

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto de dos dilutores en la integridad acrosomal de
espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y
congelado. Ayacucho - 2019.

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

Presentado por:

Bach. VEGA AGUILAR, Marisol

Asesor: Dr. MUJICA LENGUA, Fidel Rodolfo

AYACUCHO – PERÚ

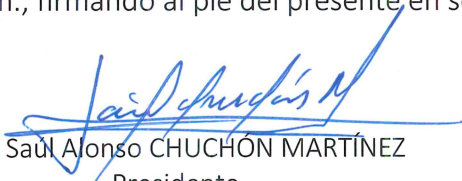
2022

**UNSCH**FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS****Bach. Marisol VEGA AGUILAR****R.D. N° 145-2022-UNSCH-FCB-D**

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del once de agosto del año dos mil veintidós; 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, presidido por el Dr. Saúl Alonso CHUCHÓN MARTÍNEZ; Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA (Miembro-Jurado); Dr. Luis Arturo RODRIGUEZ ZAMORA (Miembro-Jurado); Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA (Miembro-Asesor), Dr. Jesús Javier ÑACCHA URBANO (Miembro-4to Jurado), actuando como secretaria docente la Dra. Nilda Aurea APAYCO ESPINOZA; para presenciar la sustentación de tesis titulada: "Efecto de dos dilutores en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado. Ayacucho-2019"; presentado por la Bach. Marisol VEGA AGUILAR; el Presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó a la secretaria docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio al 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. Concluida la exposición, el Presidente invitó a cada uno de los Miembros 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 para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones, cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembrosdel Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA	16	16	16
Dr. Luis Arturo RODRIGUEZ ZAMORA	16	16	16
Dr. Jesús Javier ÑACCHA URBANO	16	15	16
PROMEDIO			16

La sustentante alcanzó el promedio de 1(dieciséis) aprobado. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso de la sustentante y el público al Auditorio dando a conocer los resultados, e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las 6:40 p.m.; firmando al pie del presente en señal de conformidad.



Dr. Saúl Alonso CHUCHÓN MARTÍNEZ
Presidente



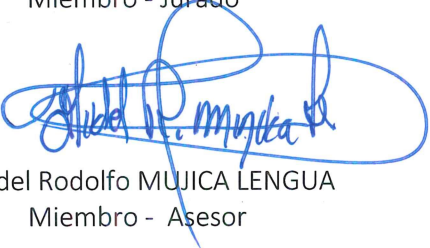
Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA
Miembro - Jurado



Dr. Luis Arturo RODRIGUEZ ZAMORA
Miembro - Jurado



Dr. Jesús Javier ÑACCHA URBANO
Miembro-4to. Jurado



Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA
Miembro - Asesor



Dra. Nilda Aurea APAYCO ESPINOZA
Secretaria Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

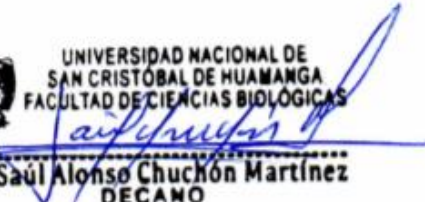
DECANATURA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS N° 023-
2022-FCB-D

Yo, SAÚL ALONSO CHUCHÓN MARTÍNEZ, Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional De San Cristóbal De Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **“Efecto de dos dilutores en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado. Ayacucho – 2019”**, presentado por la Bach. MARISOL VEGA AGUILAR; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 26%, 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 N° 039-2021-UNSCH-C.

En tal sentido, 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, 18 de octubre de 2022.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Dr. Saúl Alonso Chuchón Martínez
DECANO

Efecto de dos dilutores en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado.

Ayacucho - 2019

por Marisol Vega Aguilar

Fecha de entrega: 18-oct-2022 04:29p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 1929039416

Nombre del archivo: 1A_Vega_Aguilar_Marisol_Pregrado_2022_TURNITIN_3.docx (11.8M)

Total de palabras: 10264

Total de caracteres: 56491

Efecto de dos dilutores en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado.

Ayacucho - 2019

INFORME DE ORIGINALIDAD

26%

INDICE DE SIMILITUD

26%

FUENTES DE INTERNET

7%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

repositorio.unsch.edu.pe

Fuente de Internet

7%

2

repositorio.unap.edu.pe

Fuente de Internet

3%

3

cybertesis.unmsm.edu.pe

Fuente de Internet

2%

4

repositorio.lamolina.edu.pe

Fuente de Internet

2%

5

Submitted to Instituto Politecnico Nacional

Trabajo del estudiante

1%

6

repositorio.unsaac.edu.pe

Fuente de Internet

1%

7

ri.agro.uba.ar

Fuente de Internet

1%

8

hdl.handle.net

Fuente de Internet

1%

9	docplayer.es Fuente de Internet	1 %
10	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1 %
11	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	1 %
12	www.iga-goatworld.com Fuente de Internet	1 %
13	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1 %
14	dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet	1 %
15	bdigital.zamorano.edu Fuente de Internet	1 %
16	Hugo Paúl Viñán Díaz, Juan Enrique Paucar Espinoza, Enrique Alvarado Malca. "Adición de metil- β -ciclodextrina cargada de colesterol sobre la criopreservación de semen de toros Holstein Friesian", Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2020 Publicación	<1 %
17	eprints.ucm.es Fuente de Internet	<1 %
18	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %

19

Tabarez Rojas, Abigail, Universitat Autònoma de Barcelona. Departament de Medicina i Cirurgia Animals. "Optimización del protocolo de crioconservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción Blanca de Rasquera", [Barcelona] : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2015

Fuente de Internet

<1 %

20

www.asa-europe.org

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

A Dios, a mis queridos padres Francisco y María que me apoyaron a ser mejor persona cada día, e impulsaron en cada etapa de mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, mi *Alma Mater*, a la Facultad de Ciencias Biológicas, en especial a la Escuela Profesional de Biología, al Área Académica de Biotecnología y plana docente por compartir todos los conocimientos que contribuyeron en mi formación profesional.

A la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA-Ayacucho, de manera particular al Proyecto 061_Pi: Aplicación de la biotecnología de inseminación artificial con semen fresco y congelado colectados por vagina artificial en alpacas) por el financiamiento de la tesis y por permitir la utilización de sus equipos, reactivos y establecimiento en general, los cuales fueron importantes para la ejecución y culminación de mi tesis.

A la Ing. Mary Luz Naveros Flores, Jefa del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del INIA-Ayacucho por haberme brindado todas las facilidades que permitieron la ejecución del trabajo de tesis.

Al M. V. Mijaíl Contreras Huamaní, investigador del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva del INIA-Ayacucho por sus enseñanzas, su constante seguimiento, paciencia y apoyo en la culminación del presente informe.

A la Blga. Crisstel Yverlyn Guillén Palomino, por su enseñanza, su amistad, gentileza y sus constantes palabras de aliento.

Al Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, asesor de la presente tesis, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia profesional en un marco de confianza y amistad; que ha permitido la elaboración, ejecución y culminación del presente informe.

Al Blgo. Reynán Cóndor Alarcón, por su inmensa paciencia, apoyo, amabilidad y colaboración en la parte estadística.

A mis hermanos Gabriel, Jorge, Marlene y Yimi, tíos (as), primos (as) que supieron apoyarme en todo momento, por su cariño y comprensión.

A mis amigas Harumi y Katherine, que han sido un gran apoyo, doy gracias por su amistad y colaboración; por todos los buenos y malos momentos que a lo largo de este proceso vivimos juntas.

A todas aquellas personas que en algún momento formaron parte de mi vida, compartiendo momentos buenos y malos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXO	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	17
II. MARCO TEÓRICO	19
2.1. Antecedentes	19
2.2. Marco conceptual	23
2.2.1. Espermatozoide	23
2.2.2. Acrosoma	23
2.2.3. Dilutor	23
2.2.4. Criopreservación	23
2.2.5. Integridad acrosomal	24
2.3. Bases teóricas	24
2.3.1. Importancia social y económica de la alpaca	24
2.3.2. Fisiología reproductiva del macho	24
2.3.3. Características	25
2.3.4. Color	25
2.3.5. Volumen	25
2.3.6. Concentración	25
2.3.7. Motilidad	26
2.3.8. pH	26
2.3.9. El espermatozoide	26
2.3.10. Acrosoma	27
2.3.11. Reacción acrosomal (RA)	28
2.3.12. Integridad acrosomal	29
2.3.13. Factores que afectan a la integridad acrosomal	31
2.3.14. Tinción de Hoechst 33342/Ioduro de propidio	32
2.3.15. Criopreservación de semen	32
2.3.16. Dilutores	33
2.3.17. Crioprotectores	33
2.3.18. Agentes crioprotectores y efectos en la integridad acrosomal	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37

3.1.	Área de estudio	37
3.1.1.	Ubicación geográfica	37
3.2.	Población y muestra	38
3.2.1.	Población	38
3.2.2.	Muestra	38
3.3.	Metodología y recolección de datos	38
3.3.1.	Preparación de dilutores comerciales	38
3.3.2.	Colección de semen	38
3.3.3.	Procesamiento de semen de alpaca	39
3.3.4.	Evaluación macroscópica	39
3.3.5.	Evaluación microscópica	40
3.3.6.	Evaluación de la integridad acrosomal mediante la triple tinción con azul de Tripán, rosa de Bengala y marrón de Bismark	42
3.3.7.	Dilución	43
3.3.8.	Refrigerado	43
3.3.9.	Equilibrado y empajillado	44
3.3.10.	Congelación y almacenamiento	44
3.3.11.	Descongelación	44
3.3.12.	Análisis estadístico	44
IV.	RESULTADOS	47
V.	DISCUSIÓN	59
VI.	CONCLUSIONES	65
VII.	RECOMENDACIONES	67
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	ANEXOS	75

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Características macroscópicas del semen de alpaca colectado con vagina artificial acoplada a un maniquí. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA- Ayacucho. 2019	49
Tabla 2. Características microscópicas del semen de alpaca colectado con vagina artificial acoplada a un maniquí. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA- Ayacucho. 2019	50
Tabla 3. Integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca según etapa de conservación con el dilutor Andromed®. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA- Ayacucho. 2019	51
Tabla 4. Integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca según etapa de conservación con el dilutor Biladyl B. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA- Ayacucho. 2019	52
Tabla 5. Efecto del dilutor Andromed® sobre el porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y descongelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2019	53
Tabla 6. Efecto del dilutor Biladyl B sobre el porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y descongelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2019	54
Tabla 7. Porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca Huacaya y Suri con el dilutor Andromed® en semen refrigerado y descongelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2019	55
Tabla 8. Porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca Huacaya y Suri con el dilutor Biladyl B en semen refrigerado y descongelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2019	56

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología del espermatozoide.	27
Figura 2. Partes del acrosoma del espermatozoide de mamífero.	28
Figura 3. Esquema de la reacción acrosomal en espermatozoide humano.	29
Figura 4. Localización geográfica del Centro del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva.	37
Figura 5. Colección de semen de alpaca con vagina artificial acoplada a un maniquí.	39
Figura 6. Muestras de semen de alpaca colectadas en tubos Falcon.	40
Figura 7. Uso de una regla para la medición de la filancia.	40
Figura 8. Láminas coloreadas con tinción eosina- nigrosina (lado izquierdo) y espermatozoides después de la coloración con tinción eosina-nigrosina (lado derecho).	41
Figura 9. Evaluación de integridad de membrana con tinción de Hoechst 33342/PI en sistema CASA.	42
Figura 10. Espermatozoides de alpaca luego de la triple tinción con azul de Tripán, rosa de bengala y Marrón de Bismark:	57

ÍNDICE DE ANEXO

	Pág.
Anexo 1. Composición del medio Biggers, Whitten y Whittingham (BWW) (Biggers, Whitten y Whittingham, 1971).	75
Anexo 2. Composición del dilutor Andromed® utilizado en la criopreservación. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.	75
Anexo 3. Composición del dilutor Andromed® utilizado en la criopreservación. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.	76
Anexo 4. Colorante azul de tripán utilizado en la triple tinción para la evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.	76
Anexo 5. Colorante marrón de Bismarck utilizado en la triple tinción para la evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.	76
Anexo 6. Colorante rosa de Bengala utilizado en la triple tinción para la evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.	77
Anexo 7. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca en semen fresco, refrigerado y congelado para el dilutor Andromed®.Ayacucho- 2020.	77
Anexo 8. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca en semen fresco, refrigerado y congelado para el dilutor Biladyl B. Ayacucho- 2020	77
Anexo 9. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca Huacaya y Suri en semen descongelado para el dilutor Andromed®. Ayacucho- 2020	78
Anexo 10. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca Huacaya y Suri en semen descongelado para el dilutor Biladyl B Ayacucho- 2020	78

Anexo 11.	Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca Huacaya y Suri en semen refrigerado para el dilutor Andromed®. Ayacucho- 2020.	78
Anexo 12.	Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca Huacaya y suri en semen refrigerado para el dilutor Biladyl B Ayacucho- 2020.	79
Anexo 13.	Flujograma de preparación del dilutor Andromed®. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2020	79
Anexo 14.	Flujograma de preparación del dilutor Biladyl B. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2020	80
Anexo 15.	Flujograma de colección de semen con vagina artificial acoplada a un maniquí. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2020	81
Anexo 16.	Flujograma de evaluación de la integridad acrosomal mediante la triple tinción con azul de Tripán, rosa de bengala y marrón de Bismark Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA – Ayacucho. 2020	82
Anexo 17.	Matriz de consistencia	83

RESUMEN

Los dilutores son fundamentales en la conservación de células espermáticas proporcionando los nutrientes adecuados y protegiendo del descenso de temperatura durante las etapas de procesamiento de semen. Sin embargo, existe poca información disponible sobre el uso de dilutores en semen de los Camélidos Sudamericanos y en la mayoría de ellos se ha tratado de adaptar dilutores de otras especies; es por ello que esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos dilutores en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado. El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA-Ayacucho. Se colectaron muestras de seis alpacas de los cuales se obtuvieron 33 eyaculados; las muestras en fresco fueron evaluadas macroscópicamente (volumen, filancia, espuma y color) y microscópicamente (motilidad, vitalidad e integridad de membrana) para posteriormente dividir las en dos fracciones, una con el dilutor Andromed® y otra con el dilutor Biladyl B, que luego se llevó a refrigeración a 5°C por 2 h, después se llevó a congelación en nitrógeno líquido. Se evaluó la integridad acrosomal tanto en semen fresco, refrigerado y descongelado mediante triple tinción con azul de Tripán, rosa de Bengala y marrón de Bismark. Las características seminales obtenidas en promedio fueron: volumen 1,84 ml; filancia 2,52 cm; espuma 1,52 cm y el color que predominó fue blanco lechoso. Concentración $194,09 \times 10^6$ espermatozoides/ml; motilidad 79,12%; integridad de membrana 67,94% y vitalidad 76,99%. Los resultados obtenidos para la integridad acrosomal en semen fresco fue 66,40 %; para semen refrigerado y descongelado con dilutor Andromed® se obtuvo 60,58 %; 36,96%. Para el dilutor Biladyl B fueron 58,20%; 37,02%, habiendo diferencias significativas ($P < 0,05$) entre etapas de conservación de semen mas no entre dilutores. Para el efecto del dilutor Andromed® sobre la integridad del acrosoma de espermatozoides de alpacas huacaya y suri en semen refrigerado fue de: 58,28% y 64,11%, respectivamente; en semen congelado fue de: 33,50% y 42,30%; respectivamente; por otro lado, el efecto del dilutor Biladyl B sobre la integridad acrosomal en alpacas huacaya y suri en semen refrigerado fue del 55,51% y 62,34%, respectivamente; en semen congelado el efecto fue del 33,86% y 41,87%, respectivamente; no existiendo diferencias significativas ($P > 0,05$). La calidad seminal de una alpaca permanece en forma proporcional desde la colección y durante el procesamiento de semen, es una característica propia del individuo según su genotipo. Existe efecto sobre la integridad acrosomal en las etapas de conservación de semen por lo tanto probablemente hay una desestabilización de la membrana y un desbalance de calcio como consecuencia de ello acelera la reacción acrosomal así afectando a la capacidad fecundante de los espermatozoides.

Palabras clave: Acrosoma, dilutor, integridad acrosomal, espermatozoide, reacción acrosomal.

I. INTRODUCCIÓN

En Perú, la crianza de los Camélidos Sudamericanos (CSA) es una de las principales actividades que tiene un nivel alto en el crecimiento de la sociedad y la economía de la población altoandina, debido a su adaptabilidad a condiciones adversas del ambiente, por su beneficio en la alimentación como fuente de proteína y también es considerado como un buen recurso en la producción de fibra (Huanca et al., 2007).

En CSA su período de gestación es de 350 días es por ello que es indispensable y fundamental la aplicación de biotecnologías reproductivas y así acelerar el avance genético. Como resultado, ha sido fundamental estudiar las características de los espermatozoides de alpaca así como su manejo para poner en práctica las nuevas tecnologías de reproducción asistida para acortar los tiempos generacionales; e inseminación artificial, que está siendo estudiada con gran detalle (Giuliano & Santa Cruz., 2011).

Herrera como se citó en (Raymundo et al., 2006) la conservación de las células espermáticas está basado en la aplicación de nutrientes adecuados, que salvaguarden la integridad de los espermatozoides durante la criopreservación y descongelación de los mismos.

Hasta al momento existe escasa información favorable acerca de los dilutores en la conservación de semen de CSA. En los últimos 20 años; los dilutores, las técnicas de refrigeración y congelación han sido adaptadas de otras especies como son los ovinos y vacunos (Adams et al., 2009).

Para tener éxito en la conservación de semen de Camélidos Sudamericanos es necesario investigar acerca del comportamiento de los dilutores (Aller et al., 2003; Bravo et al., 2000; Vaughan et al., 2003).

Para garantizar la calidad de los espermatozoides con fines reproductivos, deben ser evaluados varios parámetros espermáticos y presentar un porcentaje de gran éxito, pero entre ellos resaltan más la viabilidad e integridad acrosómica por su gran importancia de acuerdo a las últimas investigaciones (Morton et al., 2007).

El acrosoma, está ubicado en la parte superior de la cabeza del espermatozoide y cumple una función muy importante durante la fecundación (Januskauskas A., Johannisson A., 2000). Los espermatozoides que presentan una alta proporción de daño acrosomal generalmente presentan una tasa de fertilidad baja (Peña, A.; Linde, 2000), Januskauskas et al., (2000) señalan que durante la fecundación una fase indispensable es la reacción de la membrana acrosomal, ya que gracias a ello se logrará una óptima unión entre el espermatozoide y el ovocito, en el cual se dará la recombinación genética así formándose un embrión.

Los objetivos del presente trabajo fueron.

1.1. Objetivo general:

Evaluar el efecto de dos dilutores en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado.

1.2. Objetivos específicos:

- Determinar la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca en semen fresco.
- Determinar el efecto del dilutor Andromed® sobre la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca, en semen refrigerado y congelado.
- Determinar el efecto del dilutor Biladyl B sobre la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca, en semen refrigerado y congelado.
- Comparar el efecto de los dilutores en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpacas Huacaya y Suri.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Hasta el momento existe poca información acerca de investigaciones del efecto del dilutor en la integridad acrosomal de los espermatozoides de alpaca; sin embargo, hay evidencias donde se ha incluido como parámetro de evaluación en las distintas investigaciones realizadas.

Cueva (2018), evaluó la integridad acrosomal utilizando los colorantes de azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa; en la integridad de membrana, se utilizó el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI; y el porcentaje promedio de integridad acrosómica fue del 79,33%; 65,60%; y 38,54% para semen fresco, refrigerado y congelado, relativamente, habiendo diferencia significativa entre métodos. El porcentaje de motilidad de los espermatozoides fue del 71,13%; 63,67% y 22,60% para las muestras en semen frescos, refrigerados y congelados, sin diferencias significativas entre los métodos que utilizan muestras de semen frescos y congelados.

Apaza (2017), investigó el efecto protector de la yema de huevo (YH) sobre la viabilidad espermática de semen congelado de carnero, haciendo uso del dilutor a base de Tris, YH (15%) y glicerol (5%), congeló en nitrógeno líquido (NL_2) durante 10 min. Los resultados fueron de la siguiente manera. Primero, en semen refrigerado el Test Hipo-osmótico fue del 78,38%, 79,00%, 78,10% y 69,88% para el dilutor YH de gallina criolla (T1), YH de gallina de granja (T2), YH de codorniz (T3) y YH de paloma (T4), respectivamente. En semen descongelado el Test Hipo-osmótico fue 55,86%, 60,50%, 59,44% y en integridad de acrosoma se obtuvo 61,59%, 65,27%, 64,64% y 62,53% para T1, T2, T3 y T4, relativamente ($P>0.05$).

Maxi (2019), investigó la calidad del semen de alpaca criopreservado e incubado por 1h 30 min y 3 h; en yemas de huevo de gallina (YHG), codorniz (YHC) y pata

(YHP), la muestra fue colectado mediante post cópula del macho y fue dividido en 3 grupos, utilizando un dilutor A que contenía (Tris, ácido cítrico, fructosa, tilosina, gentamicina y lincomicina); dilutor B que contenía todos los componentes del dilutor A, excepto de glicerol 5%. A ambos dilutores adicionó el 20% del dilutor YHG, YHC y YHP; en refrigeración utilizó el dilutor A, antes de la congelación añadió alícuotas del dilutor B y se congeló. La descongelación fue a 37°C por 60 s, después las muestras fueron incubadas en baño María a 37°C por 1h 30 min y 3 h. En los parámetros microscópicos no se encontró diferencias significativas entre el dilutor YHC y dilutor YHG, los mismos con diferencia significativa comparados con YHP en motilidad total e integridad acrosómica.

En otra investigación, Delgado (2019) evaluó la integridad acrosómica de espermatozoides de alpaca para lo cual dividió en 3 grupos; muestras frescas sin fijar 0 horas (T1) y muestras fijadas en formaldehído 24 h (T2) y 1 semana (T3). Las muestras se incubaron durante 10 min a 38°C en oscuridad con 2,5 µl de FITC-PSA. Las muestras de T2 y T3 se fijaron con formaldehído al 4% durante 30 min y luego se almacenaron a 4°C protegidas de la luz, después se realizó lavado con PBS mediante la centrifugación a 600 g por 8 min, se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 µl de PBS a 37°C para su lectura en Citómetro de flujo. Los resultados de integridad acrosomal a 0 h fue del $95,89 \pm 4,35$, 24 horas fue del $97,24 \pm 3,36$ y 1 semana fue del $97,21 \pm 3,49$.

En espermatozoides de alpaca provenientes de epidídimo determinaron la integridad acrosómica, en el cual se utilizó *Arachis hypogaea* (PNA) y *Pisum sativum* (PSA), conjugadas con isoticianato de fluoresceína (FITC). Los espermatozoides se suspendieron en 1 ml de solución Tris base después de lavó mediante centrifugación y los sedimentos se volvieron a mezclar en 300 µl de PBS. Cada muestra se dividió en 2 alícuotas e incubó por 8 min a 38°C con FITC-PNA o FITC-PSA, acompañada de un marcador de vitalidad (yoduro de propidio) para ser evaluado con citómetro de flujo. Se obtuvo $59,17 \pm 4,84$ y $61,13 \pm 4,35\%$ de espermatozoides vivos con integridad acrosómica para FITC-PNA y FITC-PSA, relativamente (Ugarelli et al., 2017).

En otro estudio se evaluó el efecto de la adición del plasma seminal antes y después de la congelación de espermatozoides. Utilizó el dilutor Tris más 20% de yema de huevo diluyendo así el semen, el plasma seminal se añadió en relación al dilutor: (T10) 10%, (T50) 50% y (T100) 100% y (T0) sin plasma seminal. En los parámetros evaluados después de la colecta no se observó

ningún cambio. Sin embargo, se observó que T50 y T100 son mejores con respecto resto en la integridad de membrana y del acrosoma, llegando a la conclusión de que T100 y T50 son mejores en la preservación de membrana y acrosoma en comparación a los tratamientos T10 y T0. En la descongelación no se observó ningún cambio en motilidad individual y vitalidad. Sin embargo, se observó un mejor resultado en T100; mientras que, para integridad acrosómica en T100 y T50 fue superior a T10 y T0 (Torres, 2018).

Por otro lado, Choez (2016) investigó en alpacas la concentración óptima de glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido en la criopreservación de espermatozoides provenientes de epidídimo agrupando en: T1 (0 M), T2 (0,25 M), T3 (0,5 M), T4 (0,75M), T5 (1 M), T6 (1,25 M), T7 (1,5 M) y T8 (1,75 M) para los 3 crioprotectores. La concentración óptima de glicerol, etilenglicol y dimetil sulfóxido fue 1,16, 1,02 y 0,9 M respectivamente. Después se quiso probar el efecto de los crioprotectores en los parámetros de motilidad, integridad de membrana plasmática y viabilidad e integridad del acrosoma, para lo cual se conformó los 3 crioprotectores cada uno en sus concentraciones óptimas. Se observó mejores resultados en DMSO al 0,9 M para motilidad, integridad de membrana plasmática y viabilidad e integridad acrosómica correspondientemente. Por otra parte, al comparar los resultados del glicerol al 1,16 M no hubo diferencias significativas. Al comparar los resultados de DMSO y glicerol con los resultados de etilenglicol al 1,02 M se consiguió diferencias significativas.

Calderon (2015), evaluó “efecto de la adición del plasma seminal de *Bos Taurus* en la viabilidad de espermatozoides criopreservados colectados de los conductos deferentes de “*Vicugna pacos*””. (p. 1), para lo cual dividió en tres grupos; T1: Tris yema (testigo), T2: Tris yema + plasma seminal de bovino, T3: Plasma seminal de bovino; se evaluó la motilidad individual de los espermatozoides colectados resultando con 43,98%(T1); 37,80%(T2) que fueron superiores al (T3) que presentó una motilidad de 31,42%. Por otro lado, también fue superior en comparación a las muestras refrigeradas a 5°C resultando 33,24%(T1) y 34,20%(T2) a la descongelación 14,46%(T1) y 15,66%(T2). La vitalidad de los espermatozoides en muestras frescas fue 34,3%(T1); 37,15%(T2) y 28,15%(T3) a la refrigeración fue 26,45%(T1) resultando ser inferior en comparación con (T2) 33,90%; en descongelado fue 12,67%(T1) y

14,74%(T2). La integridad de membrana de los espermatozoides en muestras frescas fue 46,63%(T1); 46,03%(T2) y 41,43%(T3); a la refrigeración fue 33,51%(T1) fueron inferior en comparación al 40,10%(T2); en descongelado fue 21,54%(T1), 27,24%(T2). La integridad de acrosoma de los espermatozoides en muestras frescas fue 44,78%(T1); 40,47%(T2) y 38,20%(T3) a la refrigeración fue 41,26%(T1), 40,47%(T2); al momento de la descongelación fue 25,12%(T1) y 28,83%(T2).

En bovinos, se investigó la eficacia de las concentraciones de clorhidrato de cisteína en la motilidad progresiva posterior a la descongelación, vitalidad, integridad acrosomal y anomalías de los espermatozoides después de la congelación y descongelación en el semen de toros Jersey. Las muestras se dividieron en 4 fracciones y se diluyeron con tris, glicerol, yema de huevo con adición de cisteína a 10; 12 o 15 mM (CYS-10, CYS-12 y CYS-15, respectivamente) y sin cisteína (EYTG-C) que actuó como control. Las muestras fueron equilibradas a 4°C durante 4h, se congeló en un biocongelador programable. Se descongeló a 37°C durante 37s, las características del semen como la motilidad progresiva, el porcentaje de espermatozoides vivos y la integridad de acrosoma fueron significativamente mayores, mientras que las anomalías de los espermatozoides fueron significativamente menores en muestras que contenían cisteína de 10 mM sobre el control y otros diluyentes. Los resultados revelaron que la adición de cisteína a 10 mM como aditivo al semen en el diluyente de yema de huevo Tris, mejora significativamente las características del semen después de la descongelación, mientras que el efecto adverso de la cisteína fue evidente en sus concentraciones más altas 12 mM y 15 mM (Bhardwaz et al., 2016).

Otro estudio en bovinos, se investigó el daño de la membrana espermática e integridad acrosomal, para lo cual se empleó 4 toros. Llegándose a evaluar la integridad acrosómica, integridad de membrana, motilidad, vitalidad, volumen y concentración durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación. El volumen en muestra fresca de semen fue 4,33 ml, concentración espermática de $922,5 \times 10^6/\text{ml}$, y 78,5% de vitalidad. La motilidad fue de 82,7 a 86,0% con diferencia significativa entre toros. La integridad de acrosoma en semen refrigerado varió entre 59,3 a 69,2% con diferencia estadística entre toros. El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto disminuyó de 65,2% en semen refrigerado a 48,6% en semen

congelado/descongelado, sin diferencias estadísticas entre toros (Cabrera & Pantoja, 2012).

En espermatozoides de carneros de tres razas (Criollo, Corriedale y Texel) se investigó la integridad de membrana espermática y acrosoma. En muestras refrigeradas y descongelados; previamente estuvieron expuestos a dilutor tris (T1), agua de coco (T2) y leche UHT (T3), para evaluar integridad de membrana espermática se utilizó la prueba de endosmosis. Por otro lado, la triple tinción se utilizó en la evaluación de integridad acrosómica. Para el efecto de los 3 dilutores T1, T2 y T3 sobre la integridad de membrana en la refrigeración y descongelación fue del 67,33%, 49,93%, 46,93% y 34,47%, 24,73%, 20,93% respectivamente y para el efecto sobre el acrosoma en semen refrigerado y descongelado fue del 50,60%; 44,27%; 48,93% y 24,33%; 24,00%; 28,20% correspondientemente (Vargas, 2015).

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Espermatozoide

Células haploides que se produjo durante la espermatogénesis a partir de las espermatogonias, presenta cabeza, cuello y flagelo; funcionalmente es portador de material genético (Tejerina, 2008, citado por cueva, 2018).

2.2.2. Acrosoma

Originado a partir de complejo Golgi durante la fase de espermátide, es una estructura que posee membranas, ocupa la región anterior de la cabeza del espermatozoide, recubriendo al núcleo (Garde, 2002).

2.2.3. Dilutor

Solución acuosa usada para el incremento del volumen del eyaculado con el fin de preservar todas las características funcionales de los espermatozoides, también para conseguir las dosis necesarias para las inseminaciones (Gadea, 2003).

2.2.4. Criopreservación

Etapa clave en el procesamiento seminal, permite conservar semen, ovocitos y embriones a bajas temperaturas, generalmente a menos -196°C donde disminuye sus funciones vitales y pueda ser mantenido por un tiempo indefinido. No obstante, durante este proceso se produce una disminución de la calidad seminal con respecto a la del semen fresco o refrigerado (Hummersted et al., 1990).

2.2.5. Integridad acrosomal

Es un parámetro cuya importancia radica en la evaluación de la reacción acrosómica que es una condición primordial para lograr la fertilización en la fecundación de los ovocitos (Ramalho-Santos et al., 2002; Carretero et al., 2015).

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Importancia social y económica de la alpaca

De acuerdo al IV Censo Nacional Agropecuario (CENAGRO) realizado por (INEI, 2012) “la población de alpacas alcanzó un total de 3 685 516 ejemplares. Las principales regiones que concentran la producción de alpaca son: Puno (39,6%), Cusco (14,7%), Arequipa (12,7%), Huancavelica (8,3 %), Apurímac (5,9%), Ayacucho (2,8%) y Pasco (1,8%)” (p18 y 47). Con una productividad total anual de 4 313 toneladas métricas de fibra.

En la zona alto andina, la crianza de los camélidos es una de las actividades productivas más importantes.

La fibra de alpaca es muy cotizada tanto en los mercados nacionales e internacionales. El uso abarca al tiempo de los antiguos peruanos, ya que se apoyaron de este material el día a día; debido a las propiedades textiles de la fibra como son: la resiliencia, la retención del calor, el brillo, entre otros. Los usos que se le dio fueron: la elaboración de prendas y algunas decoraciones que fueron usados en las ceremonias. En la actualidad, la fibra de alpaca representa el sustento económico en varios lugares andinos del Perú. En los negocios del sector textil se ve muy atractivo, por la valoración de la lana en diversos lugares del mundo, sobre todo por las características que presenta como es: la finura, el color y el peso (Valcarcel, 2011).

2.3.2. Fisiología reproductiva del macho

La fisiología reproductiva de las alpacas es muy distinta a la de los otros animales domésticos y poco entendida, razón por lo cual se está investigando para el establecimiento de nuevas técnicas de manejo. Las alpacas se caracterizan por tener estacionalidad reproductiva, es así como el apareamiento y el parto se llevan a cabo entre los meses de diciembre a marzo, coincidiendo así con temporada de lluvia y presencia de forraje (Smith et al., 1994).

La muestra seminal de CSA tiene características limitantes en la concentración, morfología, la filancia y plasma seminal con alta viscosidad, que son propias de la especie (Banda et al., 2010; Casaretto et al., 2012).

Todas estas limitaciones generan dificultad en la implementación de nuevas tecnologías con semen congelado.

2.3.3. Características

Las características del semen de alpaca son muy variables, actualmente se ha demostrado que existen variaciones entre y dentro de individuos, (Morton et al., 2008) probablemente sea debido a la influencia de factores medioambientales y de la especie misma (Tibary & Vaughan, 2006).

La presencia de viscosidad y baja concentración en el semen de CSA, impide el estudio en la criopreservación y aplicación de nuevas técnicas de reproducción asistida (Kershaw-Young & Maxwell, 2011).

2.3.4. Color

Los eyaculados varían de color desde blanco lechoso a blanco cristalino, de acuerdo a la concentración de los espermatozoides y la presencia de alguna contaminación causada por otros fluidos, de la misma manera éste puede ser cambiado por presencia o ausencia de algunas sustancias (Sumar & Leyva, 1981). Cuando hay alta concentración de espermatozoides se vería de un color crema (Paricahua, 2001).

2.3.5. Volumen

Los testículos de las alpacas promedian de 3 a 5 cm de tamaño con un peso de 15 a 18 gr equivalente a 0,02 a 0,03% de su peso corporal. Por otro lado, en toros y carneros son: 0,18 y 1,4% respectivamente (Vaughan et al., 2003). Es por ello que en los CSA la producción de espermatozoides es mucho menor en comparación con otros animales como es el toro y carnero (Kershaw-Young & Maxwell, 2011).

En general, alrededor de 85% de la muestra seminal es plasma y sólo el 15% son espermatozoides (Bravo et al., 1997).

2.3.6. Concentración

Vaughan et al., (2003) señala que por ml de muestra de semen de alpaca podemos encontrar entre 30 000 a 150 millones de espermatozoides. Sin embargo, esto puede variar entre los especímenes, la forma de colecta y número de eyaculados. La liberación de la hormona testosterona faculta la producción de

los espermatozoides, esta hormona varía en concentración de acuerdo a la edad, tamaño del testículo y factores ambientales (Hafez y Hafez, 2002).

2.3.7. Motilidad

Es el principal parámetro para determinar calidad espermática de acuerdo al grado de energía que presentan los espermatozoides, la motilidad se debe evaluar inmediatamente después de la colección, observando la intensidad del movimiento (Sumar & Leyva, 1981).

En alpacas como consecuencia de la alta viscosidad que presenta el plasma seminal, impide observar motilidad masal y como consecuencia de ello la motilidad individual es lenta en comparación a los espermatozoides de ovino y vacuno (Sumar, 2002).

Raymundo et al., (2006) encontraron una motilidad promedio en semen fresco de $54,0 \pm 8,0\%$. Mediante el método de vagina artificial.

2.3.8. pH

El pH en las muestras seminales de alpaca es muy cerca al neutro con tendencia a alcalinidad ligera, éste incrementa en muestras contaminadas con orina, generalmente cuando se realiza una colecta mediante la electroeyaculación (Sumar, 2002).

El semen de alpaca comprende un pH entre 7,1 a 8,3 y en llamas 7,2 a 8,6 (Hanzen et al., 2014).

2.3.9. El espermatozoide

Está compuesto de tres regiones: cabeza, cuello y flagelo. Funcionalmente es portador del material genético. Por ello, debemos señalar la importancia de un núcleo muy condensado, un plasmalema muy sensible a las variaciones térmicas y osmóticas Tejerina (2008) citado por Cueva (2018).

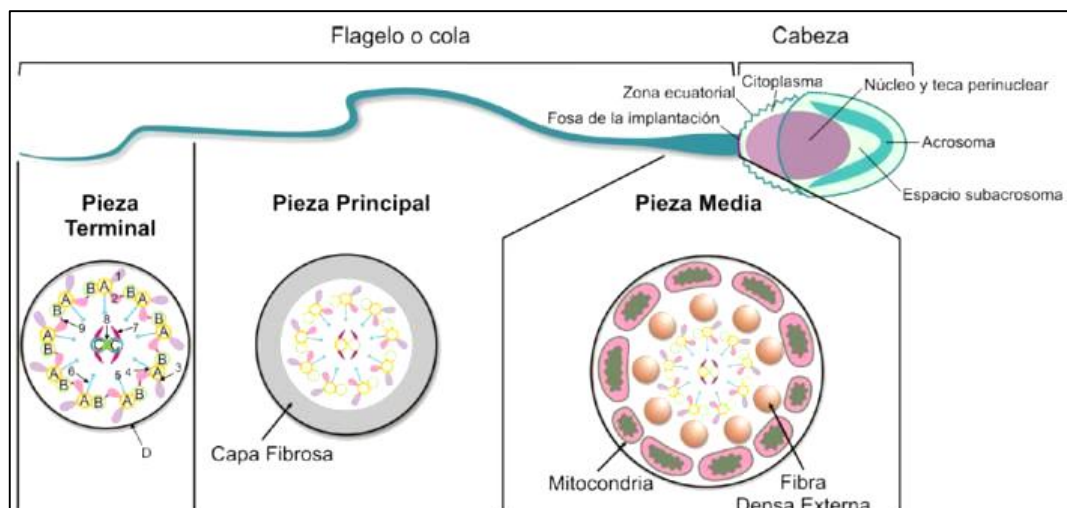


Figura 1. Morfología del espermatozoide. (Olivera Ángel et al., 2006)

2.3.10. Acrosoma

Según (Garde, 2002, pág.9), “el acrosoma es una estructura membranosa que ocupa la región anterior de la cabeza del espermatozoide, recubriendo al núcleo y que se origina a partir de complejo de Golgi durante la fase de espermatide”. Peña & Linde, (2000) citado por Cabrera et al., (2012) señala la existencia de tres segmentos muy singulares: la zona acrosomal con su borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas, los cuales están propensos a sufrir daños durante el proceso de criopreservación y descongelación. Por ello, una muestra de semen con elevado nivel de daño acrosomal presenta un descenso en la fertilidad.

(Castillo, 2012, pág.8), menciona que “el acrosoma está compuesto de una membrana externa, que limita con la cara interna de la membrana plasmática, y una membrana interna próxima a la cara externa de la membrana nuclear. Entre ambas se forma un saco que contiene diversas enzimas hidrolíticas como: acrosina, hialuronidasas, esterases e hidrolasas. El contenido acrosomal se libera al exterior en un proceso denominado reacción acrosómica que es necesario para la fecundación del oocito”.

(Fawcett, 1970, pág. 97) menciona que “El acrosoma posee dos segmentos, el capuchón acrosomal y segmento ecuatorial (Figura 2). Cuando ocurre la reacción acrosomal, la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática se fusionan y vesiculan, la mayoría de los contenidos acrosómicos se descargan. Persistiendo la membrana acrosomal interna y el segmento ecuatorial”.

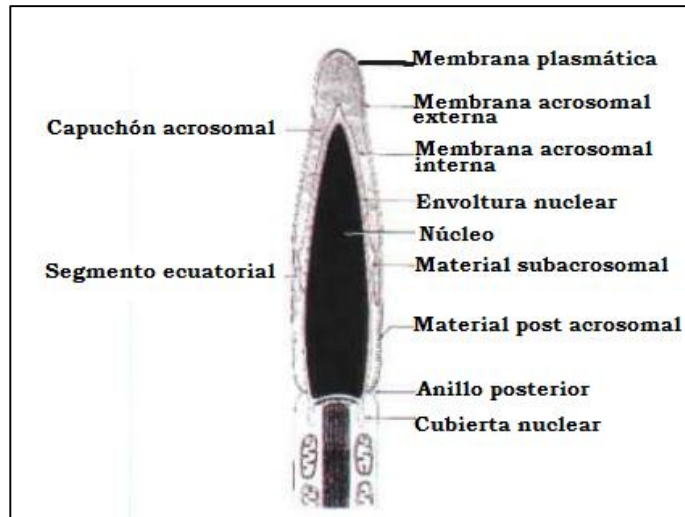


Figura 2. Partes del acrosoma del espermatozoide de mamífero. (Cardozo, 2002)

2.3.11. Reacción acrosomal (RA)

Es un evento exocítico, donde se da la fusión y fenestración de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa del segmento principal del acrosoma produciendo la liberación de las enzimas acumuladas en el acrosoma y la exhibición de la membrana acrosomal interna, dando lugar a la reacción del segmento ecuatorial (Vigil & Toro, 2008). La reacción acrosomal en el segmento ecuatorial también involucra la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosómica externa. Este proceso se puede producir durante el contacto del espermatozoide con la matriz extracelular del ovocito o con la zona pelúcida (Baldi et al., 2001) y desencadena una serie de eventos como: a) liberación de las enzimas acrosomales (Vigil & Toro, 2008); b) exposición de la membrana acrosomal interna como el nuevo dominio de membrana en la superficie celular (Jungnickel et al., 2001; Nolan, 1997; Vigil & Toro, 2008); c) adquisición en el caso de la reacción del segmento principal del acrosoma, de la capacidad fusogénica de la membrana plasmática sobre el segmento ecuatorial del espermatozoide, d) espermatozoide reaccionado. En el caso de la RA del segmento ecuatorial se ha demostrado que la membrana plasmática post ecuatorial adquiere la capacidad fusogénica (Jungnickel et al., 2001; Vigil, 1989). Solamente la membrana plasmática del espermatozoide que ha experimentado la RA es capaz de fusionarse con la membrana plasmática del ovocito.

Según Patrat et al., (2000, como se citó en Cardona & Cadavid, 2005) la importancia de la reacción acrosomal está en la liberación de enzimas hidrolíticas los cuales favorecen la penetración del espermatozoide hacia la zona

pelúcida del ovocito; este proceso se realiza después de que el espermatozoide entra en contacto con un grupo de moléculas que están en la zona pelúcida, consecuentemente permitiendo el reconocimiento entre los gametos.

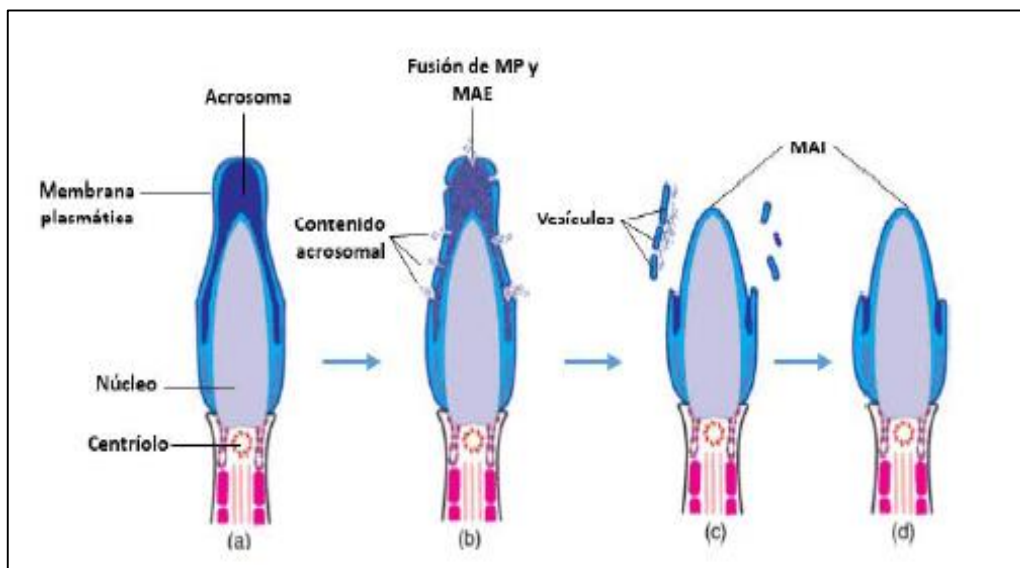


Figura 3. Esquema de la reacción acrosomal en espermatozoide humano. (La Spina et al., 2017)

2.3.12. Integridad acrosomal

La evaluación de este parámetro es muy importante por su función en la reacción acrosómica y al considerar que participa en la fecundación de los ovocitos. (Ramalho-Santos et al., 2002; Carretero et al., 2015) mencionan que la evaluación de la integridad acrosomal brinda mayor información sobre las funciones espermáticas que son adicionales a las evaluaciones de rutina, aportando así a un estudio más completo de los eyaculados.

La reactividad de la membrana acrosomal es una condición primordial para lograr la fertilización, en efecto sólo aquellos que realicen la reacción acrosomal en sincronización con la fase de penetración del ovocito, adquieren la capacidad de atravesar la zona pelúcida y en consecuencia fusionarse y formar un embrión.

Es fundamental también que el acrosoma esté intacto, como se dio a conocer en una investigación en espermatozoides de ratones, que sólo los espermatozoides que poseen el acrosoma intacto podían fusionarse a la membrana pelúcida. Sin embargo, existe la probabilidad de que el acrosoma de algunos espermatozoides sufran una reacción involuntaria, existiendo varias experiencias donde demuestran que es muy necesario la presencia de moléculas específicas que estén

incorporados con el ovocito en la inducción de la reacción espontánea (Cabrera & Pantoja, 2012).

Para la evaluación de integridad acrosomal podemos encontrar diversos métodos que se menciona a continuación: microscopía de campo claro (MC), microscopía de fluorescencia (MF) y citometría de flujo (CF). En llamas Carretero et al., (2015) trabajaron utilizando la microscopía de campo claro; Santiani et al., (2005) han trabajado mediante el método de triple tinción para evaluar el daño en el acrosoma; y Banda et., (2010) trabajaron con el método de doble tinción para evaluar la integridad acrosómica y viabilidad del espermatozoide.

2.3.12.1. Técnica de tinción

Para evaluar la integridad del acrosoma puede usarse algunos colorantes que después son observadas mediante técnicas de microscopía. Uno de ellos es la técnica de doble tinción para espermatozoides de alpaca descrito por (Didion et al., 1989) y modificado por (Santiani et al., 2005) quienes usaron el colorante azul de Tripán y Giemsa. Donde consideraron como espermatozoides vivos a los que presentaron coloración transparente en la parte posterior a la línea ecuatorial de la cabeza y espermatozoides con el acrosoma intacto a los que fueron teñidos de color fucsia en la parte acrosomal.

Una técnica de microscopía óptica con capacidad de evaluar la integridad de membrana plasmática y membrana acrosomal, es la técnica de triple tinción con los colorantes de azul de Tripán, rojo neutro-ácido clorhídrico y Giemsa. Los espermatozoides sin daños en la membrana se colorean de celeste o azul claro en la región postacrosomal y si están dañados se tiñen de azul oscuro. Los espermatozoides que no tienen ningún daño se tiñen de púrpura en la región acrosomal y si están dañados se tiñen de color violáceo claro u oscuro (Carretero et al., 2015).

Susana, (1998) haciendo el uso de la triple tinción (azul Tripán, marrón Bismark y rosa de Bengala) y microscopia de campo claro, llegó a determinar la presencia o ausencia del acrosoma. Con esta técnica se puede clasificar los espermatozoides en cuatro categorías (vivos con acrosoma intacto; vivos reaccionados; muertos con acrosoma intacto y muertos reaccionados). Con el paso del tiempo y habiendo la necesidad de adaptar la triple tinción para las diferentes especies se realizó distintas variaciones en su composición.

2.3.12.2. Técnica de fluorescencia

La integridad del acrosoma se evalúa usualmente con lectinas conjugadas con fluorescentes. Estos conjugados de lectina se ensamblan a carbohidratos específicos de glicoproteínas que se encuentran únicamente en el acrosoma. Generalmente se usan los siguientes conjugados: *Pisum sativum* (PSA), *Arachis hypogaea* (PNA) en caso de humano se usa la lectina concanavalina A (Holden et al., 1990).

El *Arachis hypogaea* fue específico para la membrana acrosomal externa en espermatozoides de porcino, equino y canino; específicamente en los terminales β -galactosa, (Flesch et al., 1998; Hernández et al., 2012; Silva & Gadella, 2006; Szász et al., 2000) por otro lado, el PSA marcaba las glicoproteínas de la matriz acrosomal (Celeghini et al., 2010; Flesch et al., 1998; Silva & Gadella, 2006).

2.3.13. Factores que afectan a la integridad acrosomal

2.3.13.1. Efecto de refrigeración sobre el acrosoma

En la etapa de refrigeración los espermatozoides están expuestos a daños en la membrana plasmática como también en el acrosoma. El acrosoma tiende a dañarse durante la refrigeración y cuando se incrementa las temperaturas, como consecuencia perdiendo su capacidad de fecundar. Los espermatozoides que fueron expuestos a algún proceso de preservación en el tiempo, penetran los ovocitos en menos tiempo (Peña, A; Linde, 2000). La permeabilidad del calcio a 5°C incrementa rápidamente así disminuyendo la capacidad de eliminación de los iones; como consecuencia alcanzando niveles tóxicos en el espermatozoide por acumulación de calcio. Como consecuencia generando alteraciones y pérdida mayor de capacidad fecundante (Vargas, 2015).

2.3.13.2. Efecto de criopreservación sobre el acrosoma

En la criopreservación, la membrana plasmática y acrosomal son los más sensibles a diferencia del núcleo y la porción intermedia; en lo que respecta al acrosoma, hay una diferencia de sensibilidad entre membranas (Salamon & Maxwell, 1995).

Después de la dilución, refrigeración y equilibrio inician a mostrarse algunas lesiones, pero se evidencia más después de la descongelación. Por otro lado, mediante la reacción acrosómica anticipada se manifiesta los daños en el acrosoma incluyendo la región ecuatorial. Los espermatozoides que realizan la reacción acrosómica falsa es porque existe pérdida del acrosoma como

consecuencia de la desintegración de la membrana acrosomal y plasmática durante la muerte celular perdiendo la capacidad fecundante (Way et al., 1995). Cuando hay daño y una desestabilización en el acrosoma ocurre la liberación del contenido enzimático (Saacke & White, 1972).

2.3.14. Tinción de Hoechst 33342/Ioduro de propidio

La doble tinción fluorescente Hoechst 33342/PI o SYBR14/PI son usados para evaluar integridad de membrana plasmática. Hoechst 33342 ingresa por la membrana plasmática y se fija específicamente al ADN, donde los espermatozoides son coloreados de azul por otro lado el Ioduro de Propidio (PI) sólo ingresa a las membranas deterioradas sobre poniéndose al colorante Hoechst tiñendo color rojo/violeta en la cabeza lo cual indica el daño en la membrana plasmática, este color está dada por PI. El sistema AndroVision® determina el porcentaje de espermatozoides con membranas dañadas y sanas (Suhevic et al., 2015).

Para identificar los daños en los espermatozoides se utiliza bastante el Ioduro de propidio. Cuando la membrana espermática de los espermatozoides está dañada, el Ioduro de propidio ingresa uniéndose al núcleo y al ser excitado por la longitud de onda (510-560 nm), emite una fluorescencia roja. Hay otros marcadores fluorescentes específicos para células muertas con un mecanismo de acción similar como el Hoechst 33258 (Muiño, 2007).

2.3.15. Criopreservación de semen

La conservación de estructuras espermáticas y de su capacidad fecundante del espermatozoide exige reducción o interrupción reversible del metabolismo celular, esto se logra mediante el uso de dilutores. Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides son expuestos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir en la célula espermática daños que pueden comprometer su funcionalidad (Choez, 2010).

La refrigeración y el congelamiento profundo utilizaron en la preservación de espermatozoides de alpaca y llama. A pesar de las técnicas que se han utilizado para reducir todo ello, los porcentajes de preñez aún son reducidos en comparación con otros animales (Giuliano, 2012).

Mediante la criopreservación se puede extender la viabilidad de los gametos masculinos indefinidamente, debido a que la temperatura ambiental o de refrigeración degeneran con facilidad la membrana acrosomal, esto se da

principalmente por la reducción de las reservas energéticas (Hammerstedt & Graham, 1992).

2.3.16. Dilutores

(Gadea, 2003, pág.18) indica que “el diluyente es una solución acuosa utilizada para incrementar el volumen del eyaculado hasta lograr las dosis necesarias para las inseminaciones y también preservar todas las características funcionales de los espermatozoides y mantener el nivel de fertilidad adecuado”.

Un buen dilutor debe tener compuestos o sustancias muy similares al plasma seminal, debido a que el dilutor tiene la misión de proteger a los espermatozoides durante un determinado tiempo, (Vishwanath & Shannon, 2000, pág. 36) mencionan que “los diluyentes deben contener ciertos compuestos básicos como son: una fuente de energía; un buffer para mantener el balance de pH; osmolaridad de la solución, una fuente de lipoproteínas y un crioprotector para prevenir el choque térmico; así como también aditivos”.

2.3.17. Crioprotectores

La criopreservación adecuada debe favorecer a la preservación de las distintas estructuras del espermatozoide sin realizar ningún cambio en ello. Por tanto, la presencia de un crioprotector es muy importante para contrarrestar los daños producidos en los espermatozoides durante la preservación (Gao et al., 1995), es por ello que presentan efectos notorios en la congelación y la descongelación de los espermatozoides, debido a que protegen a los espermatozoides de los daños producidos en las estructuras celulares y extracelulares como también en la composición química.(Fahy et al., 1990)

Los crioprotectores fueron clasificados de acuerdo a la capacidad para atravesar la membrana plasmática:

2.3.17.1. Crioprotectores permeables

Presentan bajo peso molecular, por esa particularidad que presentan ingresan a la célula con facilidad mediante la membrana plasmática. Sin embargo, cuando ingresan a la célula, impiden que ocurra algún efecto negativo ocasionada por la deshidratación excesiva que se generó durante la criopreservación. Asimismo, estos crioprotectores pasan la membrana plasmática reemplazando el volumen de agua que sale al medio extracelular. Uno de las misiones es la de mantener el volumen celular, impidiendo el colapso de los espermatozoides ocasionado por

una deshidratación excesiva (Medeiros et al., 2002). Entre los crioprotectores comunes podemos encontrar glicerol, etilenglicol, dimetilsulfóxido y propanediol (Boiso, 2001).

2.3.17.2. Crioprotectores no permeables

Son sustancias de alto peso molecular que realizan su acción crioprotectora por inducción osmótica debido a la rápida deshidratación celular, induciendo una disminución del contenido hídrico intracelular, lo cual impide la formación de cristales de hielo en la célula criopreservada (Medeiros et al., 2002). También incrementan la viscosidad del medio extracelular a bajas temperaturas, reduciendo considerablemente la aparición de cristales de hielo. Además, se ha encontrado que hay una interacción de los azúcares con la membrana plasmática formando puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo con el grupo fosfato de los fosfolípidos de la membrana. El agua al ser reemplazado alrededor de los fosfolípidos, evitan el daño a la membrana durante la deshidratación celular (De Leeuw et al., 1993). Estos crioprotectores generalmente son usados juntamente con agentes permeables.

2.3.18. Agentes crioprotectores y efectos en la integridad acrosomal

Los crioprotectores nos permite mantener la mayor parte de agua líquida a bajas temperaturas, así minimizando la concentración de electrolitos del medio celular interno y posibilitando la supervivencia de los espermatozoides; permitiendo salir el agua intracelular hacia al exterior congelándose durante el proceso de criopreservación, donde la célula se deshidrata evitando la formación de cristales de hielo en la parte interna. Sin embargo, los crioprotectores añadidos a los diluyentes ocasionan un estrés osmótico transitorio pero importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides y que está muy relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores. Este estrés osmótico afecta los fosfolípidos de la membrana plasmática incrementando la permeabilidad y fusionándola con el acrosoma. La hiperosmolaridad causada por el glicerol posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica el cual puede ser reducido mediante la incorporación del glicerol en el medio de congelación durante la criopreservación permitiendo incremento de la proporción de espermatozoides sobrevivientes en el descongelamiento (Ávila-Portillo et al., 2006; Stornelli et al., 2005).

(Ávila-Portillo et al.,2006, pág. 294) mencionan que “los crioprotectores son sustancias hidrosolubles y de baja toxicidad, que disminuyen el punto eutéctico de una solución dada, (punto en el cual una composición dada de A y B solidifica como un elemento puro) alcanzando una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más deshidratada y el gradiente osmótico al que estará sometido será menor”.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

La investigación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán - INIA, Ayacucho (EEA-Canaán). Ubicada en la Av. Abancay N° 299.

3.1.1. Ubicación geográfica

La Estación Experimental Agraria Canaán - INIA, Ayacucho (EEA-Canaán) se encuentra en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray, la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

Latitud Sur : 13°09'48" S.

Longitud Oeste : 74°12'20" W.

Altitud : 2736 msnm.



Figura 4. Localización geográfica del Centro del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva. (Google Earth)

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

Fue conformada por el total de espermatozoides presentes en las muestras seminales colectadas mediante el método de la vagina artificial incorporada a un maniquí a partir de seis alpacas macho de EEA Canaán, INIA-Ayacucho.

3.2.2. Muestra

Fue conformada por 33 muestras de eyaculado de buena calidad, para la evaluación de integridad acrosomal, colectados por vagina artificial incorporada a un maniquí a partir de seis alpacas de EEA Canaán, INIA-Ayacucho.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Preparación de dilutores comerciales

- **Dilutor Andromed®**

Se preparó en una proporción 4:1 según indicaciones del laboratorio; Previamente se colocó 4 ml de agua Milli Q y 1ml del diluyente Andromed® en tubos Falcon por separado, seguidamente se llevaron a atemperar a baño María a 37°C por 5 min. Se homogenizó añadiendo agua Milli Q al dilutor Andromed® y se almacenó hasta el momento de su uso.

- **Dilutor Biladyl B**

Se colocó 6 ml del dilutor Biladyl B en un tubo Falcon, se adicionó 4 ml de YH fresca. Seguidamente se homogenizó en el vórtex. Finalmente se filtró con un filtro de 0,22 mm y se almacenó hasta el momento de su uso.

Para la obtención de yema de huevo, se desinfectó el huevo con alcohol a 70°, seguidamente se partió la cáscara del huevo y se eliminó la clara realizando movimientos suaves sobre un papel toalla; después se hizo una incisión en la yema con la aguja puesta en una jeringa estéril, se succionó y vertió en un tubo Falcon estéril.

3.3.2. Colección de semen

Fue mediante el método de la vagina artificial, que constaba de un tubo de PVC de 15 a 20 cm (vagina), en el cual se colocó una funda de látex, se dobló en los extremos y ajustó con tiras de hule, el cono de recolección hecho a base de

bolsa de polietileno que estuvo incorporado a un tubo Falcon de 15 ml, el cual fue protegido con el capuchón.

La parte interna de la vagina artificial se mantuvo a 38°C, utilizando agua caliente (45°C – 46°C), se infló para brindar presión a las paredes internas y obtener una forma de “Y”. La vagina artificial fue envuelta con una franela seguidamente de bolsa para agua caliente conteniendo agua hervida, frazadilla, franela para que la temperatura esté constante a 38°C durante la cópula; se colocó y aseguró dentro del maniquí. Se registró el tiempo de cópula de cada macho en las colectas que se realizó.

Inmediatamente a la colecta se transportó la vagina artificial hacia el laboratorio y se retiró el tubo colector protegido por el capuchón para las evaluaciones correspondientes.



Figura 5. Colección de semen de alpaca con vagina artificial acoplada a un maniquí.

3.3.3. Procesamiento de semen de alpaca

3.3.4. Evaluación macroscópica

En el laboratorio las muestras colectadas fueron mantenidas a 37°C en baño María.

3.3.4.1. Volumen

El volumen del eyaculado (ml) se determinó midiendo en un tubo Falcon graduado.

3.3.4.2. Espuma

La espuma del eyaculado se determinó observando en el tubo Falcon graduado.

3.3.4.3. Color

Se determinó mediante la observación directa en el tubo colector graduado.



Figura 6. Muestras de semen de alpaca colectadas en tubos Falcon.

3.3.4.4. Filancia

Para evaluar la filancia de la muestra seminal, se realizó a partir de 10 μ l de semen midiendo la distancia donde se rompe el hilo.

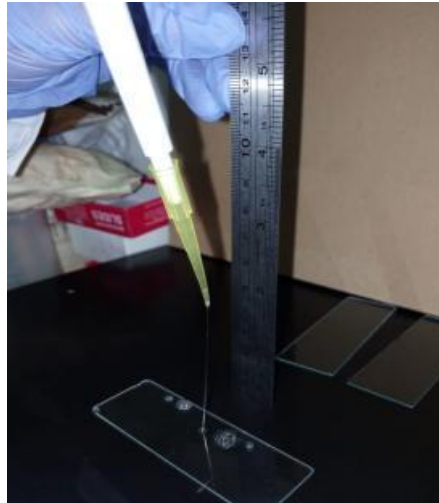


Figura 7. Uso de una regla para la medición de la filancia.

3.3.5. Evaluación microscópica

3.3.5.1. Evaluación de motilidad

Se realizó en semen fresco, con una micropipeta se aspiró 10 μ l de muestra y se colocó en lámina portaobjetos previamente atemperado a 37°C en una platina térmica para ser observado en un microscopio óptico de campo claro a 10X (microscopio, marca Accu-Scope, modelo 3012-LED).

3.3.5.2. Evaluación de concentración espermática

Con una micropipeta se tomó 10 µl de muestra y se colocó en lámina portaobjetos cubriéndolo con cubreobjetos, ambas láminas previamente atemperadas a 37 °C en una platina térmica. Se evaluó en el equipo AndroVision sistema CASA con el objetivo de 40X, se tomaron 3 fotografías sucesivas en campos distintos.

3.3.5.3. Vitalidad espermática

Se evaluó mediante la tinción de eosina – nigrosina. Para ello, se atemperó un portaobjetos a 37 °C en una platina térmica, se hizo la combinación de muestra y colorante en proporción de 1/1.

Seguidamente se realizó el frotis y se dejó secar a temperatura ambiente. Para después observar en microscopio (marca Minitube, modelo MBL 2000), con el objetivo de 100X con aceite de inmersión, se contaron un mínimo de 200 espermatozoides, entre vivos y muertos, considerándose como espermatozoides muertos los de color rojo o violeta; y vivos, los incoloros o transparentes.

Para la obtención de los resultados se aplicó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de vitalidad} = \frac{n}{N} \times 100$$

Donde:

n = espermatozoides vivos hallados.

N = total de espermatozoides contados.

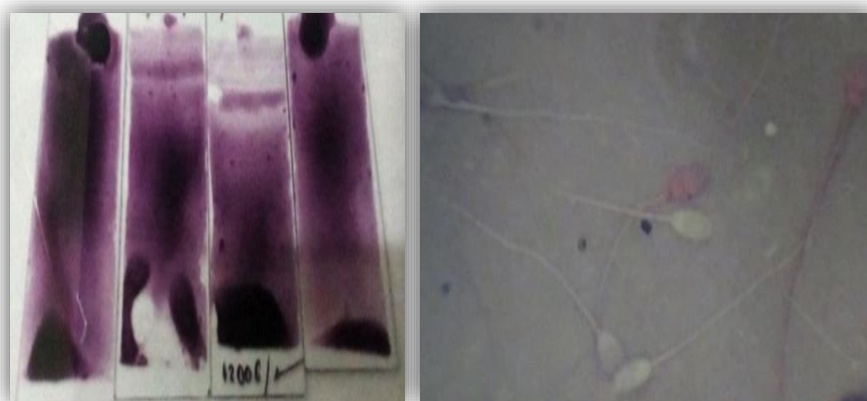


Figura 8. Láminas coloreadas con tinción eosina- nigrosina (lado izquierdo) y espermatozoides después de la coloración con tinción eosina-nigrosina (lado derecho).

3.3.5.4. Evaluación de la integridad de membrana espermática mediante la tinción Hoechst 33342/PI

Se usó un tubo Eppendorf color café (200 µl), se colocaron 10 µl de semen y se agregaron 1,5 µl de Hoechst 33342/PI. Luego se incubó por 15 min a 37°C en oscuridad. Después se colocaron 5 µl de muestra en un portaobjetos y se cubrió con laminilla. Se observó con el objetivo de 20X en el sistema CASA (microscopio AndroVision, marca Axio Scope), los espermatozoides con membrana dañada se tiñeron de color rojo/violeta y los espermatozoides de membrana intacta, de color azul. El recuento se realizó automáticamente sobre la base de 1000 espermatozoides (Minitube.com.).

Para la obtención de los resultados se aplicó la siguiente fórmula.

$$\% \text{ de Spz con IM} = \frac{n}{N} \times 100$$

Donde:

n: espermatozoides con membrana intacta

N: total de espermatozoides contados

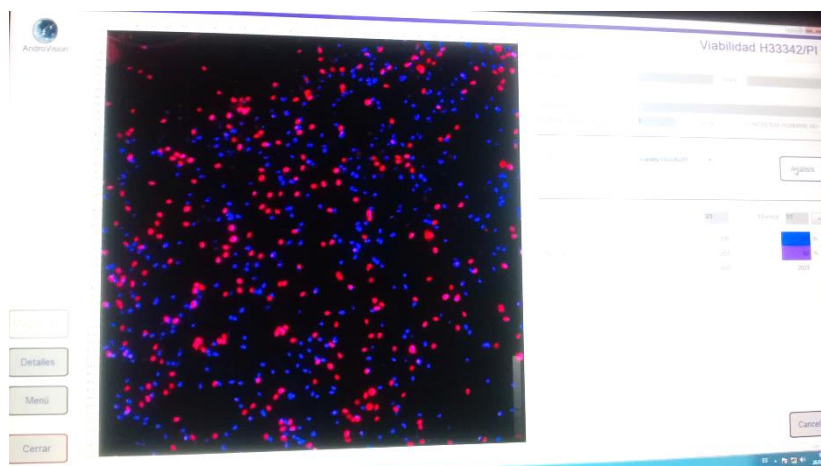


Figura 9. Evaluación de integridad de membrana con tinción de Hoechst 33342/PI en sistema CASA.

3.3.6. Evaluación de la integridad acrosomal mediante la triple tinción con azul de Tripán, rosa de Bengala y marrón de Bismark

Para ello, se colocó 50 µl del azul de Tripán al 3% a 37°C. Al cual se añadió 50 µl de semen, se homogenizó e incubó a 37°C por 15 min. Después se realizó un

frotis en una lámina portaobjeto precalentado a 37°C y se dejó secar a temperatura ambiente. Para luego ser fijado con alcohol al 96% durante 10 min, transcurrido el tiempo se lavó con agua destilada y se dejó secar.

Seguidamente se sumergió en una solución de marrón de Bismark al 3% a 45°C por 10 min, se lavó con agua destilada y se dejó secar. Posteriormente se coloreó en una solución de rosa de bengala al 0,5% por 1min. Después se lavó con agua destilada y dejándole secar a temperatura ambiente.

Finalmente se evaluó en un microscopio de campo claro a 100X, en el que se contó 200 espermatozoides.

Se utilizó la triple tinción adaptada por (Garde et al., 1992), citado por Susana (1998). Quiénes tuvieron en cuenta los siguientes patrones.

“Región acrosomal rosa y post-acrosomal marrón ligero: espermatozoide vivo con acrosoma intacto (VA), región acrosomal y post-acrosomal marrón ligero: espermatozoide vivo con acrosoma reaccionada (VR), región acrosomal rosa y post-acrosomal marrón oscuro: espermatozoide muerto con acrosoma intacto (MA), región acrosomal y post-acrosomal marrón oscuro: espermatozoide muerto con acrosoma reaccionado (MR)”. (p.104)

$$\% \text{ de espermatozoides con acrosoma intacto} = \frac{n}{N} \times 100$$

Donde:

n: espermatozoides con acrosoma intacto

N: total de espermatozoides contados (I, II, III y IV)

3.3.7. Dilución

Las muestras de semen después de ser evaluadas, se dividieron inmediatamente en dos fracciones iguales y se les agregó los dilutores comerciales (Andromed® y Biladyl B) de acuerdo a la concentración del eyaculado.

3.3.8. Refrigerado

Este proceso se realizó después de la dilución, para ello se colocó la muestra en una refrigeradora, de modo que la temperatura descendía escalonadamente de

37°C a 5°C en un intervalo de 2 horas. Se evaluó la variable de integridad acrosomal.

3.3.9. Equilibrado y empajillado

Previamente se evaluó la motilidad, para la congelación se tomaron muestras con una motilidad mayor al 50%. También se evaluó la variable de integridad acrosomal.

Se realizó la identificación de las muestras, codificadas con el número de arete del macho y la fecha, inmediatamente después se dispuso en frasco con cubos de hielo para adaptar a los tubos Eppendorf. Se envasó el semen diluido en tubos Eppendorf de 1,5 ml, con nombre y registro de las alpacas, se dejaron por 1 min en el frasco con cubos de hielo, para adaptar las muestras de semen y evitar el choque térmico.

3.3.10. Congelación y almacenamiento

Se preparó la canastilla de congelación en el tanque de nitrógeno líquido, donde usando una regla se midió el nivel de nitrógeno.

Se aumentó 10 cm a la medida del nitrógeno y se marcó puntos de descenso cada 3 cm. Se introdujo la canastilla con los tubos Eppendorf conteniendo la muestra de semen que descendió 3 cm cada 5 min, para luego sumergirlo hasta la profundidad del tanque criogénico para finalmente criopreservarlo.

3.3.11. Descongelación

Se retiraron los tubos Eppendorf del tanque criogénico; luego, se sumergieron en agua a 38°C durante 60 seg. Los tubos fueron secados cuidadosamente y que se mantuvieron a 38°C. Se evaluó la variable de integridad acrosomal de manera similar para el semen refrigerado.

3.3.12. Análisis estadístico

La investigación es del tipo básica-experimental, con un Diseño Completamente al Azar (DCA); antes del análisis estadístico, se hizo la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianzas, se obtuvo que los datos se rigen a una distribución normal y presentan varianzas homogéneas. Por consiguiente, se realizó el análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$) para observar las diferencias estadísticas entre tratamientos utilizando la prueba de Tukey.

El análisis de datos se realizó utilizando el programa estadístico R-Studio versión 3.4.4

El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y = \mu + A_i + B_j + (A*b)_{ij} + e_{ijk} + d_{ijkl}$$

Donde:

Y: Valor observado en la I-ésima medida de la K-ésimo alpaca de la j-ésima raza con el i-ésimo dilutor

μ : Media general

A_i : Efecto del i-ésimo dilutor

B_j : Efecto de la j-ésima raza de alpaca

$(A*b)_{ij}$: Efecto de la interacción del i-ésimo dilutor con el j-ésima raza

e_{ijk} : Error experimental aleatorio asociado a cada animal

d_{ijkl} : Error de muestreo aleatorio asociado a cada observación de cada animal

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Características macroscópicas del semen de alpaca colectado con vagina artificial acoplada a un maniquí. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA- Ayacucho. 2019

Parámetros	Promedio $\pm$ DS
Volumen (ml)	1,84 $\pm$ 0,99
Filancia (cm)	2,52 $\pm$ 2,14
Espuma (cm³)	1,52 $\pm$ 1,57
Color	Blanco lechoso

DS: Desviación Estándar

Tabla 2. Características microscópicas del semen de alpaca colectado con vagina artificial acoplada a un maniquí. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA- Ayacucho. 2019

Parámetros	Promedio ± DS
Concentración 10⁶/ml	194,09 ± 87,05
Motilidad (%)	79,12 ± 14,03
Integridad de membrana (%)	67,94 ± 13,19
Vitalidad (%)	76,99 ± 10,39

DS: Desviación Estándar

Tabla 3. Integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca según etapa de conservación con el dilutor Andromed®. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA- Ayacucho. 2019

Etapas de conservación	Integridad acrosomal %
Fresco	66,40 ± 9,99 ^a
Refrigerado	60,58 ± 15,70 ^{ab}
Criopreservado	36,96 ± 21,33 ^b

^{ab}: Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05)

Tabla 4. Integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca según etapa de conservación con el dilutor Biladyl B. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA- Ayacucho. 2019

Etapas de conservación	Integridad acrosomal %
Fresco	66,40 ± 9,99 ^a
Refrigerado	58,20 ± 14,39 ^{ab}
Criopreservado	37,02 ± 24,59 ^b

^{ab}: Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05)

Tabla 5. Efecto del dilutor Andromed® sobre el porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y descongelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2019

Etapas de conservación	Integridad acrosomal %
Refrigerado	60,58 ± 15,70 ^a
Criopreservado	36,96 ± 21,33 ^b

^{ab}: Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05)

Tabla 6. Efecto del dilutor Biladyl B sobre el porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y descongelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2019

Etapas de conservación	Integridad acrosomal %
Refrigerado	58,20 ± 14,39 ^a
Criopreservado	37,02 ± 24,59 ^b

^{ab}: Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05)

Tabla 7. Porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca Huacaya y Suri con el dilutor Andromed® en semen refrigerado y descongelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2019

Raza	Condiciones de conservación	
	Refrigerado	Criopreservado
Huacaya	58,28 ± 16,94 ^a	33,50 ± 23,16 ^b
Suri	64,11 ± 13,42 ^a	42,30 ± 17,70 ^b

^{aa}: Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencias estadísticas significativas (p>0,05)

^{ab}: Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas (p<0,05)

Tabla 8. Porcentaje de integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca Huacaya y Suri con el dilutor Biladyl B en semen refrigerado y descongelado. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2019

Raza	Condiciones de conservación	
	Refrigerado	Criopreservado
Huacaya	55,51 ± 16,58 ^a	33,86 ± 27,74 ^b
Suri	62,34 ± 9,31 ^a	41,87 ± 18,75 ^b

^{aa}: Letras iguales en la misma columna indican que no hay diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$)

^{ab}: Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$)



Figura 10. Espermatozoides de alpaca luego de la triple tinción con azul de Tripán, rosa de bengala y Marrón de Bismark: "a) Espermatozoide vivo con acrosoma intacto. b) Espermatozoide vivo con acrosoma reaccionado. c) Espermatozoide muerto con acrosoma intacto. d) Espermatozoide muerto con acrosoma reaccionado"(Garde et al., 1992 citado por Susana,1998, p.60-61).

V. DISCUSIÓN

Sobre la base de los resultados obtenidos de la investigación se muestran los promedios de las características macroscópicas como: volumen 1,84 ml; filancia 2,52 cm; espuma 1,52 cm y el color que predominó fue lechoso, tal como se muestra en la Tabla 1. Las características microscópicas en promedio fueron: Concentración $194,09 \times 10^6$ espermatozoides/ml; motilidad 79,12%; integridad de membrana 67,94% y vitalidad 76,99% como se muestra en la Tabla 2.

El porcentaje de la integridad del acrosoma de espermatozoides de alpaca en semen fresco fue de $66,40\% \pm 9,99$; mientras que en semen refrigerado y descongelado para el dilutor Andromed® fue; $60,58\% \pm 15,70$ y $36,96\% \pm 21,33$ respectivamente; como se muestra en la Tabla 3. Por otro lado, en semen refrigerado y descongelado para el dilutor Biladyl B se obtuvo $58,20\% \pm 14,39$ y $37,02\% \pm 24,59$ respectivamente; tal como se muestra en la Tabla 4. Se observa que hay una diferencia en los tiempos de procesamiento de semen para ambos dilutores. De acuerdo a las investigaciones anteriores se observó en varias especies los cambios que experimentan los espermatozoides que son similares a los de la capacitación después de la refrigeración y congelación, un efecto denominado “criocapacitación”(Maxwell & Johnson, 1997). En espermatozoides criopreservados, la permeabilidad de calcio es mayor, debido a que es inducida por las bajas temperaturas, los cuales facilitan las reacciones capacitantes anticipadas (reacción acrosomal) disminuyendo así el potencial fecundante (Hafez, 2002).

Debido a que, durante estos procesos, los espermatozoides están sujetos a diferentes cambios por la adición de crioprotectores; todo ello conlleva a que los espermatozoides después de la descongelación sufran daños en la membrana plasmática y mitocondrial, el acrosoma y la cola del espermatozoide. Es por ello

que, son pocos los espermatozoides que están funcionalmente íntegros después de la criopreservación (Holt et al., 1997).

El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosomas intactos en muestras seminales frescas fue menor en comparación a lo reportado por Cueva (2018) quien obtuvo 79,33%. Estas diferencias podrían ser debido a la época de colección y las condiciones de las alpacas de quienes se recolectó la muestra, el manejo del método de triple tinción azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa. Por otro lado, son similares en semen refrigerado quien obtuvo 65,60% y en semen congelado 38,54% (Cueva, 2018).

Morton et al., (2010) reportaron en espermatozoides de alpaca el porcentaje de integridad acrosomal 92,3% en muestras frescas recuperados a partir de epidídimo, los resultados reportados fueron mayores en comparación a los obtenidos en la presente investigación. Esta diferencia podría ser debido a que añadieron antioxidante Equex STM®, usaron dilutor comercial Biladyl® y al tipo de tinción que usaron eosina-nigrosina.

Torres (2018), reportó porcentaje de integridad del acrosoma 72,65% para (T100) de plasma seminal; 71,09% para el tratamiento Tris más 50% de plasma seminal; 70,33% para el tratamiento Tris más 10% de plasma seminal; 68,89 para el tratamiento de Tris 100% (T0) en semen fresco; los resultados reportados fueron mayores en comparación a los obtenidos en la presente investigación. Esto podría ser debido al método de colección de desviación de los conductos deferentes, al dilutor usado, a la adición de plasma seminal de alpaca a las muestras y al tiempo de equilibrio de 1h.

En nuestro caso el porcentaje de espermatozoides con acrosomas intactos es inferior a lo reportado por (Maxi, 2019) quien obtuvo 85,79% en semen fresco. Esta diferencia posiblemente se explique en función del método de colección, del método de tinción eosina-nigrosina y del tiempo de equilibrio que fue de 20 min.

Los resultados con respecto a espermatozoide vivo con acrosoma intacto en muestra fresca en la presente investigación son mejores en comparación a lo que obtuvo Calderon (2015) que fue 44,78% de integridad acrosomal. Estas diferencias podrían ser debido a la técnica utilizada en la colección de muestra que fue mediante desviación de los conductos deferentes, al uso de dilutor tris-yema de huevo y la tinción eosina-nigrosina.

En lo que concierne a la muestra refrigerada y congelada se obtuvo 41,26% y 25,12%; respectivamente, siendo estos resultados inferiores a los logros de este

estudio. Estas diferencias podrían ser debidas al tiempo de refrigeración de la muestra y al tipo de congelación descrito por el autor.

Para determinar que los resultados obtenidos tuvieran una distribución normal se realizó la prueba Kolmogorov-Smirnov, efectivamente si presentó una distribución normal, entonces se empleó el análisis de varianza (ANOVA, $\alpha=0,05$) y para ver las diferencias estadísticas se hizo la prueba Tukey. En la muestra fresca se observó mayor porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en comparación a las muestras refrigeradas y congeladas. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede deducir que durante la refrigeración y congelación se origina la pérdida o daño en el acrosoma de espermatozoides de alpaca; no obstante, en la etapa de refrigeración (5°C) por 2 h, el daño provocado es mucho menor, así conservando la mayor parte de los espermatozoides con acrosoma íntegro.

El efecto del dilutor Andromed® sobre la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado fue de: 60,58%; 36,96% respectivamente, tal y como se muestra en la Tabla 5. Por otro lado, el efecto del dilutor Biladyl B sobre la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado se obtuvo: 58,20% y 37,02% respectivamente tal y como se muestra en la Tabla 6.

Se observa que hay una diferencia entre el semen refrigerado y congelado para ambos dilutores sobre el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto. Sin embargo, se puede observar que el dilutor Biladyl B brinda mayor protección a la integridad del acrosoma, posiblemente porque contiene yema de huevo que es considerado como un crioprotector no penetrante.

La yema de huevo de gallina se usa ampliamente como agente crioprotector en diluyentes de congelación de semen para proteger a los espermatozoides del choque por frío. Se presume en gran parte que la acción protectora de la yema se debe a las (LDL) (Moussa et al., 2002). Actuando como amortiguador osmótico de los espermatozoides frente a las soluciones hipo e hiperosmóticas. Esto, principalmente está relacionado porque la LDL se asocia a la membrana plasmática durante la criopreservación y así estabilizándola. Por ende, previniendo la ruptura de la membrana plasmática (Moustakas et al., 2011).

Muchas investigaciones llegaron a la conclusión de que la adición de la yema de huevo al diluyente mejora considerablemente la movilidad, integridad acrosomal y supervivencia de los espermatozoides después de la congelación.

Apaza (2017) obtuvo el porcentaje de integridad acrosomal después de la descongelación 61,59% para dilutor tris con yema de huevo de gallina criolla; 65,27% para el dilutor tris con yema de huevo de gallina de granja; 64,64% para el dilutor tris con yema de huevo de codorniz y 62,53% para el dilutor tris con yema de huevo de paloma. Estos resultados son superiores a los obtenidos en la presente investigación, posiblemente se debe al tipo de dilutor utilizado que fue tris más yema de huevo, al tipo de tinción eosina-nigrosina, al tipo de congelación y al factor especie.

También Cueva (2018), obtuvo 65,60% de porcentaje de integridad de acrosoma en semen refrigerado y en semen congelado/descongelado obtuvo 38,54%. Hay una ligera variación con respecto a los resultados obtenidos en la presente investigación, esto posiblemente se debe a la técnica de colección, al método de triple tinción azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa y al dilutor Andromed®.

Por otro lado Ugarelli et al., (2017) obtuvo 61,13% de integridad acrosómica en espermatozoides vivos en muestras de semen refrigeradas, con estos resultados hay una pequeña diferencia con respecto a la presente investigación. Estas diferencias podrían ser debido a las muestras obtenidas del epidídimo de alpaca, al dilutor y a la evaluación realizada en el citómetro de flujo donde se usó el colorante fluorescente FITC-PSA.

Asimismo, Banda et al., (2010) reportaron 32,6% de integridad de acrosoma con el dilutor tris; 26,3% con el dilutor tes; 27,2% con el dilutor leche descremada en semen congelado/descongelado. Los resultados son inferiores a los obtenidos en la presente investigación; esto posiblemente se debe a que la muestra fue recuperada de epidídimo, al dilutor utilizado, al método de doble tinción (azul de Tripán y Giemsa).

Por otro lado, Cabrera & Pantoja (2012) en bovinos reportaron el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto 65,2% en semen refrigerado y 48,6% de espermatozoides con acrosoma intacto en semen congelado/descongelado. Estos resultados son superiores a lo obtenido en la presente investigación; posiblemente se deba al tipo de colecta del eyaculado, al dilutor Bioxell Buffer IMV®, a la forma de congelación, al método de doble tinción (Giemsa–Azul de Tripán y factor especie).

Bhardwaz et al., (2016) en bovinos reportaron el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto en semen descongelado 74,83% para el dilutor con yema de huevo, tris, glicerol como control (EYTG-C); 78,17% para el tratamiento yema

de huevo, tris, glicerol más la adición de cisteína 10mM (CYS-10); 69,83% para el dilutor con yema de huevo, tris, glicerol más la adición de cisteína 12mM (CYS-12); 59,83% para el dilutor con yema de huevo, tris, glicerol más la adición de cisteína 15mM (CYS-15). Estos resultados son superiores respecto a la presente investigación, esto podría ser debido a la adición de clorhidrato de cisteína al diluyente tris con yema después de la descongelación, al tiempo de equilibrio de 4 h, la forma de congelación y factor especie (Bhardwaz et al., 2016).

Por su parte, Vargas, (2015) investigó la integridad acrosomal en carneros teniendo como resultado 50,60%. Los resultados obtenidos son inferiores en comparación a la presente investigación. Estas diferencias posiblemente se deban al tipo de dilutor Tris, a la técnica utilizada, al tipo de tinción que fue con eosina-nigrosina-Giemsa y al factor especie.

En la comparación del efecto del dilutor Andromed® sobre el porcentaje de espermatozoides de alpaca Huacaya y Suri en semen refrigerado se obtuvo $58,28\% \pm 16,94$ y $64,11\% \pm 13,42$ de integridad de acrosoma. Por otro lado, para el semen descongelado en alpacas Huacaya y Suri se obtuvo: $33,50\% \pm 23,16$; $42,30\% \pm 17,70$ de integridad de acrosoma respectivamente, tal y como se muestra en la Tabla 7.

En la comparación del efecto del dilutor Biladyl B sobre el porcentaje de espermatozoides de alpaca Huacaya y Suri en semen refrigerado se obtuvo $55,51 \pm 16,58$ y $62,34 \pm 9,31$ de integridad de acrosoma. Por otro lado, para el semen descongelado en alpacas Huacaya y Suri se obtuvo: $33,86 \pm 27,74$; $41,87 \pm 18,75$ de integridad de acrosoma respectivamente, tal y como se muestra en la Tabla 8.

En los resultados se observa una ligera pérdida de la integridad del acrosoma debido al factor congelación y descongelación. Un efecto no deseable pero importante de resaltar, se está perdiendo espermatozoides viables con capacidad de fecundar, por efecto de la congelación/descongelación estos resultados fueron similares entre alpacas Huacaya y Suri.

La calidad seminal de una alpaca se encuentra desde la colección y durante el procesamiento del semen (fresco, refrigerado y congelación/descongelación); esto es una característica propia del individuo según su genotipo. Sobre esta base, se puede recalcar la importancia de conocer la proporción de

espermatozoides con acrosoma intacto en cada alpaca, ya que esta medida determina su capacidad fecundante.

Los espermatozoides con acrosoma intacto son inferiores a lo reportado por Maxi (2019), que obtuvo: 79,08% de espermatozoides con acrosoma intacto en semen refrigerado y 75,30 % de espermatozoides con acrosoma intacto en semen descongelado en alpaca Huacaya. Esto podría ser debido al método de colección de post-cópula, al método de tinción eosina-nigrosina, al tiempo de equilibrio que fue 20 min, al dilutor usado y al método de congelación.

Finalmente, en la aplicación de la técnica de triple tinción con azul de Tripán, rosa de Bengala y marrón de Bismark en espermatozoides de alpaca se realizó con éxito pudiendo evaluar la integridad acrosomal, tal como se observa en la Figura 10. En las muestras evaluadas, se observaron de acuerdo a los patrones adaptados por (Garde et al., 1992, citado por Susana, 1998, p. 60-61), “espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VA), (región acrosomal rosa y post-acrosomal ligeramente marrón); espermatozoides vivos con acrosoma reaccionada (VR), (región acrosomal y post-acrosomal ligeramente marrón); espermatozoides muertos con acrosoma intacto (MA), (región acrosomal rosa y post-acrosomal marrón oscuro) y espermatozoides muertos con acrosoma reaccionado (MR), (Región acrosomal y post-acrosomal marrón oscuro)”.

VI. CONCLUSIONES

1. La integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca en semen fresco fue de 66,40%.
2. El dilutor Andromed® tuvo un efecto similar que el dilutor Biladyl B en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado (60,58% y 58,20%); respectivamente
3. El efecto del dilutor Biladyl B tuvo un efecto similar que el dilutor Andromed® en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen congelado (37,02% y 36,96%); respectivamente.
4. El dilutor Andromed® tuvo un mejor efecto que el dilutor Biladyl B en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado tanto en la raza Huacaya y Suri.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar más ensayos incluyendo la determinación de integridad acrosomal en semen fresco, refrigerado y congelado sin dilutores.
2. Probar el efecto de otros dilutores sobre la integridad acrosomal, tales como triladyl, optixcell, bioxcell, Tris más yema de huevo y camelidil.
3. Ampliar los estudios sobre el efecto de dilutores comparando el proteoma del plasma seminal en alpacas Huacaya y Suri.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. P., Ratto, M. H., Collins, C. W., & Bergfelt, D. R. (2009). Artificial insemination in South American camelids and wild equids. *Theriogenology*, 71(1), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.005>
- Aller, J. F., Rebuffi, G. E., Cancino, A. K., & Alberio, R. H. (2003). Influence of Cryopreservation on the Motility, Viability and Fertility of Llama (Lama Glama) Spermatozoa. *Theriogenology*, 52, 15–23. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00384-8](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00384-8)
- Apaza, L. S. (2017). *Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero* [Tesis de grado, Universidad Nacional del Altiplano].
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., León, M. F., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., & Gómez, C. (2006). Fundamentos de Crioconservación. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 57(4), 291–300. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74342006000400008&lang=pt%0Ahttp://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v57n4/v57n4a08.pdf
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, F. G. (1998). Nongenomic effects of progesterone on spermatozoa: mechanisms of signal transduction and clinical implications. *Front Biosci*, 3(D1051-9), 13. <https://doi.org/10.2741/a345>
- Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, S. A. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y Leche Descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 21(2), 145–153. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v21n2/a01v21n2.pdf>
- Bhardwaz, A., Pandey, A. K., Sharma, U., Razzaque, W. A. A., Gupta, S. K., Kumar, S., & Kumar, S. (2016). Effect of cysteine hydrochloride on post thaw viability and acrosomal integrity of Jersey bull semen. *Veterinary Practitioner*, 17(2), 227–228.
- Boiso, I. (2001). Principios básicos de Criobiología. *1º Congreso ASEBIR*, 18(4), 127–131.
- Bravo, P. W., Ccallo, M., & Garnica, J. (2000). The effect of enzymes on semen viscosity in Llamas and Alpacas. *Elsevier*, 38(1), 91–95. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(00\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(00)00142-5)
- Bravo, P. W., Flores, U., Garnica, J., & Ordoñez, C. (1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47(3), 619–626. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00020-4)
- Cabrera V., P., & Pantoja A., C. (2012). Viabilidad Espermática E Integridad Del Acrosoma En Semen Congelado De Toros Nacionales. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 23(2). <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i2.899>
- Calderon, A. D. W. (2015). *Efecto de la adición del plasma seminal de toro (Bos taurus) sobre la viabilidad de los espermatozoides criopreservados colectados de los conductos deferentes en alpacas (Vicugna pacos)*. [Tesis de grado, Universidad Nacional del Altiplano]. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/1854>
- Cardona -Maya, W.D. Cadavid, A. P. (2005). Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urológicas Españolas*, 29(7), 676–684. <https://scielo.isciii.es/pdf/aue/v29n7/original6.pdf>
- Cardozo, J. A. (2002). Nuevas herramientas para la evaluación de la fertilidad de

- semen. In et al. Cardozo J, Velásquez J, Rodríguez G, Prieto E, Tarazana G, Espitia A (Ed.), *Evaluación reproductiva de macho Bovino en condiciones tropicales*. (Corpoica, Issue September 2002, pp. 47–48). https://www.researchgate.net/publication/297001063_Evaluacion_reproductiva_del_macho_bovino_en_condiciones_tropicales
- Carretero, MI; Fumuso, FG; Miragaya, MH; Giuliano, S. (2015). Evaluación del estado acrosomal en espermatozoides de llama. *Spermova*, 5(2), 258–263. <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.46>
- Casaretto, C., Martínez Sarrasague, M., Giuliano, S., Rubin de Celis, E., Gambarotta, M., Carretero, I., & Miragaya, M. (2012). Evaluation of Lama glama semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. *Andrologia*, 44(SUPPL.1), 335–341. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01186.x>
- Castillo, V. (2012). *Desarrollo de un método de referencia basado en el método isas y análisis de imágenes para la evaluación morfométrica del acrosoma del espermatozoide en la especie ovina*. [Trabajo de fin de carrera, Universidad Zaragoza].
- Celeghini, E. C. C., Nascimento, J., Raphael, C. F., Andrade, A. F. C., & Arruda, R. P. (2010). Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 62(3), 536–543. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352010000300006>
- Choez Aguilera, K. (2016). *Determinación de la Concentración Óptima de Tres Crioprotectores para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. In *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13367>
- Choez, K. (2010). Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos. In *SIRIVS (visiones en Investigación Veterinaria de San Marcos)*.
- Cueva Hurtado, R. C. (2018). *Integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de Vicugna pacos “alpaca” recuperados de semen fresco, refrigerado y congelado*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga]. http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/2835/1/TESIS%20B835_Cue.pdf
- De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32–44. <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1005>
- Delgado, J. K. (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*. [Tesis de grado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/14580>.
- Didion, B. A., Dobrinsky, J. R., Giles, J. R., & Graves, C. N. (1989). Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*, 22(1), 51–57. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120220106>
- Fahy, G. M., Lilley, T. H., Linsdell, H., Douglas, M. S. J., & Meryman, H. T. (1990). Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, 27(3), 247–268. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(90\)90025-Y](https://doi.org/10.1016/0011-2240(90)90025-Y)

- Fawcett, D. W. (1970). A Comparative View of Sperm Ultrastructure. *Biology of Reproduction*, 2, 90–127. <https://doi.org/10.3138/9781442676824-011>
- Flesch, F. M., Voorhout, W. F., Colenbrander, B., Van Golde, L. M. G., & Gadella, B. M. (1998). Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: A novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biology of Reproduction*, 59(6), 1530–1539. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1530>
- Gadea, J. (2003). Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), 17. <https://doi.org/10.5424/sjar/2003012-17>
- Gao, D. Y., Liu, J., Liu, C., McGann, L. E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., Critser, E. S., & Critser, J. K. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, 10(5), 1109–1122. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a136103>
- Garde J.J., Artiga C., Gutiérrez A. y Vásquez I. (1992). Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Med. Vet*, 9, 107–114.
- Giuliano, S. M. (2012). Extracción y Evaluación de Semen de Camélidos Sudamericano. *Spermova*, 2(1), 6–9.
- Giuliano, S., & Santa Cruz., C. (2011). Métodos de recuperación de espermatozoides en camélidos. *Spermova*, 1(1), 58–59. http://spermova.pe/site2/files/Revistas/Rev.No.1Vol1/58-59METODOS-DE-RECUPERACION-DE-ESPERMATOZOIDES-EN-CAMELIDOS_58-59.pdf
- Hafez, E. S. E. and Hafez B. H. (2002). Reproducción e Inseminación Artificial en animales. In McGraw-Hill Interamericana (Ed.), *Séptima Edición. McGraw-Hill* (7 edición).
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11:73-88. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/j.1939-4640.1990.tb01583.x>
- Hammerstedt, R. H., y Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29(1), 26–38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90004-L](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90004-L)
- Hanzen, C; Cucho, H; Ampuero, E; Ordoñez, C; Sumar, J. (2014). *Principios de la reproducción de los camélidos sudamericanos* (F. Editorial Universitaria (ed.); 1 edición).
- Hernández P, Fernández R, Rodríguez S, Negrete R, Soto M, G. R. (2012). efecto de la criopreservación sobre la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides de conejo de la raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*). *Revista de Salud Animal*, 34(3), 188–191. http://scieloprueba.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0253-570X2012000300009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Holden, C. A., Hyne, R. V., Sathanathan, A. H., & Trounson, A. O. (1990). Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin a lectin. *Molecular Reproduction and Development*, 25(3), 247–257. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080250306>
- Holt, C., Holt, W. V., Moore, H. D. M., Reed, H. C. B. y Curnock, R. M. (1997). Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations. *Andrology*, 18(3), 312–323.
- Huanca, W., Cordero, A., & Adams, G. P. (2007). Biotecnologías reproductivas en camélidos sudamericanos domésticos; avances y perspectivas. In *Arch. Latinoam. Prod. Anim* (Vol. 15, Issue 1).
- INEI. (2012). IV Censo Nacional Agropecuario 2012. Resultados Definitivos.

- Instituto de Estadística e Informática, 62. www.inei.gob.pe
- Januskauskas A., Johannisson A., S. L. and R. H. (2000). Assessment of Sperm Characteristics Post-Thaw and Response To. *Theriogenology*, 53(00), 859–875. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00235-1)
- Jungnickel MK, Marrero H, Birnbaumer L, Lemos JR, F. H. (2001). Trp2 regulates entry of Ca²⁺ into mouse sperm triggered by egg ZP3. *Nature Cell Biology*, 3, 499–502. https://www.nature.com/articles/ncb0501_499
- Kershaw-Young, C. M., & Maxwell, W. M. C. (2011). Advancing artificial insemination in camelids, particularly the alpaca. *Australia, RIRDC*, 11, 87. <https://cdn.harper-adams.ac.uk/document/project/150604-Advancing-Artificial-Insemination-in-Alpacas423506.pdf>
- La Spina, F. A., Stival, C., Krapf, D., & Buffone, M. G. (2017). Molecular and Cellular Aspects of Mammalian Sperm Acrosomal Exocytosis. In S. H. Constantinescu Gheorghe (Ed.), *Animal Models and Human Reproduction* (Wiley-Blac, pp. 409–426). 03 enero 2017. <https://doi.org/10.1002/9781118881286.ch15>
- Maxi Allcca, E. (2019). *Efecto protector de la yema de huevo de tres diferentes especies de aves durante la criopreservación del semen de alpaca (vicugna pacos)*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco].
- Maxwell, W. M. C., & Johnson, L. A. (1997). Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*, 46(3), 408–418. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199703\)46:3<408::AID-MRD21>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3<408::AID-MRD21>3.0.CO;2-T)
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better. *Theriogenology*, 57(1), 327–344. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00674-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00674-4)
- Morton, K. M., Bathgate, R., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2007). Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: A comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(7), 792–796. <https://doi.org/10.1071/RD07049>
- Morton, K. M., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2010). Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology*, 74(2), 311–316. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.02.015>
- Morton, K., Vaughan, J., & Maxwell, W. M. C. (2008). Continued Development of Artificial Insemination Technology in Alpacas. *Rural Industries Research and Development Corporation-Australian Government*, 08, 205. <https://www.agrifutures.com.au/wp-content/uploads/publications/08-057.pdf>
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57(6), 1695–1706. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00682-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00682-9)
- Moustacas, V. S., Zaffalon, F. G., Lagares, M. A., Loaiza-Eccheverri, A. M., Varago, F. C., Neves, M. M., Heneine, L. G. D., Arruda, R. P., & Henry, M. (2011). Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 75(2), 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.016>
- Muñoz Otero, R. (2007). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino*

- mediante el uso de sistemas CASA y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas. [Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela].
- Nolan JP, H. R. (1997). . Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J*, 11, 670–682. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.8.9240968>
- Olivera Ángel, M., Ruíz, T., Tarazona Morales, A., & Giraldo Echeverri, C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 19(4), 426–436. <http://www.serida.org/publicacionesdetalle.php?id=1495>
- Paricahua, E. (2001). *Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca*. [Tesis de grado, Universidad Nacional del Altiplano].
- Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*, 92(3–4), 255–266. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(00)01072-8)
- Peña, A; Linde, F. (2000). Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54(00), 703–718. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00384-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00384-8)
- Vishwanath P., S. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod*, 62(1–3), 23–53. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00153-6)
- Ramallo-Santos, J; Schatten, G and Moreno, R. (2002). Schatten, Moreno - 2002 - Minireview Control of Membrane Fusion During Spermiogenesis and the Acrosome Reaction 1. *Biology of Reproduction*, 67, 1043–1051. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005967>
- Raymundo, F., Huanca, W., Huanca, T., Huerta, S., & Cordero, A. (2006). Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 17(2), 125–130. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v17n2/a07v17n2.pdf>
- Saacke, R. G., & White, J. M. (1972). Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4th Tech., Conf. Artificial Insemination Reproduction*, 22.
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3–4), 185–249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-I](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I)
- Santiani, A., Huanca, W., Sapaná, R., Huanca, T., Sepúlveda, N., & Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal of Andrology*, 7(3), 303–309. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x>
- Silva, P. F. N., & Gadella, B. M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5 SPEC. ISS.), 958–978. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.010>
- Smith, C. L., Peter, A. T., & Pugh, D. G. (1994). Reproduction in llamas and alpacas: A review. *Theriogenology*, 41(3), 573–592. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90169-J](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90169-J)
- Stornelli, M. C; Tittarelli, C. M; Savignone, C. A., & Stornelli, M. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. In *Analecta Veterinaria* (Vol. 25, Issue 2). http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11180/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Suhevic J, Malcervelli D, Torres P, Fratto C, Miguel J, Fischman ML, et al. (2015). Determinación de la calidad de las membranas espermáticas porcinas mediante triple tinción fluorocrómica en semen fresco y

- refrigerado. *Spermova*, 5(1), 134–138.
- Sumar, J; Leyva, V. (1981). Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). In *Convención Internacional Sobre Camélidos Sudamericanos (4, 1981, Punta Arenas, Chile). Resúmenes. Punta Arenas, Chile.*, 12.
- Sumar, J. (2002). *Llamas y alpacas*. In Hafez, ESE; Hafez, B (eds.). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (E. M.-H. Interamericana (ed.); 7 edición).
- Szász, F., Sirivaidyapong, S., Cheng, F. P., Voorhout, W. F., Marks, A., Colenbrander, B., Solti, L., & Gadella, B. M. (2000). Detection of calcium ionophore induced membrane changes in dog sperm as a simple method to predict the cryopreservability of dog semen. *Molecular Reproduction and Development*, 55(3), 289–298. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200003\)55:3<289::AID-MRD7>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200003)55:3<289::AID-MRD7>3.0.CO;2-K)
- Tejerina Ampudia, F. (2007). Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco. [Universidad de León]. In *Universidad de León*. https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1204/2007TEJERINA_AM PUDIA%2FERNANDO.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Tibary, A., & Vaughan, J. (2006). Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Research*, 61(2-3 SPEC. ISS.), 283–298. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.018>
- Torres Mamani, E. Y. (2018). Efecto de la adición de plasma seminal antes y después de la congelación de espermatozoides colectados del conducto deferente de alpaca sobre algunas características espermáticas. In *Universidad Nacional del Altiplano - Puno*. Universidad Nacional del Altiplano.
- Ugarelli, A., Evangelista-Vargas, S., & Santiani, A. (2017). Evaluación de la Integridad Acrosomal en Espermatozoides Epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(1), 130. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12947>
- Valcarcel Ascencios, S. P. (2011). *Sistema inteligente para calificar alpacas en función a su fibra fina Sistema inteligente para calificar alpacas en función a su fibra fina*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. In *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/175>
- Vargas Cahuana, P. (2015). *Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen criopreservado de carneros* [Tesis de grado, Universidad Nacional del Altiplano]. https://doi.org/10.1007/8904_2014_350
- Vaughan, J., Galloway, D., & Hopkins, D. (2003). *Artificial insemination in alpacas (Lama pacos) A report for the Rural Industries Research and Development Corporation*. <http://www.rirdc.gov.au>
- Vigil P, Toro A, G. A. (2008). Physiological action of oestradiol on the acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrología*, 40(3), 146–151. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2007.00814.x>
- Vigil, P. (1989). Gamete membrane fusion in hamster spermatozoa with reacted equatorial segment. *Gamete Research*, 23(2), 203–213. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120230207>
- Way, A., Henault, M., & Killian, G. (1995). Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology*, 43(8), 1301–1316. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00115-O](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00115-O)

ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio Biggers, Whitten y Whittingham (BWW) (Biggers, Whitten y Whittingham, 1971).

Componente	Cantidad
NaCl	94,59 mM
KCl	4,78 mM
Lactato de $\text{Ca}_5\text{H}_2\text{O}$	1,71 mM
KH_2PO_4	1,19 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,19 mM
NaHCO_3	25,07 mM
Piruvato de Na	0,25 mM
Lactato de Na	21,58 mM
Glucosa	5,56 mM
Penicilina G Sódica	0,06 g/l
Sulfato de dihidroestreptomicina	0,05 g/l

Anexo 2. Composición del dilutor Andromed® utilizado en la criopreservación. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.

Composición del dilutor Andromed

TRIS

Fosfolípidos

Ácido cítrico

Azúcares

Antioxidantes

Tampones

Glicerina

Agua de altísima pureza

Antibióticos (Gentamicina, tilosina,
espectromicina, lincomicina)

Anexo 3. Composición del dilutor Andromed@ utilizado en la criopreservación. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.

Composición del dilutor Biladyl B

Tris

Ácido cítrico

Fructosa

Tilosina

Gentamicina

Lincomicina

Anexo 4. Colorante azul de tripán utilizado en la triple tinción para la evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.

Componente	Cantidad
Azul de Tripán	3 g
Medio BWW	100 ml

Anexo 5. Colorante marrón de Bismarck utilizado en la triple tinción para la evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.

Componente	Cantidad
Marrón de Bismarck	3 g
Alcohol 96 %	30 ml
Agua MilliQ	70 ml
pH 2,8	

Anexo 6. Colorante rosa de Bengala utilizado en la triple tinción para la evaluar la integridad del acrosoma en espermatozoides de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la EEA Canaán-INIA- Ayacucho.

Componente	Cantidad
Rosa de Bengala	0,5 g
Tris	1,2 g
Agua MilliQ	100 ml
pH 5,3	

Anexo 7. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca en semen fresco, refrigerado y congelado para el dilutor Andromed®.Ayacucho- 2020.

Fuente	GL	SC	CM	F	Valor p
Tratamiento	2	14 679,0991	7 339,54955	23,56	<,0001
Error	96	29 903,5623	311,49544		
Total	98	44 582,6614			

Anexo 8. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca en semen fresco, refrigerado y congelado para el dilutor Biladyl B. Ayacucho- 2020

Fuente	GL	SC	CM	F	Valor p
Tratamiento	2	15 174,4464	7 587,22321	24,97	<,0001
Error	96	29 168,5633	303,8392		
Total	98	44 343,0097			

Anexo 9. Anexo. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca Huacaya y Suri en semen descongelado para el dilutor Andromed®. Ayacucho-2020

Fuente	GL	SC	CM	F	Valor p
Tratamiento	1	610,224	610,224	1,36	0,2531
Error	31	13 949,8806	449,99615		
Total	32	14 560,1046			

Anexo 10. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca Huacaya y Suri en semen descongelado para el dilutor Biladyl B Ayacucho- 2020

Fuente	GL	SC	CM	F	Valor p
Tratamiento	1	505,12038	505,12038	0,83	0,369
Error	31	18 840,3752	18 840,3752		
Total	32	19 345,4956			

Anexo 11. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca Huacaya y Suri en semen refrigerado para el dilutor Andromed®. Ayacucho-2020.

Fuente	GL	SC	CM	F	Valor p
Tratamiento	1	369,726957	369,726957	1,55	0,2224
Error	30	7 142,96999	238,099		
Total	31	7 512,69695			

Anexo 12. Análisis de varianza de la integridad del acrosoma de alpaca Huacaya y suri en semen refrigerado para el dilutor Biladyl B Ayacucho- 2020.

Fuente	GL	SC	CM	F	Valor p
Tratamiento	1	367,213986	367,213986	1,82	0,874
Error	31	6 263,03922	202,033523		
Total	32	6 630,25321			

Anexo 13. Flujoograma de preparación del dilutor Andromed®. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2020



Extraer 2 ml de agua milliO



Extraer 500 ml de Andromed®



Homogenizar

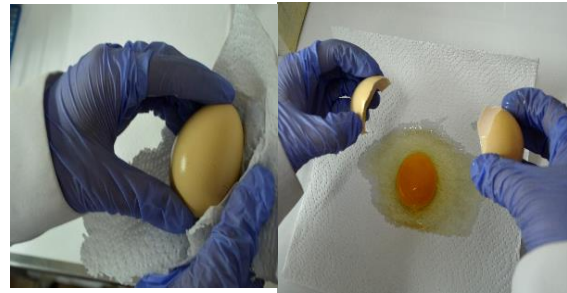


Acondicionar a 37 °C por 5 min.

Anexo 14. Flujograma de preparación del dilutor Biladyl B. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2020



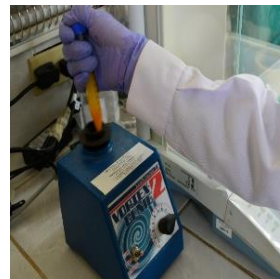
Extraer 6 ml de
dilutor Biladyl B



Desinfectar el huevo



Filtrar



Homogenizar



Aspirar 6 ml de
yema de huevo



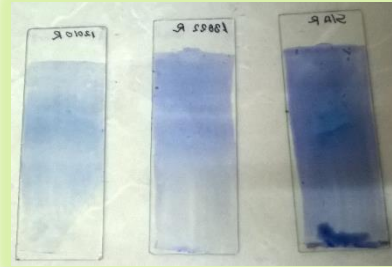
Anexo 15. Flujograma de colección de semen con vagina artificial acoplada a un maniquí. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2020



Anexo 16. Flujograma de evaluación de la integridad acrosomal mediante la triple tinción con azul de Tripán, rosa de bengala y marrón de Bismark Laboratorio de Biotecnología Reproductiva, INIA –Ayacucho. 2020



Homogenizar 50 μ l de muestra más 50 μ l de azul de Tripán al 3%



Incubar a 37° C por 15 min y realizar un frotis



Fijar con alcohol a 96° por 15 min, lavar y dejar secar a T° ambiente



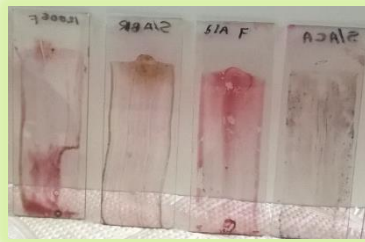
Sumergir en una solución de Marrón de Bismark al 3% a 45° C por 10 min



Lavar y dejar secar a T° ambiente



Sumergir en una solución de rosa de Bengala al 0.5%



Lavar y dejar secar a T° ambiente

Anexo 17. Matriz de consistencia

TÍTULO. Efecto de dos dilutores en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado. Ayacucho – 2019.

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Existirá efecto de alguno de los dilutores en la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca?	GENERAL. Evaluar el efecto de dos dilutores en la integridad acrosomal en semen fresco, refrigerado y descongelado de alpaca. ESPECÍFICOS. - Determinar la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca en semen fresco. - Determinar el efecto del dilutor Andromed® sobre la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca, en semen refrigerado y congelado. - Determinar el efecto del dilutor Biladyl B sobre la integridad acrosomal en espermatozoides de alpaca, en semen refrigerado y congelado. - Comparar el efecto de los dilutores en la integridad acrosomal de espermatozoides de alpacas Huacaya y Suri.	- Antecedentes - Alpaca - Importancia social y económica - Reproducción - El espermatozoide - Reacción acrosómica - Integridad acrosomal - Uso de dilutores y agentes crioprotectores - Factores que afectan la integridad acrosomal - Interacción del dilutor en condiciones de criopreservación	H₀: El efecto de los dilutores en la integridad acrosomal es igual en todas las muestras de espermatozoides de alpaca evaluados en semen refrigerado y congelado. H_a: El efecto de los dilutores en la integridad acrosomal es diferente en alguna de las muestras de espermatozoides de alpaca evaluados en semen refrigerado y congelado.	VARIABLE INDEPENDIENTE. Dilutores para semen refrigerado y congelado Indicadores - Dilutor Andromed en semen refrigerado y congelado - Dilutor Biladyl B en semen refrigerado y congelado VARIABLE DEPENDIENTE. Integridad acrosomal Indicadores - Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos con acrosoma reaccionado (VA, MA). - Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos con acrosoma reaccionado (VR, MR).	TIPO DE INVESTIGACIÓN. Básica - Experimental POBLACIÓN: Fue conformada por el total de espermatozoides presentes en las muestras seminales colectadas mediante la vagina artificial incorporada a un maniquí. MUESTRA: Fue conformada por 33 muestras de eyaculados de buena calidad. MUESTREO Muestreo probabilístico de tipo aleatorio.