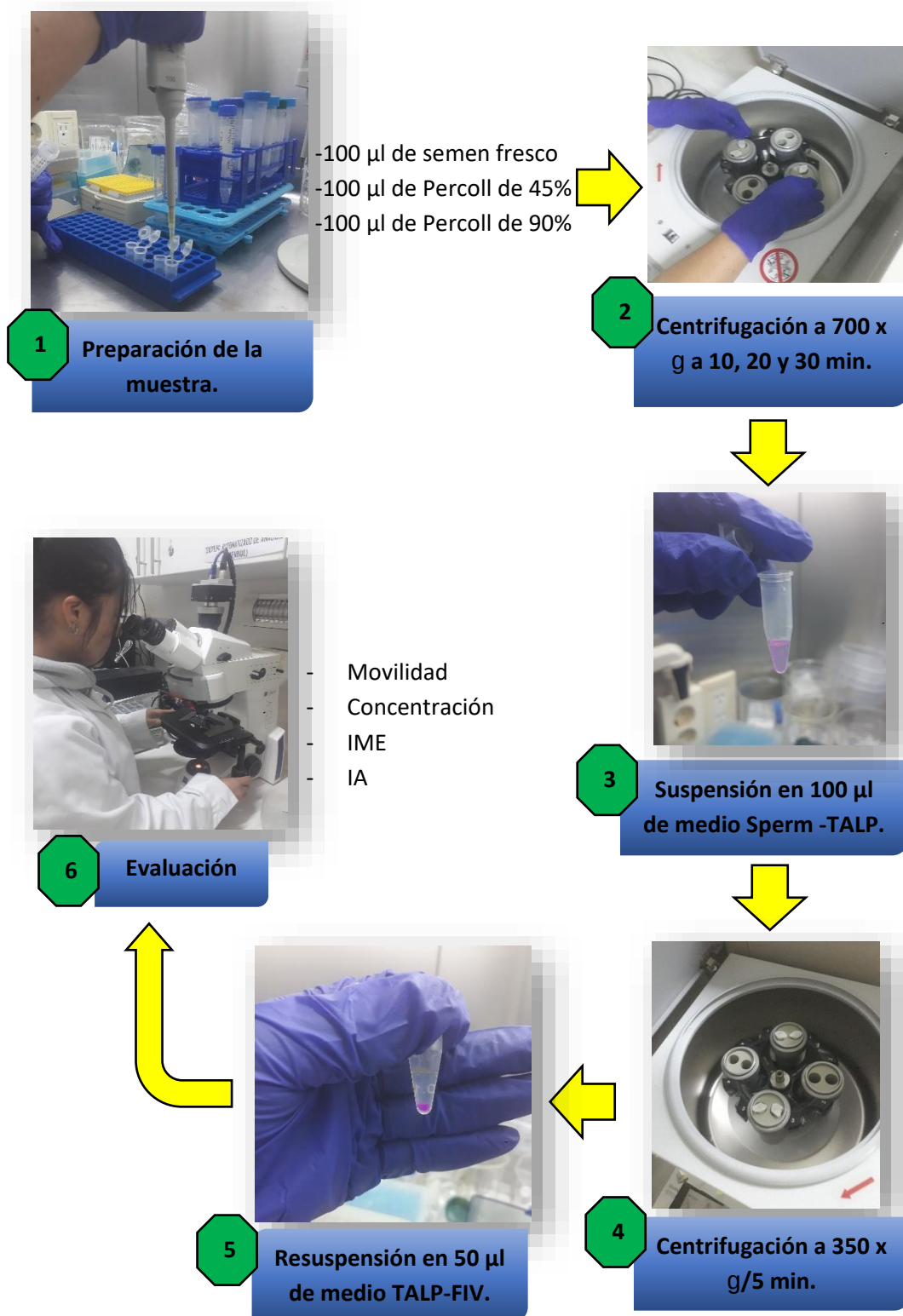
Comparación por pareja de Tukey: Bloque				
Arete	Bloque	N	Media	Agrupación
9184	2	3	62.13	A
9210	3	3	61.65	A
13022	4	3	60.95	A
S/A	5	3	60.69	A
12006	1	3	60.14	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Anexo 20. Flujograma del análisis macroscópico y microscópico del semen de alpaca en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de INIA – Ayacucho 2023.



Anexo 21. Proceso de gradiente de Percoll y centrifugación para la evaluación de los parámetros espermáticos de alpaca en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de INIA – Ayacucho 2023.



Anexo 22. MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO. Efecto del tiempo de centrifugación en el gradiente de Percoll sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal de *Vicugna pacos* “alpaca”. Ayacucho – 2023.

AUTORA. Yedixa Rosalinda Quispe Vilchez

PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
PROBLEMA PRINCIPAL ¿Cuál será el efecto de la gradiente de Percoll a diferentes tiempos de centrifugación sobre la integridad de membrana espermática y acrosomal de semen de alpaca?	GENERAL. Evaluar el efecto del tiempo de centrifugación en el gradiente de Percoll sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. ESPECÍFICOS: Evaluar los parámetros de movilidad espermática luego de someter a diferentes tiempos de centrifugación por gradiente de Percoll. Evaluar la integridad de la membrana espermática luego de someter a diferentes tiempos de centrifugación por gradiente de Percoll. Evaluar la integridad acrosomal luego de someter a diferentes tiempos de centrifugación en la separación espermática por gradiente de Percoll.	Antecedentes Espermatozoide de alpaca Estructura del espermatozoide de alpaca Características seminales Integridad de la membrana espermática Integridad del acrosoma espermático Técnicas de separación espermática Gradiente de Percoll La centrifugación seminal Técnicas para la evaluación de la integridad de membrana espermática y acrosomal Tinción fluorescente Hoechst 33342/PI Triple tinción Azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa.	Durante la separación seminal por gradiente de Percoll a un mayor tiempo de centrifugación tiene un efecto negativo sobre la integridad de membrana espermática y acrosomal.	Variable Independiente Tiempo de centrifugación 10 min 20 min 30 min Variable Dependiente Concentración Movilidad Integridad de membrana espermática Integridad acrosomal	Tipo de investigación Básica - Experimental Tamaño de la muestra 20 muestras de semen de alpaca colectados mediante vagina artificial a partir de 5 machos. Técnicas Observación Determinación Tinción fluorescente Triple tinción Análisis estadístico Prueba de normalidad, igualdad de varianzas y ANVA.

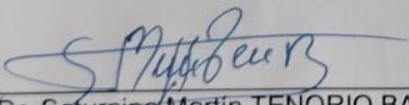
**UNSCH**FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

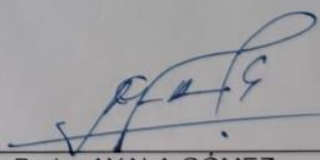
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Yedixa Rosalinda QUISPE VILCHEZ
RESOLUCIÓN DECANAL N° 462-2024-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cinco con treinta de la tarde del día lunes once de noviembre del año dos mil veinticuatro; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente el Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA, Dr. Pedro AYALA GÓMEZ (miembro – jurado), M.V. Alfredo POZO CURO (miembro – jurado), Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR (miembro – jurado), Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA (miembro – asesor), actuando como secretario docente el Mg. Luis Uriel MOSCOSO GARCÍA; para presenciar la sustentación de tesis titulada: **Efecto del tiempo de centrifugación en el gradiente de Percoll sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal de Vicugna pacos "alpaca". Ayacucho – 2023.**; presentado por la **Bach. Yedixa Rosalinda QUISPE VILCHEZ**; el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando a la sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas a la sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

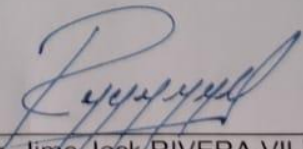
Miembros del jurado evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Pedro AYALA GÓMEZ	16	15	16
M.V. Alfredo POZO CURO	14	15	15
Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR	15	16	16
	PROMEDIO		16

La sustentante alcanzó el promedio de 16 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso de la sustentante y el público al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las ocho de la noche con treinta minutos; firmando al pie del presente en señal de conformidad.

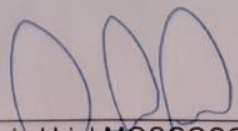

Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA
Presidente


Dr. Pedro AYALA GÓMEZ
Miembro – Jurado


M.V. Alfredo POZO CURO
Miembro – Jurado


Mg. Jime Jack RIVERA VILLAR
Miembro – Jurado


Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA
Miembro – Asesor


Mg. Luis Uriel MOSCOSO GARCÍA
Secretario - Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

Nº 009-2025-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Efecto del tiempo de centrifugación en el gradiente de Percoll sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal de *Vicugna pacos* "alpaca". Ayacucho – 2023.**, por YEDIXA ROSALINDA QUISPE VILCHEZ; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 20%, grado de coincidencia, menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario Nº 039-2021-UNSCH-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 13 de marzo de 2025.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

Dr. Fidel R. Mujica Lengua
DIRECTOR

Efecto del tiempo de centrifugación en el gradiente de Percoll sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal de *Vicugna pacos* "alpaca". Ayacucho – 2023.

por YEDIXA ROSALINDA QUISPE VILCHEZ

Fecha de entrega: 12-mar-2025 03:29p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2612895826

Nombre del archivo: UISPE_VILCHEZ-_Yedixa_Rosalinda-_pregrado-2023_TURNITIN_PDF.pdf (1.04M)

Total de palabras: 13983

Total de caracteres: 72023

Efecto del tiempo de centrifugación en el gradiente de Percoll sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal de Vicugna pacos "alpaca". Ayacucho – 2023.

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%	19%	2%	6%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	8%
2	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	2%
3	www.researchgate.net Fuente de Internet	2%
4	www.cuencarural.com Fuente de Internet	2%
5	purl.org Fuente de Internet	1%
6	1library.co Fuente de Internet	1%
7	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	1%
8	revistas.unicauca.edu.co Fuente de Internet	1%
9	www.coursehero.com Fuente de Internet	1%
10	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1%
11	zagan.unizar.es Fuente de Internet	<1%
12	www.scielo.org.ve Fuente de Internet	<1%
13	Submitted to Universidad Nacional Mayor de San Marcos Trabajo del estudiante	<1%

14 Quintero Moreno, Armando. "Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo", Bellaterra : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2004 <1 %
Fuente de Internet

15 hdl.handle.net <1 %
Fuente de Internet

Exclur citas	Activo	Exclur coincidencias	< 30 words
Exclur bibliografía	Activo		