

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



TESIS:

**Efecto de dos dilutores en la integridad de la membrana espermática
y del acrosoma en semen refrigerado y congelado de *Vicugna pacos*
“alpaca”. Ayacucho - 2021**

Para optar el título profesional de:

BIÓLOGA, ESPECIALIDAD: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. Corali ALARCON CRISANTE

ASESOR:

Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA

COASESOR:

Dr. Mijaíl CONTRERAS HUAMANÍ

AYACUCHO - PERÚ

2025

A Dios, a mi familia y a mi madre en el cielo.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, por ser la base de mi formación profesional.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela Profesional de Biología, en especial a la especialidad de Biotecnología, y al cuerpo docente que contribuyó a mi desarrollo profesional.

Al Mg. Mijaíl Contreras Huamani de la Estación Experimental Agraria “Canaán” del INIA, por facilitarme los recursos necesarios para llevar a cabo mi trabajo de tesis.

A mi asesor, Dr. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, por su valioso apoyo y orientación académica, lo que hizo posible la elaboración y culminación de este trabajo.

Al Mg. Reynán Cóndor Alarcón, docente de la Escuela Profesional de Biología, por su colaboración en el análisis estadístico de la tesis.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Marco conceptual	7
2.2.1. Estructura del espermatozoide de alpaca	7
2.2.2. Integridad del acrosoma	10
2.2.3. Integridad de la membrana espermática	11
2.2.4. Refrigeración del semen	12
2.2.5. Congelación del semen	13
2.2.6. Descongelación del semen	15
2.2.7. Función de los dilutores en la criopreservación del semen	15
2.2.8. Dilutores usados en la congelación del semen	16
2.2.9. Técnicas para la evaluación de la integridad acrosomal	17
2.2.10. Tinción triple con azul de Tripán, rojo neutro y solución de Giemsa	18
2.2.11. Técnicas para evaluación de la integridad de membrana espermática	18
2.2.12. Tinción de Hoechst 33342/Ioduro de propidio	18
III. MATERIALES Y METODOS	21
3.1. Ubicación de la zona de estudio	21
3.1.1. Ubicación política	21
3.1.2. Ubicación geográfica	21
3.2. Población y muestra	21
3.2.1. Población	21
3.2.2. Muestra	21
3.2.3. Sistema de muestreo	22
3.3. Metodología y recolección de datos	22
3.3.1. Armado de la vagina artificial	22
3.3.2. Análisis macroscópico y microscópico del semen	22

3.3.3. Refrigeración del semen	24
3.3.4. Congelación del semen	24
3.3.5. Descongelación	25
3.3.6. Evaluación del semen después del congelamiento	25
3.3.7. Evaluación de la integridad de la membrana espermática (Tinción fluorescente Hoechst 33342/PI)	25
3.3.8. Evaluación de la integridad acrosomal (tinción triple con azul de Tripán, rojo neutro y Giemsa)	26
3.4. Tipo de investigación	27
3.5. Análisis estadístico	27
IV. RESULTADOS	28
V. DISCUSIÓN	44
VI. CONCLUSIONES	50
VII. RECOMENDACIONES	52
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	58

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Valores promedio y desviación típica de la integridad de la membrana espermática con dilutor optixcel y triladyl en semen refrigerado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.	31
Tabla 2. Valores promedio y desviación típica de la integridad del acrosoma de con dilutor optixcel y triladyl en semen refrigerado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.	33
Tabla 3. Valores promedio y desviación típica de la integridad de la membrana espermática con dilutor optixcel y triladyl en semen congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.	35
Tabla 4. Valores promedio y desviación típica de la integridad del acrosoma con dilutor optixcel y triladyl en semen congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.	37
Tabla 5. Evaluación de la integridad de membrana espermática por color de semen en estado refrigerado y congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” usando dilutor Optixcell y Triladyl. INIA. Ayacucho 2021.	39
Tabla 6. Evaluación de la integridad del acrosoma por color de semen en estado refrigerado y congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” usando dilutor Optixcell y Triladyl. INIA. Ayacucho 2021.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de la cabeza de espermatozoide.	8
Figura 2. Estructuras del cuello en espermatozoide de mamífero.	9
Figura 3. Estructura del espermatozoide de mamífero.	10
Figura 4. Características de la muestra espermática sometida al proceso de Tinción Triple con Azul Tripán, Rojo Neutro y solución Giemsa.	18
Figura 5. Valores promedio sobre el Efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad de la membrana espermática en semen refrigerado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.	32
Figura 6. Valores promedio sobre Efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad del acrosoma en semen refrigerado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.	34
Figura 7. Valores promedio sobre el Efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad de la membrana espermática en semen congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.	36
Figura 8. Valores promedio sobre el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad del acrosoma en semen congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.	38
Figura 9. Integridad de la membrana espermática por color de semen en estado refrigerado y congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” usando dilutor Optixcell y Triladyl. INIA. Ayacucho 2021.	40
Figura 10. Integridad del acrosoma por color de semen en estado refrigerado y congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” usando dilutor Optixcell y Triladyl. INIA. Ayacucho 2021.	42
Figura 11. Espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” teñidos con la solución de triple tinción (azul de tripán, rojo neutro y Giemsa). INIA. Ayacucho 2021.	43
Figura 12. Espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” teñidos con el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI, analizados en el AndroVision sistema CASA. INIA. Ayacucho 2021.	44

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Registro total de datos de las características seminales y valores en porcentaje de la integridad acrosomal y de membrana plasmática de espermatozoides de seis machos reproductores de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” sometidos a diferentes momentos en el procesamiento de semen, en las diferentes fechas de evaluación. INIA. Ayacucho, 2021.	60
Anexo 2. Prueba de ANOVA del efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad de la membrana espermática en semen refrigerado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	61
Anexo 3. Prueba de ANOVA del efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad del acrosoma en semen refrigerado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	62
Anexo 4. Prueba ANOVA del efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad de la membrana espermática en semen congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	63
Anexo 5. Prueba de ANOVA del efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad del acrosoma en semen congelado de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	64
Anexo 6. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para % de viabilidad por tratamientos de integridad de la membrana espermática (IME) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	65
Anexo 7. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett's K-squared para % de viabilidad por tratamientos de integridad de la membrana espermática (IME) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	66
Anexo 8. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para % de viabilidad por tratamientos de integridad del acrosoma (IA) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	67
Anexo 9. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para % de viabilidad por tratamientos de integridad del acrosoma (IA) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	68

Anexo 10. Estadísticas descriptivas para porcentaje de integridad de la membrana espermática (IME) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	69
Anexo 11. Estadísticas descriptivas para porcentaje de integridad del acrosoma (IA) de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	70
Anexo 12. Armado de la vagina artificial antes de envolver con las frasadillas para la colecta de semen de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	71
Anexo 13. Armado total de la vagina artificial y recolección de semen de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	72
Anexo 14. Procesamiento de muestras de semen de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” para su evaluación de integridad del acrosoma y membrana espermática. INIA. Ayacucho, 2021.	73
Anexo 15. Registro de las muestras de semen de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” para su evaluación macroscópica”. INIA. Ayacucho, 2021.	74
Anexo 16. Observación microscópica de espermatozoides vivos y muertos con y sin acrosoma de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca”, utilizando la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa. INIA. Ayacucho, 2021.	75
Anexo 17. Equipo de AndroVision (Sistema CASA) para la evaluación de la integridad de membrana espermática y observación microscópica de espermatozoides con membrana intacta y dañada de <i>Vicugna pacos</i> “alpaca” usando el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI. INIA. Ayacucho, 2021.	76
Anexo 18. Composición del dilutor Optixcell usado en semen refrigerado y congelado para la preservación de los espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “Alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	77
Anexo 19. Composición del dilutor Triladyl usado en semen refrigerado y congelado para la preservación de los espermatozoides de <i>Vicugna pacos</i> “Alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.	78
Anexo 20. Matriz de consistencia Ayacucho.2021.	79

RESUMEN

El estudio se centró en analizar el impacto de dos dilutores sobre la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen refrigerado y congelado de *Vicugna pacos*, "alpaca". Estos aspectos son fundamentales para la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides, especialmente durante los procesos de refrigeración y congelación del semen. El objetivo fue proporcionar información valiosa para optimizar las técnicas de conservación del semen de alpaca, lo que podría ser crucial para la reproducción y conservación de esta especie. La investigación evaluó el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad de la membrana y del acrosoma de los espermatozoides, utilizando la triple tinción: azul de tripán, rojo neutro y Giemsa, así como la tinción fluorescente de Hoechst 33342/PI. Se trabajó con semen de alpaca ($n=6$) recolectado con una vagina artificial ($r=3$), analizando parámetros como volumen, color, concentración, viabilidad y motilidad. Para evaluar la integridad del acrosoma, se aplicó el método de triple tinción, y para la membrana espermática, se utilizó el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI, analizado con el software AndroVision (Sistema CASA). Los resultados mostraron que el porcentaje promedio de integridad de la membrana espermática con el dilutor Optixcell en semen refrigerado fue del 61,11%, mientras que con Triladyl fue del 55,06%, con diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$). En cuanto a la integridad del acrosoma, con Optixcell se obtuvo un 36,61% y con Triladyl un 32,78%, también con diferencias significativas ($p<0,05$). En semen congelado, la integridad de la membrana espermática fue del 45,33% para Optixcell y del 38,89% para Triladyl, mostrando diferencias significativas ($p<0,05$). La integridad del acrosoma en semen congelado fue del 28,89% con Optixcell y del 25,28% con Triladyl, igualmente con diferencias significativas ($p<0,05$).

En semen fresco, la viabilidad espermática observada fue del 61% en un color semilechoso. En semen refrigerado, con Optixcell se registró un 72,3% (color transparente) y con Triladyl un 69%. Para el semen congelado, ambos dilutores mostraron un 58,3% con Optixcell y un 51,7% con Triladyl. La viabilidad del acrosoma en semen refrigerado con Optixcell fue del 40,7% y con Triladyl del 39,7%, sin diferencias significativas. En semen congelado, se obtuvieron 36% con Optixcell y 30,7% con Triladyl, ambos de color transparente. Los mejores resultados en la integridad de la membrana espermática y del acrosoma se observaron en semen refrigerado con el dilutor Optixcell. Los espermatozoides vivos con acrosoma intacto mostraron una zona acrosomal de color fucsia y una postacrosomal blanquecina. Los espermatozoides con membrana intacta aparecieron en azul, mientras que los dañados fueron rojos.

En conclusión, la integridad del acrosoma y de la membrana espermática presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos etapas de conservación del semen. Además, la motilidad espermática fue estadísticamente igual en semen fresco y refrigerado, pero diferente en semen congelado.

Palabras clave: integridad del acrosoma, integridad de membrana, *Vicugna pacos*, dilutores, semen refrigerado, semen congelado.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de semen refrigerado y congelado en procedimientos de inseminación artificial y fertilización in vitro ha crecido en diversas especies de animales de producción. En varios estudios realizados en nuestra región sobre el manejo y conservación de espermatozoides en alpacas, se han utilizado parámetros de referencia limitados. No obstante, existen técnicas especializadas que permiten evaluar el potencial reproductivo de una muestra de semen. En este sentido, analizar la integridad funcional y estructural de la membrana del espermatozoide, así como la del acrosoma, puede ofrecer información valiosa sobre su funcionalidad. (Abdel et al., 2019). La integridad de estas membranas indica la salud de los espermatozoides. Los métodos de enfriamiento y criopreservación pueden perjudicar estas membranas, causando inflamación, rupturas, variaciones en la fluidez, modificaciones en el flujo de calcio y variaciones en la actividad enzimática, lo que podría llevar a una capacitación prematura de los espermatozoides y afectar su capacidad de fertilización. (Aisen, 2004). Durante la criopreservación, los espermatozoides a menudo sufren daños en sus membranas espermática y acrosomal, lo que disminuye la cantidad de células viables y acorta su permanencia en el tracto reproductivo femenino, reduciendo así sus posibilidades de fertilizar el óvulo. El acrosoma se compone de tres regiones diferentes: la zona acrosomal, que abarca el borde apical; la zona post acrosomal; y el segmento ecuatorial que las separa. Estas zonas son susceptibles a daños durante los procesos de refrigeración, congelación y descongelación. Las muestras de semen que muestran un alto nivel de alteraciones en el acrosoma generalmente tienen una fertilidad inferior. Adicionalmente, la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide es crucial para la fertilidad, ya que cualquier daño puede afectar su permeabilidad, lo que impacta funciones metabólicas, motilidad y la capacidad de fecundación. Es crucial evaluar con

precisión el estado de las membranas espermáticas y acrosomales para determinar el potencial reproductivo de los espermatozoides de alpaca. Por lo tanto, es indispensable que los métodos, pruebas y tinciones utilizados para comprobar la integridad de estas membranas sean fiables, como el empleo de los fluorocromos Hoechst 33342/PI para la membrana y la triple tinción con azul de tripán, rojo neutro y Giemsa para la evaluación acrosomal. En base a lo anterior, se diseñó esta investigación con los siguientes objetivos:

Objetivo general

Evaluar el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen de alpaca refrigerado y congelado.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen refrigerado.
2. Evaluar el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen congelado.
3. Evaluar la integridad de membrana y acrosoma por color de semen en estado refrigerado y congelado usando dilutor Optixcell y Triladyl.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Se examinaron los parámetros cinéticos de los espermatozoides en semen fresco y crioconservado mediante el uso de diluidores y el sistema CASA. Para esto, se entrenaron a tres machos de alpaca durante un mes para la recolección de semen mediante una vagina artificial. El semen se congeló usando dos diluyentes: uno comercial (AndroMed) y otro que incluía AndroMed, ácido cítrico, gentamicina y glicerol. Las características del semen fueron las siguientes: volumen de $1,5 \pm 0,7$ mL, viscosidad de $5,9 \pm 1,5$, pH de 7,1 (tendencia a ser alcalino) y color blanco translúcido. En el semen fresco, los promedios de los parámetros cinéticos fueron: velocidad curvilínea (VCL) de $25,8 \pm 4,2 \mu\text{m/s}$, velocidad lineal (VSL) de $10,3 \pm 2,5 \mu\text{m/s}$ y velocidad media (VAP) de $18,9 \pm 3,2 \mu\text{m/s}$. En el semen crioconservado, con el dilutor 2, se obtuvieron las siguientes velocidades: VCL de $8,4 \pm 1,4 \mu\text{m/s}$; con el dilutor 1, VCL de $7,2 \pm 1,2 \mu\text{m/s}$. Los valores de vida estadística fueron $3,4 \pm 0,8 \mu\text{m/s}$ para el dilutor 2 y $2,9 \pm 0,7 \mu\text{m/s}$ para el dilutor 1. En cuanto a la VAP, se registró $5,8 \pm 1,0 \mu\text{m/s}$ para el dilutor 2 y $4,8 \pm 0,8 \mu\text{m/s}$ para el dilutor 1. Así, se concluyó que el dilutor 2 (AndroMed + ácido cítrico + gentamicina + glicerol) es una alternativa viable para la crioconservación del semen de alpaca (Apaza-Callisaya et al., 2020).

En un análisis centrado en el desarrollo y evaluación de un método para conservar semen de alpaca en un medio sólido, se llevaron a cabo tres experimentos diferentes. Los resultados mostraron que el medio PureSperm 80 fue efectivo, logrando una tasa de recuperación de espermatozoides del 98,46%, con una ligera disminución en la motilidad (3,45%) y en la integridad funcional de la membrana plasmática (5,75%). Al refrigerar el semen a 5 °C, tanto en líquido como en sólido, durante 48 horas tras la centrifugación en PureSperm 80, se observaron tasas de motilidad del 41,20% y 52,06%, y una integridad funcional de la

membrana espermática del 49,84% y 64,90%. Además, se confirmó la capacidad gestacional del semen en estado líquido refrigerado. (Gómez, 2020).

Un estudio comparó la eficiencia de los dilutores comerciales basados en Tris sin yema de huevo (AndroMed, Optixcell) y complementados con yema de huevo (Triladyl, Steridyl) para la criopreservación de semen en siete camellos dromedarios adultos. En la evaluación previa a la congelación, la motilidad progresiva de los espermatozoides fue mayor en las muestras diluidas con SHOTOR (dilutor específico para camellos) Además, Triladyl y SHOTOR este último que se usó solo como control dieron resultados una vitalidad de los espermatozoides e integridad del ADN mejor que todos los demás diluyentes, pero Triladyl dio como resultado una integridad de la membrana plasmática significativamente mejor ($87,77 \pm 0,31$) que SHOTOR ($85,48 \pm 0,58$). En la evaluación posterior a la descongelación, Triladyl condujo a una motilidad espermática significativamente mayor ($38,63 \pm 0,81\%$) en comparación con SHOTOR, Steridyl o AndroMed ($35,09 \pm 1,341 \%$, $34,4 \pm 0,84 \%$ y $31,99 \pm 1,48 \%$, respectivamente), siendo Optixcell el menos eficiente ($28,39 \pm 0,86\%$). La motilidad progresiva de los espermatozoides fue la más alta cuando se utilizó Triladyl. Las velocidades de los espermatozoides curvilíneas, en línea recta y de trayectoria media después de la descongelación fueron más altas con Triladyl y más bajas con AndroMed. Triladyl condujo al mayor coeficiente de linealidad y al coeficiente de rectitud de los espermatozoides, mientras que SHOTOR a la mayor integridad del ADN y la membrana plasmática. Optixcell y AndroMed dieron como resultado una vitalidad deficiente de los espermatozoides después de la descongelación, mientras que Steridyl fue menos eficiente que Triladyl. En conclusión, SHOTOR, Triladyl, Steridyl, AndroMed y Optixcell pueden utilizarse para la criopreservación de semen del camello; sin embargo, SHOTOR y Triladyl proporcionaron la mejor calidad de esperma después de la descongelación. Por lo tanto, en la investigación Triladyl es el mejor diluyente disponible comercialmente para la criopreservación de semen de camello y semen de dromedario hasta la fecha (Abdel et al., 2019).

Un estudio consistió en evaluar el efecto de un dilutor a base de liposomas (Optixcell) y un dilutor de yema de huevo tris-cítrico (Triladyl) sobre las características de los espermatozoides congelados-descongelados y la tasa de partos. Los porcentajes totales de los espermatozoides motiles congelados-descongelados fueron similares en los grupos Optixcell y Triladyl. Sin embargo, la

integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides congelados-descongelados para el grupo Optixcell fue significativamente más altos que los del grupo Triladyl. Además, la tasa de partos en el grupo Optixcell (79,0 %) fue mayor que la del grupo Triladyl (62,8 %). Asimismo, la integridad de la membrana acrosómica de los espermatozoides congelados-descongelados en los grupos Optixcell y Triladyl no fue significativamente diferente. Sus resultados indicaron que la congelación del semen con Optixcell mejoró la motilidad y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides congelados y descongelados de las vacas Hanwoo siendo la congelación de semen con el dilutor Optixcell basado en liposomas más eficiente que el extensor de yema de huevo tris-cítrico Triladyl (Kang et al., 2019).

Un estudio adicional reveló que, al examinar el estado acrosomal de los espermatozoides de llama (*Lama glama*), se evaluó la integridad del acrosoma utilizando dos métodos de microscopía de campo claro: la tinción con azul de Coomassie y una triple tinción que combinaba azul de tripán, rojo neutro y Giemsa. La técnica de azul de Coomassie se aplicó a varias muestras de semen, que incluían semen fresco, semen incubado con colagenasa, semen refrigerado y semen congelado/descongelado. Con la triple tinción, se identificaron los siguientes patrones: espermatozoides vivos con membranas intactas y acrosoma sano (zona post-acrosomal de color celeste o azul claro, y acrosoma púrpura); espermatozoides vivos con un acrosoma dañado (zona post-acrosomal celeste o azul claro y acrosoma de color lavanda); espermatozoides muertos con acrosoma íntegro (zona post-acrosomal azul oscuro y acrosoma púrpura); y espermatozoides muertos con acrosoma dañado (zona post-acrosomal azul oscuro y acrosoma violeta). Además, la integridad del acrosoma fue evaluada a través de microscopía de fluorescencia, lo que permitió identificar diferentes poblaciones celulares: espermatozoides viables con membrana acrosomal intacta, espermatozoides viables con membrana dañada y espermatozoides muertos en ambas situaciones. (Carretero et al., 2015).

Un estudio titulado "Impacto del plasma seminal de toro (*Bos taurus*) en la viabilidad de espermatozoides criopreservados de alpacas (*Vicugna pacos*)" examinó la motilidad de los espermatozoides en muestras de semen fresco, refrigerado y congelado. La recolección a 37 °C mostró una motilidad del 43,98 % utilizando un diluyente de tris con yema de huevo. Sin embargo, al refrigerar las muestras a 5 °C, la motilidad disminuyó al 33,24 %, y tras el proceso de

descongelación se registró un 14,46 % con el mismo diluyente. En cuanto a la integridad de la membrana, evaluada mediante la prueba HOST, se observó un 46,63 % a 37 °C, un 33,51 % a 5 °C y, tras la descongelación, solo un 21,54 % utilizando el diluyente de tris yema de huevo. (Calderón, 2015).

Un estudio examinó cómo distintos dilutores y razas influyen en la integridad de las membranas espermáticas y acrosomales en semen crioconservado de carneros. La investigación se centró en tres razas: Criollo, Corriedale y Texel, y empleó tres dilutores diferentes (Tris, agua de coco y leche UHT) para evaluar su efecto durante los procesos de refrigeración a 5 °C y posterior descongelación. La evaluación de la integridad de la membrana espermática se llevó a cabo mediante la prueba de endosmosis, mientras que la tinción triple se empleó para el acrosoma. Los hallazgos indicaron que la integridad de la membrana después de la refrigeración y la descongelación para cada dilutor fue del 67,33 %, 49,93 % y 46,93 % en refrigeración, y del 34,47 %, 24,73 % y 20,93 % en descongelación, respectivamente. En lo que respecta al acrosoma en semen refrigerado y descongelado, los porcentajes fueron 50,60 %, 44,27 % y 48,93 % para refrigeración, y 24,33 %, 24,0 % y 28,20 % para descongelación. (Calderón, 2015). Una investigación sobre la viabilidad y el estado acrosomal de los espermatozoides de llama llevó a cabo una evaluación de la integridad del acrosoma y la viabilidad celular mediante una tinción triple que incluía azul de tripán, rojo neutro, ácido clorhídrico y Giemsa. Se identificaron cuatro categorías de espermatozoides: aquellos que eran vivos, con membranas intactas y acrosoma íntegro (la zona postacrosomal se presenta en color celeste o azul claro y el acrosoma en púrpura); espermatozoides vivos con acrosoma dañado (zona postacrosomal celeste y acrosoma en lavanda); espermatozoides muertos con acrosoma íntegro (zona postacrosomal azul oscuro y acrosoma púrpura); y espermatozoides muertos con acrosoma dañado (zona postacrosomal azul oscuro y acrosoma violeta). (Vargas, 2015; Fumuso et al., 2015).

En una investigación sobre cómo afectan dos tipos de dilutores y dos procedimientos de congelación a la viabilidad de los espermatozoides epididimarios de alpaca, se recolectaron espermatozoides del epidídimo, los cuales se diluyeron con dilutores de Tris-yema-glicerol y Bioxcell. Estos espermatozoides fueron congelados utilizando un método de congelación lenta en pajillas y un método rápido en pellets. La viabilidad se evaluó a través de porcentajes de motilidad, células vivas e integridad de la membrana. Se observó

que el dilutor Bioxcell logró mantener porcentajes más altos de motilidad y células vivas después de la descongelación (33,34 % y 38 %) en comparación con el Tris-yema-glicerol (24,53 % y 32,02 %). (Moina, 2014).

Este estudio analizó el impacto de la adición de L-cisteína al dilutor Tes-Tris-yema en la calidad de los espermatozoides de alpaca después de su descongelación. Se recolectaron dieciséis muestras de espermatozoides epididimarios en el Camal Municipal de Huancavelica, que fueron diluidas en el dilutor mencionado y subdivididas en cuatro alícuotas con distintas concentraciones de L-cisteína: 0 mM (control), 2,5 mM, 5 mM y 10 mM. Se evaluó la integridad de las membranas plasmática y acrosómica después del proceso de descongelación. Los resultados indicaron que la inclusión de 2,5 mM de L-cisteína mejoró de manera significativa la motilidad y la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides en comparación con los otros tratamientos y el grupo de control. Se concluye que la incorporación de L-cisteína a concentraciones bajas (2,5 mM) proporciona un efecto protector en los parámetros espermáticos tras la descongelación en alpacas. (Suárez, 2014).

2.2. Marco conceptual

2.2.1. Estructura del espermatozoide de alpaca

El espermatozoide de los mamíferos está compuesto por tres partes fundamentales: la cabeza, el cuello y el flagelo. El flagelo se divide a su vez en tres secciones: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. La función principal del espermatozoide es transportar la información genética del padre hacia el óvulo. Es importante destacar que el espermatozoide posee un núcleo altamente condensado, lo que permite una eficiente compactación del material genético. Además, su membrana plasmática es particularmente sensible a cambios en la temperatura y en la osmolaridad del medio en el que se encuentra, lo que puede influir en su viabilidad y funcionalidad. (Hafez, 2000).

2.2.1.1. Cabeza espermática

La parte superior del espermatozoide, conocida como la cabeza, presenta una forma aplanada y está formada por varias estructuras clave: el núcleo, el acrosoma, componentes del citoesqueleto y una pequeña cantidad de citoplasma. El núcleo contiene una cromatina altamente compactada, lo que permite una eficiente disposición del material genético para la fecundación. (Hafez, 2000).. La

cromatina se organiza mediante proteínas particulares conocidas como protaminas, las cuales se unen entre sí a través de enlaces disulfuro. (Hafez, 2000).

El acrosoma se localiza en la parte anterior del núcleo y es una vesícula especializada que contiene enzimas hidrolíticas fundamentales para superar la zona pelúcida del ovocito durante la fertilización. Este orgánulo se desarrolla durante la espermatogénesis a partir del complejo de Golgi en las células espermáticas. En él, se pueden identificar dos membranas: la membrana acrosomal interna y la membrana acrosomal externa, que está adyacente a la membrana plasmática. Durante la reacción acrosómica, ambas membranas se fusionan, lo que posibilita la liberación de su contenido al exterior. Este contenido consiste principalmente en enzimas hidrolíticas, como la acrosina y la hialuronidasa, que son imprescindibles para descomponer las capas que rodean al ovocito. (Hafez, 2000).

La acrosina, presente en el acrosoma como proacrosina, se activa durante la reacción acrosómica. Esta proteína es distinta de otras enzimas similares en diferentes tejidos debido a su peso molecular y sustrato, lo que sugiere que es una isoenzima exclusiva del espermatozoide. Por otro lado, la hialuronidasa, que actúa como una glicosidasa, también parece ser específica del espermatozoide, ya que se diferencia de la hialuronidasa lisosomal habitual en las células somáticas. (Hafez, 2000).

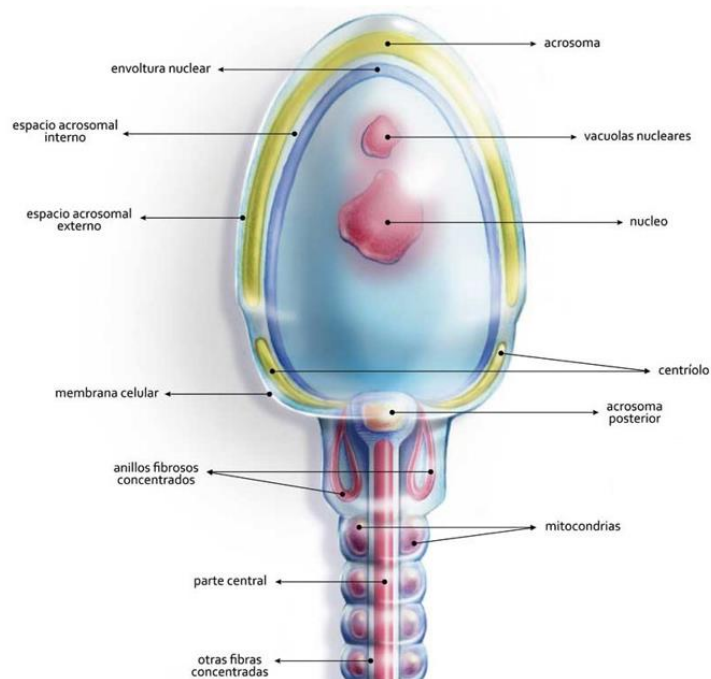


Figura 1. Estructura de la cabeza de espermatozoide (Davies, 1999).

Los daños en la membrana plasmática o en el acrosoma son irreparables y pueden resultar de diferentes factores, como la ósmosis, cambios de temperatura o variaciones en el pH. Estas condiciones pueden provocar la liberación anticipada del contenido del acrosoma. El segmento ecuatorial es una hendidura en la membrana plasmática del espermatozoide que se ubica en el centro de la cabeza y cuya interacción con la membrana plasmática del ovocito es crucial para el proceso de fecundación. (Hafez, 2000).

2.2.1.2. El cuello del espermatozoide

El cuello del espermatozoide es la estructura que conecta la cabeza con la pieza intermedia. Esta región está formada por el capítulo, mitocondrias, un centriolo proximal y varias columnas laminadas. Estas características estructurales aportan al espermatozoide una notable flexibilidad, lo que permite un movimiento lateral eficiente durante la acción del flagelo. La disposición de las mitocondrias en el cuello también es fundamental, ya que proporciona la energía necesaria para el movimiento, permitiendo que el espermatozoide navegue eficazmente hacia el ovocito. Estas estructuras se organizan en torno al centriolo, que es el punto de origen de las fibras y microtúbulos de la cola, además de desempeñar un papel como centro organizador en la formación del axonema y las columnas estriadas. Sin embargo, la presencia del centriolo no es esencial para comenzar o propagar el movimiento ondulatorio de la cola. (Hafez, 2000).

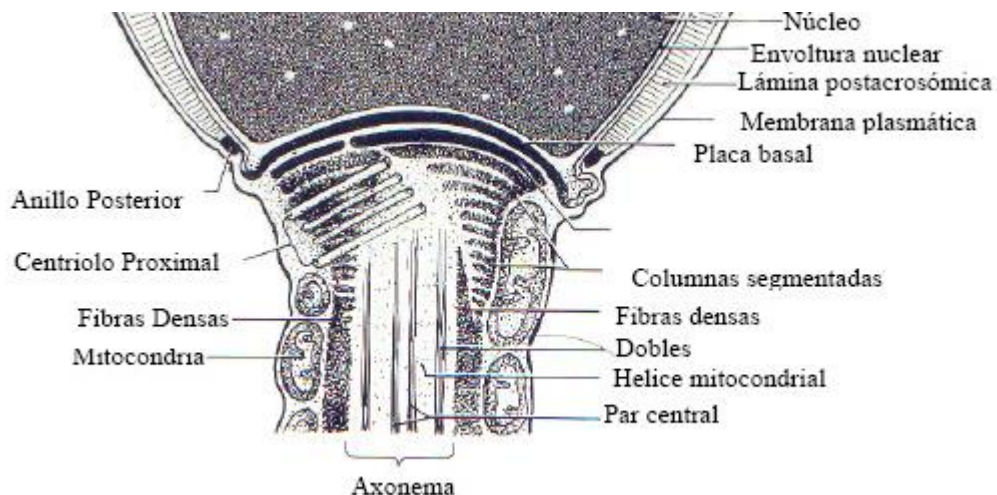


Figura 2. Estructuras del cuello en espermatozoide de mamífero (Rota et al., 2011).

2.2.1.3. El flagelo del espermatozoide.

El flagelo tiene la función de facilitar el movimiento y se compone de tres secciones: la pieza intermedia, la pieza principal y la pieza terminal. Su elemento fundamental es el "axonema", que se encarga de producir el movimiento. El

axonema se estructura a partir de varios microtúbulos dispuestos en pares, que incluyen un microtúbulo central y nueve más en disposición periférica. (Rota et al., 2011).

La pieza intermedia se distingue por su estructura de doble hélice formada por mitocondrias. Estas organelas son fundamentales para el metabolismo energético y desempeñan un papel en la regulación de la muerte celular. Además, estudios recientes han demostrado que son la fuente principal de especies reactivas de oxígeno dentro de la célula. Las mitocondrias se disponen en torno a nueve pares de fibras longitudinales llamadas "fibras densas", que rodean el axonema. La pieza intermedia culmina en el anulus, donde se lleva a cabo la condensación de la membrana plasmática. (Rota et al., 2011).

La pieza principal constituye la parte más elongada de la cola. Está formada por nueve fibras densas y el axonema, que se extienden desde la zona intermedia. A medida que avanzan, las fibras van disminuyendo progresivamente de tamaño hasta desvanecerse al final de la pieza principal. (Rota, 2011).

La porción final de la cola se denomina pieza terminal, y está compuesta por el axonema, careciendo de vaina fibrosa. (Rota et al., 2011).

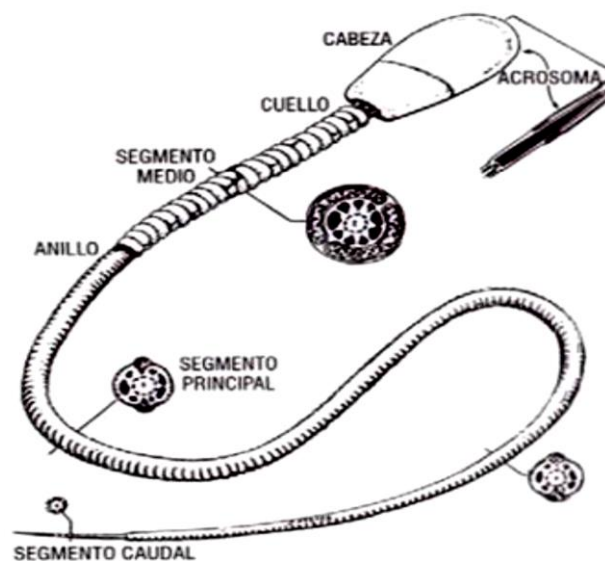


Figura 3. Estructura del espermatozoide de mamífero (Hidalgo et al., 2015).

2.2.2. Integridad del acrosoma

El análisis de este aspecto del espermatozoide es esencial, ya que está vinculado directamente con la fecundación de los ovocitos. Este estudio es particularmente relevante en el caso de los espermatozoides criopreservados, ya que su mayor permeabilidad al calcio debido a las bajas temperaturas puede inducir reacciones

capacitantes anticipadas, lo que reduce su capacidad fecundante. (Calderón, 2015).

La preservación de la integridad de la membrana plasmática y membrana acrosomal es esencial para el buen funcionamiento de los espermatozoides. Este factor se vuelve aún más significativo, ya que, después de los procesos de refrigeración y congelación profunda, se ha notado que los espermatozoides de varias especies experimentan cambios similares a los que ocurren durante la capacitación, fenómeno denominado "criocapacitación". (Calderón, 2015).

Se han creado diferentes métodos para analizar el estado del acrosoma y su posible pérdida, siendo especialmente notable la técnica de triple tinción, que emplea colorantes como rosa de bengala, azul tripán y pardo Bismark (Capcha, 2016).

La capacidad de la membrana acrosomal para reaccionar es fundamental para la fertilización. Solo los espermatozoides que realizan la reacción acrosomal de forma sincronizada con la penetración del oocito pueden atravesar la zona pelúcida y fusionarse con el ovocito, lo que da lugar a un embrión. Además, investigaciones en espermatozoides de ratón han demostrado que únicamente aquellos que conservan el acrosoma en buen estado son capaces de unirse a la membrana pelúcida. Sin embargo, algunas células espermáticas pueden experimentar la reacción acrosomal de manera espontánea, y varios estudios sugieren que son necesarias moléculas específicas asociadas al ovocito para inducir esta reacción espontánea. (Hidalgo et al., 2005).

El método óptimo para evaluar el estado acrosomal debe ser exacto, eficiente y no afectar la funcionalidad de los espermatozoides. También debe ser adecuado para su uso en diversos medios y fluidos, y ser capaz de distinguir entre las reacciones acrosómicas falsas, que indican muerte celular, y las verdaderas, que están vinculadas al proceso de fecundación. (Hidalgo et al., 2005).

2.2.3. Integridad de la membrana espermática

El espermatozoide está totalmente envuelto por la membrana plasmática, que se expande en algunas áreas para formar la capa externa del espermatozoide. Esta membrana permanece intacta, a menos que se trate de la región del acrosoma antes de la fertilización o como consecuencia de la muerte del espermatozoide. (Davies, 1999).

Desde una perspectiva estructural, la membrana se compone de tres capas: la bicapa lipídica, la interfase entre los fosfolípidos y el agua, y la glicocálix. La bicapa

lipídica está formada por fosfolípidos polares dispuestos de tal forma que las cabezas hidrofílicas están orientadas hacia el exterior, mientras que las cadenas de ácidos grasos se encuentran en el interior. Los lípidos que predominan son los fosfolípidos y el colesterol, y su proporción es fundamental para regular la fluidez de la membrana. En términos generales, un mayor contenido de fosfolípidos aumenta la fluidez, mientras que el colesterol, junto con las proteínas integrales, actúa como estabilizador, promoviendo una disposición laminar de los fosfolípidos. Se ha notado que la concentración de colesterol varía en distintas zonas de la membrana plasmática, siendo más alta en la región del acrosoma. (Davies, 1999).

La glicocálix es una externa capa compuesta por polisacáridos que recubre el espermatozoide de alpaca. Si bien su función precisa aún no se comprende del todo, se piensa que está involucrada en la capacidad antigénica, la adhesión celular y la permeabilidad selectiva. En su interior, la glicocálix contiene enlaces para proteínas periféricas que provienen del plasma seminal, las cuales ayudan a estabilizar al espermatozoide durante su paso por los sistemas reproductivos masculino y femenino. (Davies, 1999).

La integridad de las membranas espermáticas es vital para su metabolismo y funciones, tales como la adherencia a la zona pelúcida, la penetración y la fusión con el oolema en la fecundación. El grado de daño en las membranas plasmática y acrosomal se asocia con la fertilidad de la muestra evaluada, especialmente cuando el daño es considerable. (Rota et al., 2011).

Conservar la integridad de la membrana es fundamental para que el espermatozoide pueda moverse. Si la membrana plasmática está dañada, el espermatozoide no puede regular correctamente las concentraciones de iones y cofactores esenciales, como el nucleótido adenina, que es vital para el movimiento del flagelo. Hay algunas células que, aunque no se mueven, parecen conservar un cierto nivel de integridad en la membrana y son capaces de impedir la entrada de marcadores de muerte celular, a pesar de que otras alteraciones las limitan en su capacidad de movimiento. (Leeuw et al., 1991).

El test de endósmosis (HOST) se fundamenta en los cambios que se producen en la cola de los espermatozoides, específicamente en su hinchamiento, cuando son incubados brevemente en un medio hipoosmótico, lo que genera alteraciones visibles en la estructura de la cola. (Manosalva et al., 2005). La inflamación de los espermatozoides en un medio hiposmótico se evidencia en la curvatura de la cola. Este fenómeno solo sucede en las células que conservan su membrana

plasmática intacta, ya que el flujo de agua genera la expansión de las membranas. (Manosalva et al., 2005).

2.2.4. Refrigeración del semen

La refrigeración a temperaturas de 4 o 5 °C puede mantener el semen durante varias horas, mientras que la congelación permite conservar los espermatozoides por muchos años (Manosalva et al., 2005). El propósito de enfriar el semen es disminuir el metabolismo energético de los espermatozoides, lo que ayuda a prolongar su viabilidad y su capacidad para fecundar. Sin embargo, el semen de los mamíferos es susceptible al enfriamiento brusco (shock frío), lo que puede provocar un aumento en el número de espermatozoides muertos, alteraciones en la distribución de lípidos en la membrana y un aumento de calcio en el interior de las células. (Aisen, 2004).

Para la conservación in vitro del semen, es fundamental centrarse en un enfriamiento gradual. La temperatura debe disminuir a 15 °C y 5 °C de manera progresiva, en un lapso de 1 a 1.5 horas y de 2 a 3 horas, respectivamente. La técnica más utilizada para mantener el semen en estado líquido por más de 24 horas consiste en reducir gradualmente la temperatura. La motilidad de los espermatozoides se detiene a 5 °C, pero puede recuperarse si la temperatura se restablece a niveles normales, siempre que no haya sufrido daños estructurales debido al choque térmico. Es crucial proteger las células contra las bajas temperaturas añadiendo compuestos orgánicos, como leche descremada o yema de huevo, que aumentan la resistencia de la membrana a cambios en su permeabilidad y previenen la acumulación de calcio en los espermatozoides al modificar el sistema de intercambio iónico de la membrana. (Calle, 2020).

Conservar el semen a 5 °C puede generar efectos perjudiciales, como una disminución del 40 % en la actividad metabólica del Na⁺/K⁺ en el interior de las células, lo que afecta el transporte de iones a través de la membrana celular y reduce la viabilidad de los espermatozoides. (Calle, 2020).

2.2.5. Congelación del semen

Para beneficiarse de los beneficios de la inseminación artificial (IA), es fundamental almacenar el semen a largo plazo, lo que se consigue a través de la congelación. Este procedimiento detiene los metabolismos de los espermatozoides y permite su conservación indefinida sin una pérdida considerable de fertilidad. (Vargas, 2015).

El éxito en la criopreservación está influenciado por múltiples factores, incluyendo las interacciones entre los crioprotectores, el tipo de diluyente utilizado, las tasas

de enfriamiento y descongelación, así como el método de embalaje. Además, también deben considerarse las diferencias individuales entre los animales. Es normal que se produzca cierta pérdida de viabilidad en los espermatozoides tanto antes como durante el proceso de congelación. (Vargas, 2015).

Los reportes acerca del uso exitoso de semen criopreservado muestran una gran variabilidad, en gran parte debido a la falta de estandarización en los métodos experimentales en numerosos estudios sobre reproducción. La información relacionada con la tasa de concepción por inseminación, el momento de la inseminación, la cantidad de espermatozoides empleados, el volumen de la inseminación y el tipo de diluyente sigue siendo limitada. (Vargas, 2015).

Para que la criopreservación sea exitosa, los espermatozoides deben conservar su capacidad de fertilización tras la descongelación. Esto implica que deben ser capaces de generar energía a través del metabolismo, mantener la estructura e integridad de su membrana plasmática, y preservar tanto su motilidad como la actividad de enzimas esenciales, como la acrosina en el acrosoma, fundamentales para la fecundación del óvulo. Cualquier alteración en estas funciones puede comprometer significativamente su capacidad fertilizadora de los espermatozoides. Uno de los mayores desafíos en este proceso es prevenir la formación de cristales de hielo y el movimiento de agua provocado por los gradientes osmóticos durante la criopreservación. (Vargas, 2015).

A lo largo del proceso de congelación, la muestra de semen sufre varios cambios biofísicos. Cuando la temperatura baja por debajo del punto de congelación, la muestra se encuentra en un estado de sobreenfriamiento. A medida que la temperatura sigue disminuyendo, comienzan a desarrollarse cristales de hielo en el medio que rodea la muestra. Esta cristalización provoca un aumento en la concentración de solutos, como azúcares, sales y proteínas. Debido al gradiente osmótico y al hecho de que el agua dentro de los espermatozoides congela más lentamente que la del medio externo, el agua se desplaza hacia afuera, causando la deshidratación de las células espermáticas. La rapidez con la que se pierde el agua también está relacionada con la velocidad de descenso de la temperatura; un enfriamiento más gradual permite que el agua salga más lentamente, lo que a su vez incrementa la deshidratación y disminuye la probabilidad de que se formen cristales de hielo en el interior del espermatozoide, los cuales pueden ocasionar daños físicos significativos. (Vargas, 2015).

La criopreservación busca alcanzar una velocidad de enfriamiento óptima que permita equilibrar los distintos factores involucrados (Vargas, 2015). Durante el

proceso de congelación, existen dos intervalos de temperatura críticos que afectan a los espermatozoides: la fase de sobre enfriamiento (0-5 °C) y la formación de cristales de hielo (6 °C a -15 °C). Usualmente, las pajillas de semen se congelan con vapor de nitrógeno y se almacenan a -196 °C. Un enfriamiento excesivamente rápido puede provocar choque térmico y la generación de cristales de hielo dentro de las células, mientras que una congelación demasiado lenta aumenta la concentración de sales conforme el agua se congela. Este incremento en la presión osmótica, si se prolonga, puede afectar las proteínas y lipoproteínas de las células espermáticas y el acrosoma. Por ello, la velocidad de congelación es un aspecto clave en la determinación del ritmo óptimo del proceso. (Manosalva et al., 2005).

2.2.6. Descongelación del semen

Es importante recordar que los contenedores de nitrógeno líquido actúan como termos y deben ser manipulados con cuidado. Aunque suelen estar fabricados de acero inoxidable o aluminio, un impacto o caída puede afectar la soldadura y romper el vacío, lo que resultaría en una pérdida rápida de nitrógeno. En caso de que el recipiente sufra daños, debe ser sustituido. Además, al descongelar los espermatozoides, es esencial tomar medidas para evitar su muerte. Las temperaturas más altas, como 37 °C, suelen ser más efectivas para las pajillas, aunque esto depende del tipo de diluyente empleado. La viabilidad de los espermatozoides tras la descongelación está influenciada por la velocidad de congelación y descongelación, así como por la concentración de glicerol. (Manosalva et al., 2005).

2.2.7. Función de los dilutores en la criopreservación del semen

2.2.7.1. Crioprotectores

Los criopreservantes son compuestos que se disuelven en agua y de baja toxicidad que reducen el punto de congelación de una solución determinada. Al disminuir este punto, es posible lograr una concentración determinada de solutos a temperaturas más bajas, lo que lleva a una mayor deshidratación celular y a un menor gradiente osmótico al que la célula estará sometida. (Ávila et al., 2006).

El proceso de criopreservación abarca varios pasos, que incluyen la disminución de la temperatura, la eliminación de agua de las células, la congelación y la posterior descongelación. Dado que los espermatozoides no están adaptados a soportar temperaturas bajas, su criopreservación influye en su viabilidad y funcionamiento normal. Cada fase de la crioconservación puede generar distintos

tipos de daño celular a través de diversos mecanismos, y el estado funcional de las células después de ser congeladas y descongeladas está determinado por las lesiones acumuladas durante todo el proceso. (Medeiros et al., 2002).

2.2.7.2. Daños por la criopreservación

Se ha detectado que el semen de mamíferos que ha sido criopreservado tiene una fertilidad inferior en comparación con el semen fresco. Esta reducción se atribuye a una menor viabilidad tras la descongelación y a alteraciones subletales en algunos espermatozoides que logran sobrevivir. La disminución de la fertilidad puede ser causada por varios factores. Entre los elementos que afectan la cantidad de espermatozoides viables se encuentran la sensibilidad al choque térmico, la velocidad de enfriamiento, la formulación del diluyente y el estrés osmótico. Por otro lado, los aspectos que influyen en la funcionalidad de los espermatozoides que sobreviven incluyen la estabilidad de la membrana celular, el daño oxidativo, la integridad de los receptores de la membrana y la configuración del núcleo. (Watson, 2000).

2.2.8. Dilutores usados en la congelación del semen

Se han identificado varios diluyentes que mejoran la calidad del esperma, evitan la creación de cristales de hielo dentro de las células y disminuyen el daño a la membrana tanto durante como después de la criopreservación. (Luna et al., 2019).

2.2.8.1. Optixell

Estos diluyentes, que no contienen proteínas de origen animal, están formados químicamente por liposomas. Se ha encontrado que los liposomas proporcionan propiedades protectoras al semen durante la congelación, lo que puede influir en la conformación y la permeabilidad de la membrana plasmática al agua, gracias a las propiedades físicas y químicas de los lípidos que los componen, lo que facilita su criopreservación. A diferencia de las proteínas de origen animal presentes en la yema, estos lípidos no son un medio para la transmisión de agentes infecciosos y se han utilizado ampliamente en la criopreservación del semen de toros y búfalos. Sin embargo, se conoce poco sobre el impacto de estos diluyentes liposomales (OptiXcell: OX) en la calidad del semen criopreservado de alpaca. (Ansari et al., 2016).

Un estudio mostró que el extensor comercial OPTIXcell, que incluye liposomas, es más eficaz para preservar la calidad del semen tras la descongelación, lo que lleva a una mayor tasa de fertilidad en búfalos en el campo. Las pajillas de semen se descongelaron a 37 °C durante 30 segundos para evaluar su calidad posterior

a la descongelación. Los resultados demostraron mejoras en los porcentajes de motilidad de los espermatozoides, la integridad de la membrana plasmática, la viabilidad y la integridad acrosómica al usar el extensor OPTIXcell, en comparación con el extensor de yema de huevo Tris-cítrico. (Röpke et al., 2011).

2.2.8.2. Triladyl

Triladyl es un concentrado estéril diseñado para elaborar un diluyente con yema de huevo, utilizado en el proceso de congelación de semen de ganado bovino en un solo paso. También es aplicable en la congelación de semen de otras especies como ovinos, caprinos y ciervos. Este diluyente está constituido por TRIS, ácido cítrico, azúcares, tampones, glicerina y una combinación de antibióticos (Tilosina 5,7 mg, Gentamicina 28,6 mg, Espectinomicina 34,3 mg y Lincomicina 17,2 mg) disueltos en agua ultra pura. Un frasco contiene 250 g de solución, suficiente para preparar 1250 g de diluyente listo para usar. Ha demostrado ser efectivo para diluir semen con baja concentración de espermatozoides (menos de 10 millones por dosis) y para la dilución de eyaculados con baja concentración celular. (Manosalva et al., 2005).

En una investigación diferente, se observó que el Triladyl ofrecía la mejor calidad del espermatozoide tras el proceso de descongelación. Así, Triladyl se considera el diluyente comercial más eficaz para la criopreservación de semen de diversas especies de mamíferos hasta el presente, aunque su efectividad en especies de alpaca es aún poco conocida (Abdel et al., 2019).

2.2.9. Técnicas para la evaluación de la integridad acrosomal

El método óptimo para evaluar el estado acrosomal debe ser preciso, veloz y no afectar la funcionalidad de los espermatozoides. Además, debe ser adaptable a diferentes medios y fluidos, y capaz de distinguir entre reacciones acrosómicas falsas, que señalan muerte celular, y las reales, asociadas con la fecundación. Una de las técnicas más efectivas para este propósito es la tinción con azul de tripán, rojo neutro y solución de Giemsa. (Kovács & Foote, 1992).

En llamas, se aplicó la técnica de triple tinción (azul de tripán, rojo neutro - ácido clorhídrico y Giemsa) como un método eficaz para detectar la presencia del acrosoma (Fumuso et al., 2015). Asimismo, se ha utilizado el colorante azul de Coomassie para verificar la presencia o ausencia del capuchón acrosómico. (Giuliano et al., 2012).

2.2.10. Tinción triple con azul de Tripán, rojo neutro y solución de Giemsa

Esta tinción de campo claro permite analizar simultáneamente el estado acrosomal y la viabilidad de los espermatozoides. En los camélidos sudamericanos, se han identificado cuatro patrones mediante la técnica de triple tinción. Este protocolo clasifica los espermatozoides en cuatro tipos distintos al ser observados bajo el microscopio. Esta clasificación es crucial para evaluar la calidad seminal y el potencial fecundante de los espermatozoides en estas especies.:

- Espermatozoide vivo con acrosoma: se observa una zona acrosomal de color fucsia y una zona post acrosomal de tono blanquecino.
- Espermatozoide vivo sin acrosoma: se distingue una zona acrosomal de color rosa pálido y una zona post acrosomal de tono blanquecino.
- Espermatozoide muerto con acrosoma: se presenta una zona acrosomal fucsia y una zona post acrosomal de color azul oscuro.
- Espermatozoide muerto sin acrosoma: se observa una zona acrosomal rosa pálido y una zona post acrosomal de color azul oscuro. (Fumuso et al., 2015).

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

Figura 4. Características de la muestra espermática sometida al proceso de Tinción Triple con Azul Tripán, Rojo Neutro y solución Giemsa (Gonzales, 2016).

2.2.11. Técnicas para evaluación de la integridad de membrana espermática

Los métodos empleados para determinar la integridad de la membrana plasmática se conocen como recuentos de viabilidad. Estos procedimientos implican el uso de mezclas de colorantes como eosina/nigrosina/Giemsa, Hoechst 33342/yoduro de propidio, y SYBR-14/yoduro de propidio, así como la prueba de endósmosis (hipoosmótica - HOST). (Minitube.com, 2017).

2.2.12. Tinción de Hoechst 33342/Ioduro de propidio

Para determinar la integridad de la membrana plasmática, se utiliza un método de doble tinción fluorescente con Hoechst 33342/PI o SYBR14/PI. El colorante

Hoechst 33342 puede atravesar las membranas plasmáticas y unirse al ADN, tiñendo todos los espermatozoides de color azul. En contraste, el PI (Ioduro de Propidio) solo penetra en las membranas dañadas, coloreando de rojo o violeta a aquellos espermatozoides con membranas alteradas al superponerse al azul de Hoechst. Con esta información, AndroVision calcula el porcentaje de espermatozoides que presentan membranas intactas o dañadas. Para evaluar la integridad de los acrosomas, se aplica una técnica de doble tinción fluorescente con H33342/FITC-PNA, donde los espermatozoides se tiñen de azul (H33342) y los acrosomas dañados se colorean de verde (FITC-PNA). (Minitube.com, 2017). El ioduro de propidio es un fluorocromo comúnmente empleado para identificar células muertas. Este compuesto penetra en los espermatozoides con membranas plasmáticas dañadas, se une al núcleo y, al ser expuesto a una longitud de onda específica (510-560 nm), emite fluorescencia roja. Además del ioduro de propidio, hay otros marcadores fluorescentes, como el Hoechst 33258, que cumplen una función similar en la identificación de células muertas. (Muiño, 2007).

El Hoechst 33342 es un fluorocromo que funciona de manera similar al SYBR-14, facilitando la identificación de espermatozoides vivos. Este compuesto puede penetrar en las células vivas y se une al ADN de los espermatozoides. No obstante, su utilización está restringida debido a su espectro de excitación en el rango UV. Como la mayoría de los citómetros utilizan un láser de 488 nm, se requiere un láser con una longitud de onda más corta para analizar muestras marcadas con Hoechst 33342. (Muiño, 2007).

La coloración azul en la cabeza de los espermatozoides sugiere que la membrana plasmática está en buen estado, gracias al fluorocromo Hoechst 33342. En cambio, los daños en la membrana plasmática se muestran mediante fluorescencia roja, generada por el Ioduro de Propidio (IP). (Suhevic et al., 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación de la zona de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Estación Experimental Agraria Canaán - INIA, ubicada en Ayacucho.

3.1.1. Ubicación política

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

3.1.2. Ubicación geográfica

La Estación Experimental Agraria Canaán-INIA se encuentra en la Avenida Abancay, a apenas 15 minutos de la Plaza Mayor de Huamanga. Está ubicada al sureste de la capital de la provincia de Huamanga, en la región de Ayacucho.

Latitud Sur : 13°09'48" S.
Longitud Oeste : 74°12'20" W.
Altitud : 2 736 m s.n.m.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población

La población de estudio se compuso de todos los espermatozoides presentes en los eyaculados de semen recolectados a través de una vagina artificial de seis alpacas machos de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA-Ayacucho.

3.2.2. Muestra

La muestra consistió en 18 muestras, cada una de las cuales fue sometida a 3 repeticiones con submuestreo. Se extrajeron 10 µl de semen de cada muestra para analizar la integridad del acrosoma y la membrana espermática, recolectándose estos a través de una vagina artificial de seis alpacas machos de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA-Ayacucho.

3.2.3. Sistema de muestreo

El sistema de muestreo fue aleatorio.

3.3. Metodología y recolección de datos

3.3.1. Armado de la vagina artificial

- Se insertó el jebe de látex dentro de la vagina artificial que estaba hecha de tubo de PVC.
- Se colocó la bolsa de polietileno, previamente cortada, en el tubo Falcon.
- Se unió la bolsa con el tubo Falcon al tubo de PVC.
- Se jaló el látex en el extremo posterior y se añadió agua a una temperatura de 46 a 50 °C, asegurando todo con cinta de jebe.
- Se introdujo aire a través del pitón para hacer un ligero ajuste en el interior de la vagina artificial.
- Se puso una tapa protectora en el tubo Falcon para conservar la temperatura y evitar la exposición a la luz, para la supervivencia de los espermatozoides.
- Se envolvió con una bolsa de agua caliente a 52 °C y se cubrió exteriormente con una frazada y una toalla para mantener el calor, todo esto alrededor de la vagina montada.
- Se limpió el área del periné del maniquí y se aplicó gel para facilitar la inserción de la vagina artificial, colocándola en su lugar mientras se mantenía el control de la temperatura con un termómetro, asegurando su ajuste en el maniquí.
- Posteriormente, se realizó la monta y cópula con los machos seleccionados, controlando tanto el tiempo como la efectividad de la eyaculación.
- Una vez que el macho había penetrado, se registró un tiempo de cópula promedio de 15 a 40 minutos por cada macho, y luego se retiró la vagina del maniquí. Inmediatamente después, se sacó el tubo Falcon protegido para comenzar la evaluación macroscópica y microscópica del semen (Cueva, 2018).

3.3.2. Análisis macroscópico y microscópico del semen

- Después de la recolección de semen se colocó inmediatamente el tubo con la muestra a baño maría a 37°C.
- Se observó el semen en el laboratorio, tratando de evitar el contacto directo con la luz solar, siendo las siguientes características macroscópicas.

a) Color

- Se observó directamente con los ojos en el tubo Falcon y se clasificó como (Blanco lechoso, Blanco semi lechoso, Blanco cristalino, etc.).

b) Volumen

- Se observó directamente en el tubo Falcon graduado, se registró la espuma y el volumen promedio de 1,5 ml de semen aproximadamente.

c) Motilidad individual

- Se tomó una gota de semen puro usando una micropipeta
- En semen fresco se evaluó la motilidad sin usar diluyente y se observó directamente al microscopio
- Se usaron los dilutores para evaluar la motilidad a diferentes tiempos.
- Luego se tomó una gota de la dilución y se colocó en la lámina portaobjetos.
- Se observó al microscopio óptico de campo claro, la motilidad con valores de porcentaje de 0 a 100% de acuerdo a su movilidad (Cueva, 2018).

d) Preparación de los diluyentes para refrigeración y congelación del semen

Los diluyentes fueron preparados antes de llevar a cabo el proceso de recolección de semen del animal. Los procedimientos de preparación utilizados siguieron las indicaciones de cada uno de los medios comerciales (Calle, 2020).

e) Elaboración para 50 ml de diluyente Optixcell

- Se realizó la desinfección del área (alcohol etílico) antes de iniciar la preparación.
- Los vasos de precipitado se calentaron en un baño maría a 37 °C.
- La dilución de agua destilada y el diluyente Optixcell se preparó en una proporción de 2:1. Para ello, se midieron 33,33 ml de agua destilada y 16,67 ml de Optixcell en una probeta de 100 ml y se vertieron en los vasos de precipitado, luego se homogeneizó la mezcla.
- Se dejó reposar durante 5 minutos antes de transferir a los tubos de conservación con el diluyente.
- Finalmente se almacenó en refrigeración a 5 °C durante un período de 5 días (Calle, 2020).

f) Elaboración para 50 ml de diluyente Triladyl.

- Se limpió la zona utilizando alcohol etílico antes de iniciar la preparación.
- Se calentaron los vasos de precipitado en un baño maría a 37 °C, y se midieron 30 ml de agua destilada y 10 ml de Triladyl en un cilindro de 100 ml.
- Se mezcló todo en un tubo Falcon de 15 ml
- A continuación, se desinfectó el huevo con alcohol etílico y se secó con papel.
- Después, se rompió el huevo y se vertió su contenido sobre una superficie limpia y estéril (papel); con una jeringa, se extrajeron 10 ml de yema de huevo.

- La yema de huevo se agregó a la mezcla en el tubo Falcon.
- Se homogeneizó el diluyente en un vortex hasta que no quedaran grumos.
- Se dejó reposar durante 5 minutos y luego se transfirió a los tubos de conservación del diluyente. Finalmente, se refrigeró a 5 °C durante 5 días. (Calle, 2020).

g) Dilución del semen y los dilutores

- Se llevó a cabo la adaptación del semen combinando el semen con un diluyente preparado, ya sea Optixcell o Triladyl, en una relación de 1:1
- La dilución se realizó en un solo paso, facilitando así la refrigeración y congelación del semen
- Tras la preparación de la dilución (la mezcla de diluyente y semen), se transfirió a un tubo Ependorf de 0,5 ml. (Calle, 2020).

3.3.3. Refrigeración del semen

- Se llevó a cabo una dilución simple para la refrigeración y congelación del semen, utilizando una proporción de 1:1 entre la muestra de semen y el diluyente Optixcell o Triladyl.
- Una vez finalizada la dilución, se inició el enfriamiento del semen, con el propósito de reducir su temperatura de 37 °C a 5 °C en un promedio de 2 horas. (Cueva, 2018).

3.3.4. Congelación del semen

- Se realizó una evaluación de la motilidad y concentración, asegurando que ambas superaran el 50 % para proceder con el congelamiento.
- El semen se diluyó en una relación de 1 a 1: 1 ml de semen por 1 ml de Optixcell o Triladyl, manteniendo siempre controlada la temperatura.
- Utilizando una micropipeta de 10 µl, se tomó el semen diluido que presentaba buena concentración y motilidad, y se depositó en tubos Eppendorf.
- Se preparó un recipiente con agua y cubos de hielo a 5 °C para aclimatar los tubos Eppendorf que contienen el semen a congelar, evitando así el choque térmico, durante un período de 15 minutos.
- Se trasladaron los tubos al tanque de nitrógeno líquido, se abrió la tapa, se retiró el tapón y se utilizó una regla para medir el nivel de nitrógeno líquido.
- Desde el nivel del nitrógeno, se midieron 10 cm hacia abajo hasta la base de los cilindros del tanque.
- Se introdujo una canastilla con los tubos Eppendorf para proceder a la congelación; se bajó la canastilla 3 cm durante 5 minutos, repitiendo este

proceso 3 veces; en la última ocasión, además de las 3 repeticiones, se sumergió completamente en el fondo del tanque durante 10 segundos antes de retirarla rápidamente o dejarla en el mismo tanque.

- Finalmente, se colocó la canastilla en el tanque de nitrógeno líquido, asegurándose de sumergirla a -196 °C para el congelamiento (Cueva, 2018).

3.3.5. Descongelación

- Para descongelar el semen, se seleccionó al azar un tubo Ependorf del tratamiento correspondiente y se sumergió de inmediato en agua tibia a 37 °C, que se encontraba en un termo de descongelación. Estos tubos se dejaron sumergidos durante 30 segundos.
- Al finalizar el tiempo, se retiró el tubo Ependorf del agua y se secó con papel toalla.
- Con una micropipeta de 10 µl, se extrajo una muestra de semen y se depositó una gota sobre una lámina portaobjetos que había sido calentada a 37 °C (Cueva, 2018).

3.3.6. Evaluación del semen después del congelamiento

Después de descongelar el semen, se llevó a cabo la evaluación de la integridad de la membrana espermática utilizando Hoechst 33342/PI y se examinó el acrosoma mediante la tinción triple con azul de tripán, rojo neutro y Giemsa. También se realizaron pruebas de motilidad.

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

- Las muestras de semen de alpaca se ajustaron a una temperatura de 38 °C.
- Se utilizaron tubos marrones con 250 µl de Hoechst 33342/PI.
- Para 500 µl de la muestra de semen precalentada, se incorporaron 2 µl de la mezcla de colorantes, o alternativamente, 2 µl de Hoechst 33342/PI junto con 2 µl de semen precalentado.
- Se realizó una mezcla adecuada sobre un portaobjetos.
- Se incubó una muestra de 10 µl de semen con 2 µl de Hoechst 33342/PI durante 15 minutos a 38 °C, manteniendo la muestra protegida de la luz durante este tiempo.
- Se depositó una gota en el portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos.
- Se observó la preparación al aumento de 200X utilizando el sistema CASA.
- Los datos fueron ingresados al sistema Androvisión CASA, donde se seleccionó "análisis avanzado" y luego el módulo "viabilidad".

- El análisis de la integridad de la membrana se llevó a cabo en muestras de semen fresco, refrigerado y congelado.
- Se examinaron cinco campos, observándose que los espermatozoides con membranas dañadas aparecían de color rojo, mientras que los que tenían la membrana intacta eran de color azul (Cueva, 2018).

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

- Se utilizó una solución al 0,4 % de azul de Tripán (Sigma T8154, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) mezclada con NaCl al 0,9 % en una proporción de 1:1.
- Alternativamente, se pueden emplear gotas iguales de azul de Tripán al 0,2 % y semen.
- El semen se diluyó en NaCl al 0,9 % y se aplicó en la punta de un portaobjetos.
- La gota que contenía azul de Tripán al 2 % y semen se mezcló con una pipeta y luego se extendió sobre un portaobjetos.
- Se dejó secar de manera vertical a temperatura ambiente.
- Se sometió a una fijación en una solución de rojo neutro (Sigma N° 2880) durante 2 minutos.
- Posteriormente, se enjuagó con agua destilada
- Se llevó a cabo la tinción con Giemsa (preparada justo antes de su uso, combinando 11,5 ml de agua destilada con 1 ml de Giemsa) a temperatura ambiente durante una hora y media, preferiblemente durante toda la noche.
- Se enjuagó nuevamente con agua destilada.
- Se dejó secar al aire, asegurándose de limpiar la parte posterior del portaobjetos con papel toalla para evitar manchas de fondo
- Una vez seco, se examinó bajo un microscopio de contraste de fases a aumentos de 400X o 1000X utilizando aceite de inmersión.
- Se realizó el análisis en 5 campos correspondientes a semen refrigerado y congelado.
- En este protocolo, se clasificaron cuatro tipos de espermatozoides observados al microscopio: espermatozoide vivo con acrosoma intacto (con zona acrosomal fucsia y zona postacrosomal blanquecina); espermatozoide vivo sin acrosoma (con zona acrosomal rosa pálido y zona postacrosomal blanquecina); espermatozoide muerto con acrosoma (con zona acrosomal fucsia y zona postacrosomal azul oscuro); y espermatozoide muerto sin acrosoma (con zona

acrosomal rosa pálido y zona postacrosomal azul oscuro) (Fumuso et al., 2015).

- El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto (VAI) se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de espermatozoide int} = \frac{n^{\circ} \text{ de espermatozoides tipo I}}{n^{\circ} \text{ total de espermatozoides I, II, III, IV}} * 100$$

Tipo I : Espermatozoide vivo con acrosoma.

Tipo II : Espermatozoide vivo sin acrosoma.

Tipo III : Espermatozoide muerto con acrosoma.

Tipo IV : Espermatozoide muerto sin acrosoma

3.4. Tipo de investigación

El estudio realizado fue de tipo básico-experimental. Se considera básico porque su principal objetivo es generar nuevos conocimientos sobre la integridad de la membrana acrosomal y la integridad de la membrana espermática en semen refrigerado y congelado. Por otro lado, se clasifica como experimental porque se manipuló una variable relacionada con dos etapas de conservación del semen utilizando los diluidores Optixcel y Triladyl, con el fin de evaluar su impacto en la integridad del acrosoma y la membrana espermática del semen de alpaca.

3.5. Análisis estadístico

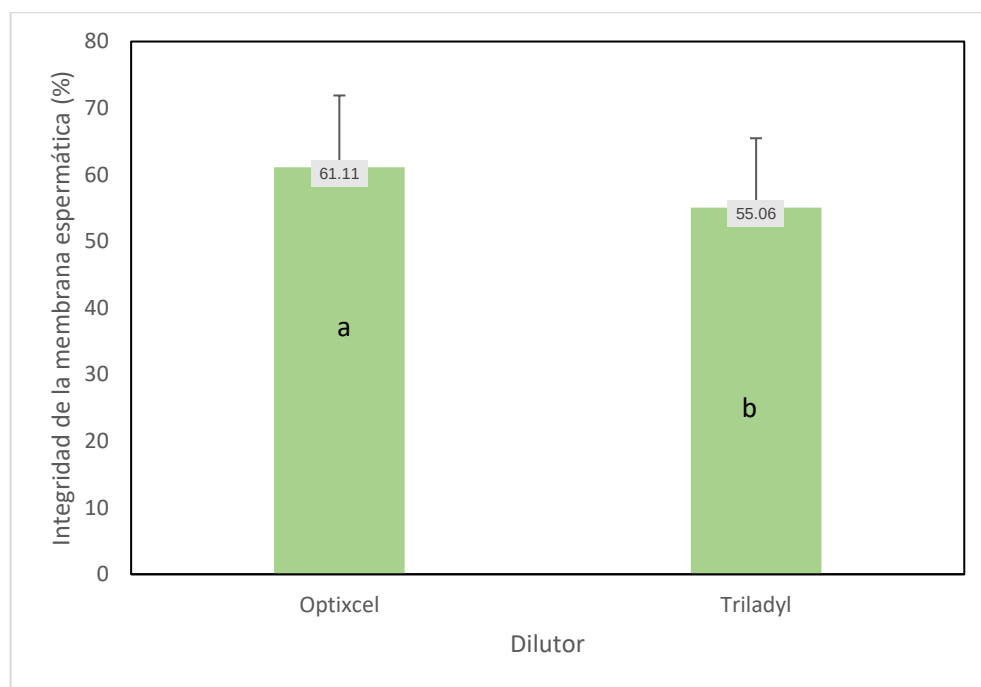
Los datos recolectados fueron empleados para elaborar una matriz en el software Excel, para su posterior análisis en el programa InfoStat. A partir de este análisis, se generaron tablas y gráficos que muestran estadísticas de tendencia central y dispersión (Di Rienzo et al, 2020).

El diseño experimental empleado fue el de Bloques Completamente Aleatorizados con Submuestreo. En este diseño, los machos se asignaron como bloques y los diferentes diluidores se utilizaron como tratamientos, con tres repeticiones por submuestra. El objetivo principal fue analizar la integridad del acrosoma y la membrana espermática en dos tipos de tratamiento: semen refrigerado y congelado. Se llevó a cabo un análisis de varianza, seguido de la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$), ya que los datos mostraron una distribución normal, lo cual permitió comparar la variabilidad en la integridad de la membrana espermática entre los dos tratamientos. (Di Rienzo et al, 2020).

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Valores promedio y desviación típica de la integridad de la membrana espermática con dilutor Optixcel y Triladyl en semen refrigerado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021

DILUTOR	N	Media± D.E.
OPTIXCEL	18	61,11± 10,79 ^a
TRILADYL	18	55,06± 10,42 ^b
TOTAL	36	

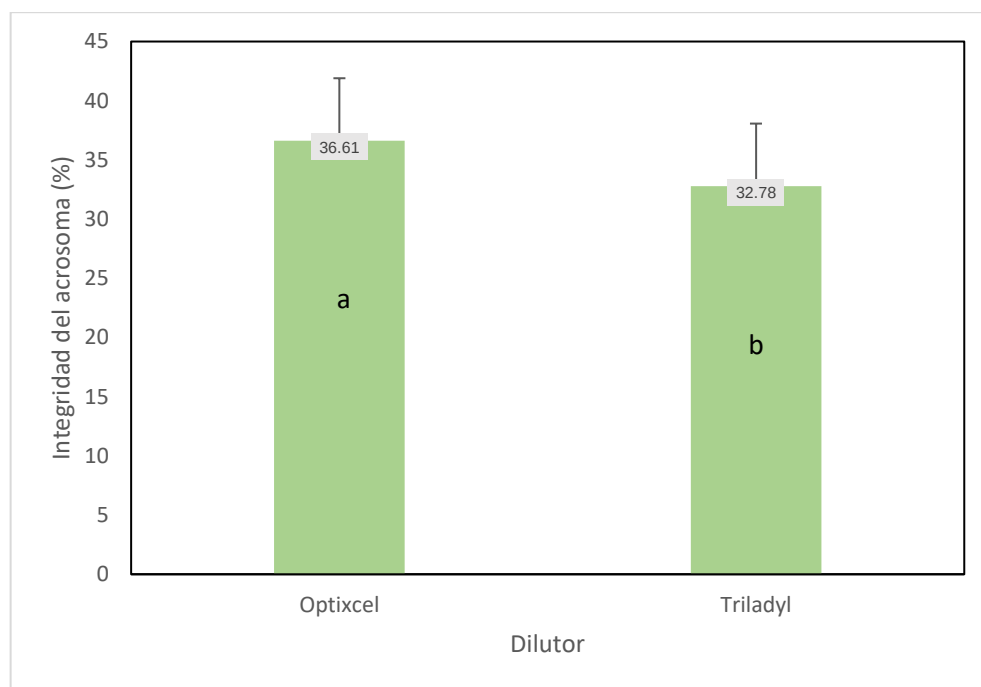


*Prueba Tukey ($\alpha=0.05$). Letras diferentes indican diferencia significativa.

Figura 5. Valores promedio sobre el efecto de los dilutores Optixcel y Triladyl en la integridad de la membrana espermática en semen refrigerado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.

Tabla 2. Valores promedio y desviación típica de la integridad del acrosoma con dilutor Optixcel y Triladyl en semen refrigerado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.

DILUTOR	N	Media±D.E.
OPTIXCEL	18	36,61±5,29 ^a
TRILADYL	18	32,78±5,29 ^b
TOTAL	36	

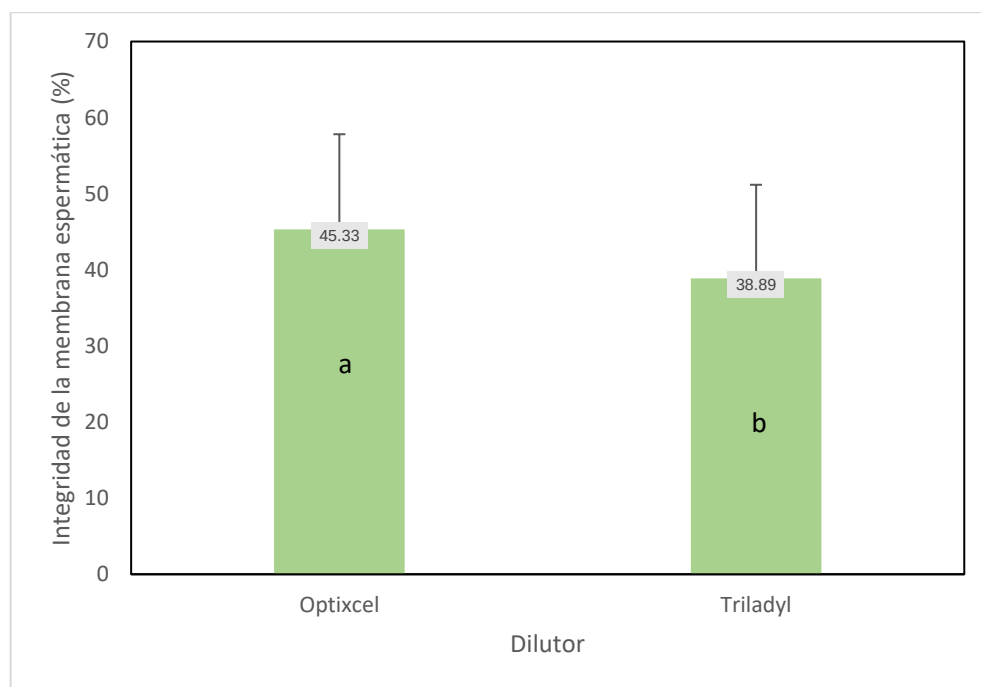


*Prueba Tukey ($\alpha=0.05$). Letras diferentes indican diferencia significativa.

Figura 6. Valores promedio sobre efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad del acrosoma en semen refrigerado de *Vicugna pacos* "alpaca". INIA. Ayacucho 2021.

Tabla 3. Valores promedio y desviación típica de la integridad de la membrana espermática de con dilutor Optixcel y Triladyl en semen congelado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021

DILUTOR	N	Medias± D.E.
OPTIXCEL	18	45,33±12,49 ^a
TRILADYL	18	38,89±12,49 ^b
TOTAL	36	

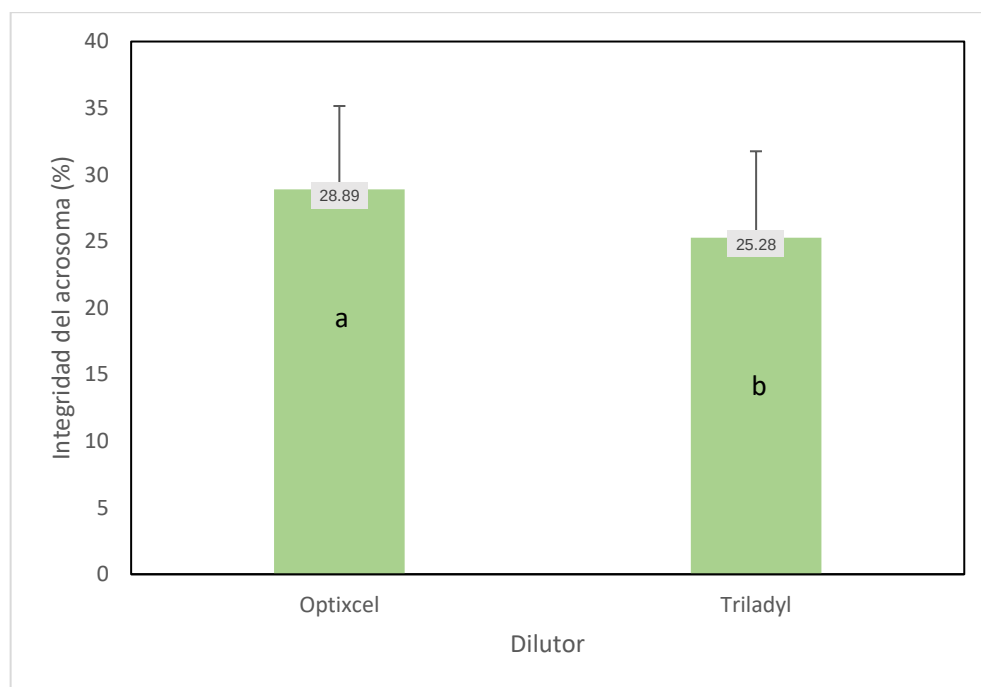


*Prueba Tukey ($\alpha=0.05$). Letras diferentes indican diferencia significativa.

Figura 7. Valores promedio sobre el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad de la membrana espermática en semen congelado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.

Tabla 4. Valores promedio y desviación típica de la integridad del acrosoma de con dilutor Optixcel y Triladyl en semen congelado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho 2021.

DILUTOR	N	Medias± D.E.
OPTIXCEL	18	28,89±6,27 ^a
TRILADYL	18	25,28±6,48 ^b
TOTAL	36	



*Prueba Tukey ($\alpha=0.05$). Letras diferentes indican diferencia significativa.

Figura 8. Valores promedio sobre el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad del acrosoma en semen congelado de *Vicugna pacos* "alpaca". INIA. Ayacucho 2021.

Tabla 5. Evaluación de la integridad de membrana espermática por color de semen en estado refrigerado y congelado de *Vicugna pacos* “alpaca” usando dilutor Optixcell y Triladyl. INIA. Ayacucho 2021.

Tratamiento	Dilutor	Color	N	Media	Desv.Est.
SR	OP	Blanco lech.	4	54,8	5,6
		Semi lechoso	11	60,4	11,5
		Transparente	3	72,3	2,5
	TR	Blanco lech.	4	51,0	4,6
		Semi lechoso	11	52,7	10,2
		Transparente	3	69,0	3,6
SC	OP	Blanco lech.	4	4,0	2,5
		Semi lechoso	11	41,6	14,0
		Transparente	3	58,3	2,9
	TR	Blanco lech.	4	42,0	2,2
		Semi lechoso	11	34,3	13,3
		Transparente	3	51,7	2,9

SR = Semen refrigerado

SC = Semen congelado

OP = Optixcel

TR = Triladyl

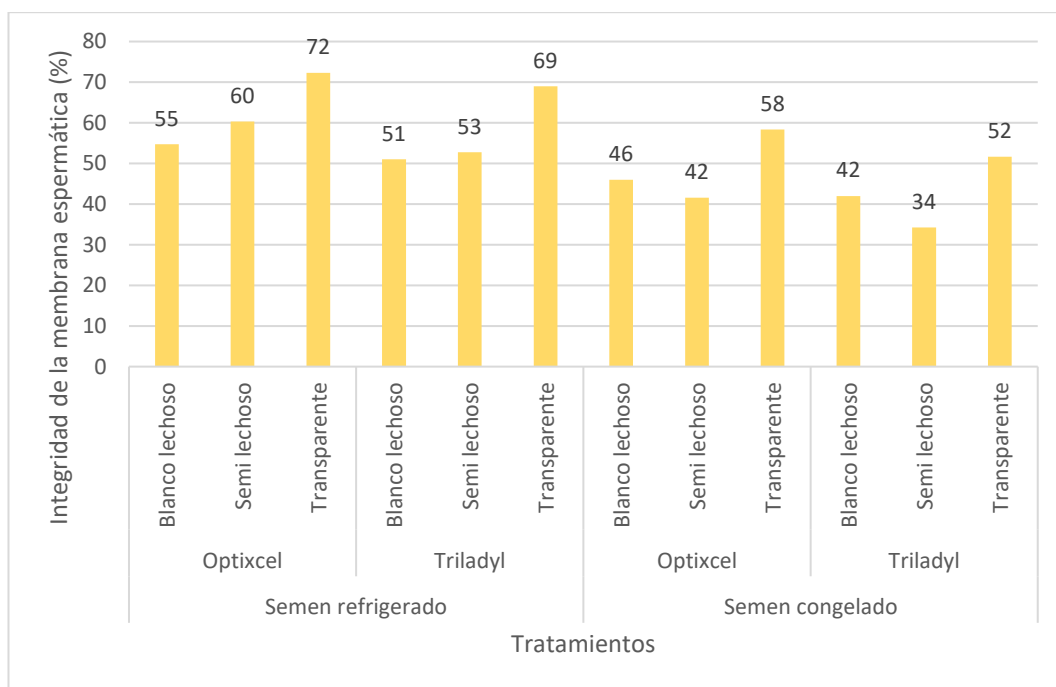


Figura 9. Integridad de la membrana espermática por color de semen en estado refrigerado y congelado de *Vicugna pacos* “alpaca” usando dilutor Optixcell y Triladyl. INIA. Ayacucho 2021.

Tabla 6. Evaluación de la integridad del acrosoma por color de semen en estado refrigerado y congelado de *Vicugna pacos* “alpaca” usando dilutor Optixcell y Triladyl. INIA. Ayacucho 2021.

Tratamiento	Dilutor	Color	N	Media	Desv.Est.
SR	OP	Blanco lech.	4	37,0	5,6
		Semi lechoso	11	35,4	5,6
		Transparente	3	40,7	1,2
	TR	Blanco lech.	4	32,0	2,9
		Semi lechoso	11	31,2	5,2
		Transparente	3	39,7	1,5
SC	OP	Blanco lech.	4	28,3	1,0
		Semi lechoso	11	27,2	6,9
		Transparente	3	36,0	1,7
	TR	Blanco lech.	4	26,0	2,2
		Semi lechoso	11	23,6	7,6
		Transparente	3	30,7	1,2

SR = Semen refrigerado

SC = Semen congelado

OP = Optixcel

TR = Triladyl

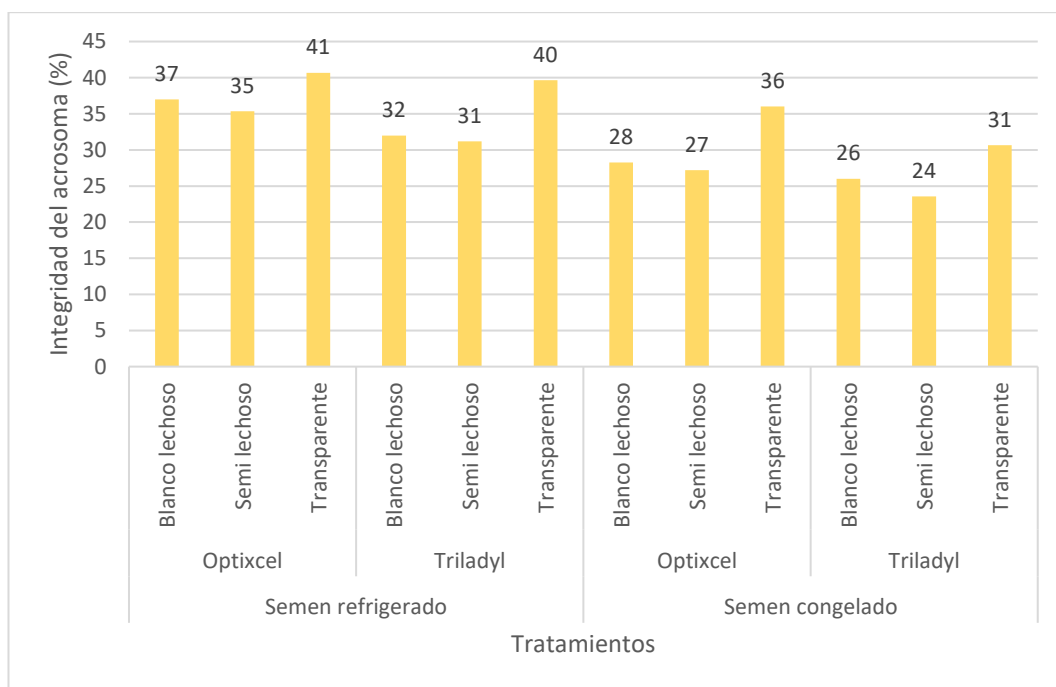


Figura 10. Integridad del acrosoma por color de semen en estado refrigerado y congelado de *Vicugna pacos* "alpaca" usando dilutor Optixcell y Triladyl. INIA. Ayacucho 2021.

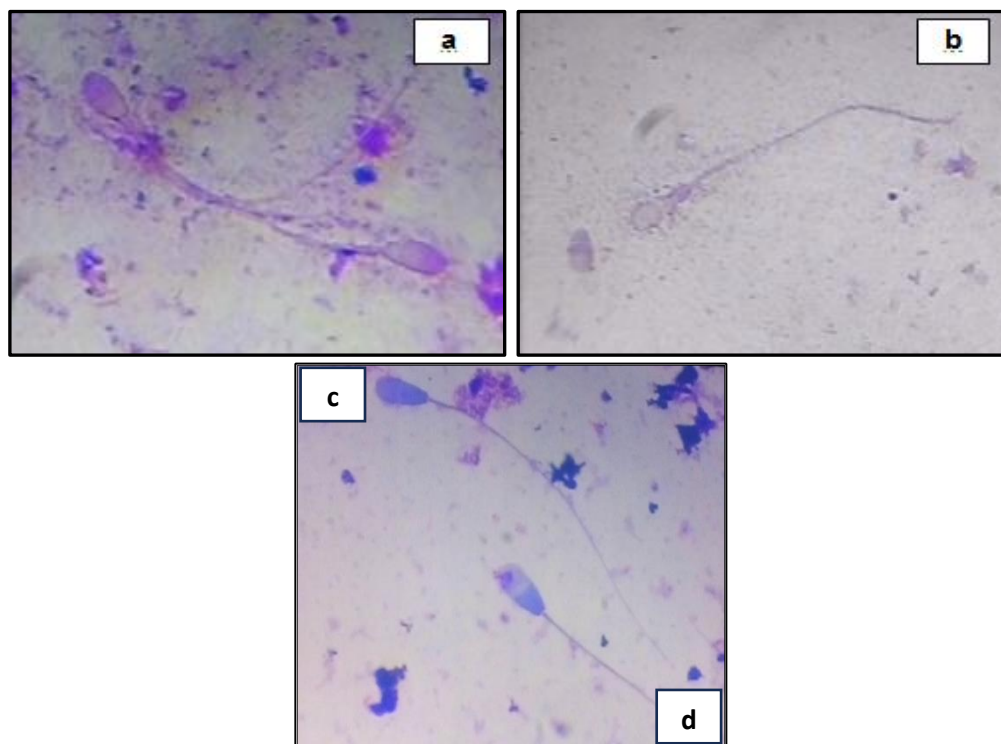


Figura 11. Espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” teñidos con la solución de triple tinción (azul de tripán, rojo neutro y Giemsa). INIA. Ayacucho 2021.

- a) Espermatozoide viable con acrosoma intacto.
- b) Espermatozoide viable sin acrosoma.
- c) Espermatozoide no viable con acrosoma intacto.
- d) Espermatozoide no viable sin acrosoma.

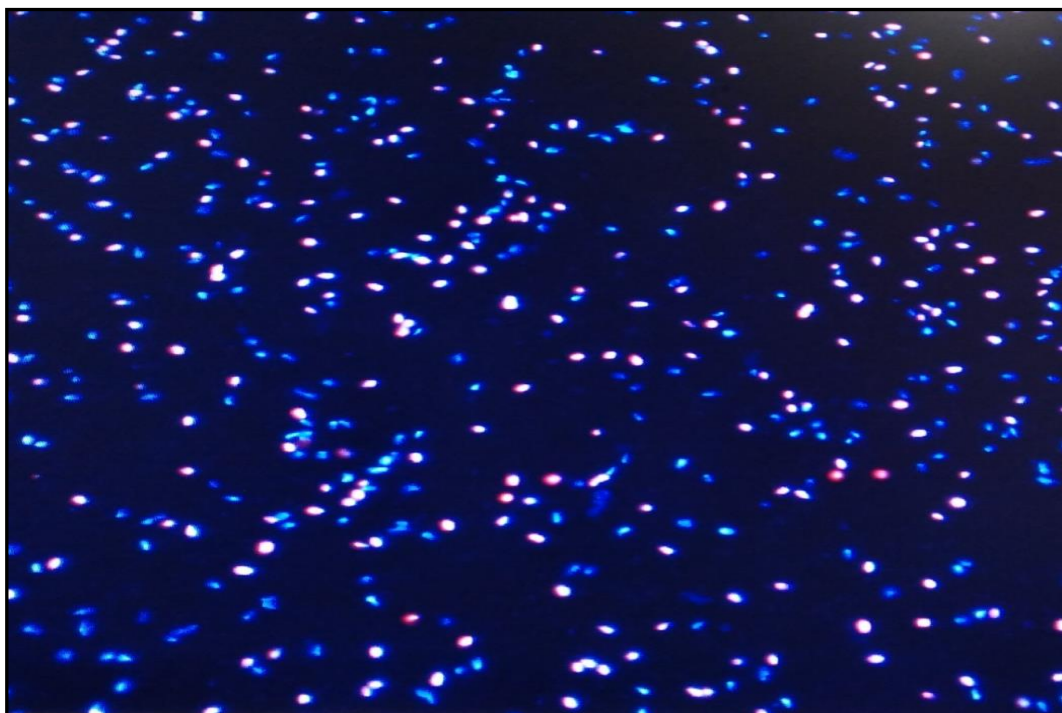


Figura 12. Espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” teñidos con el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI, analizados en el AndroVision sistema CASA. INIA Ayacucho 2021.

- a) Los espermatozoides viables, o con membrana celular intacta, se identificaron por su color azul.
- b) Los espermatozoides no viables, o con membrana celular dañada, se reconocieron por su color rojo

V. DISCUSIÓN

Según los resultados del estudio presentados en la Tabla 1, se observan los valores promedio del impacto de los diluidores Optixcell y Triladyl en la integridad de la membrana espermática. Se destaca que el diluidor Optixcell brinda una mayor protección de la membrana en semen refrigerado, alcanzando un 61 % de integridad, mientras que el diluidor Triladyl logra un 55 %. Este resultado se debe a que el Optixcell preserva la membrana con mayor eficacia que el Triladyl. Sin embargo, el Triladyl demostró ser más efectivo en la criopreservación del semen de alpaca en comparación con los diluidores Andromet y base tris, como se menciona en el estudio de Ordoñez et al. (2015).

El crioprotector Optixcell fue el mejor conservando la motilidad e integridad de membrana espermática en comparación con los otros dos dilutores Andromet y Triladyl como lo menciona en su investigación Montenegro (2022).

Según en la Tabla 2, se muestran los valores promedio sobre el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad del acrosoma, donde se observa que el dilutor Optixcel tiene un mejor efecto protector para la integridad del acrosoma en semen refrigerado, siendo la integridad del acrosoma con el dilutor Optixcell 36,61 % y con el dilutor Triladyl 32,78%; no obstante, existen diferencia entre los dos dilutores, el mejor efecto sobre la integridad del acrosoma se debe a que el dilutor Optixcell es más estable que el Triladyl, por la composición química que tiene. Generalmente los dilutores para semen animal contienen una combinación de sustancias que incluyen electrolitos, agentes tamponantes para mantener el pH, carbohidratos como alimento y fuente de energía para los espermatozoides, agentes antimicrobianos para prevenir el crecimiento bacteriano y crioprotectores para proteger las células del daño por la formación de cristales de hielo intracelulares durante el proceso de congelación y descongelación. La composición precisa puede variar según el fabricante y la formulación específica

del dilutor. El Triladyl contiene TRIS, ácido cítrico, azúcar como la fructosa, tampón-citrato, glicerina, agua ultrapura y antibióticos (tilosina, gentamicina, espectinomicina, lincomicina).

La integridad del acrosoma está asociada a diferentes factores que pueden alterar su viabilidad como es el proceso de criopreservación, el cambio de temperatura afecta la membrana ocasionando daños como hinchamiento, modificaciones en la fluidez, alteraciones en el flujo de calcio y variaciones en la actividad enzimática que podrían desencadenar una reacción acrosómica prematura o causar daño en el acrosoma, viéndose afectada la fertilidad como menciona Tartaglione y Ritta (2004). El dilutor Optixcell tuvo un mejor efecto protector en la viabilidad espermática en comparación con el dilutor Triladyl en semen de cuy (Montenegro; 2022). Esto demuestra que el dilutor Optixcell es mejor que el dilutor Triladyl.

En la Tabla 3, Se observan los valores promedio respecto al impacto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad de la membrana. Se puede notar que el dilutor Optixcell ofrece un efecto protector superior para la integridad de la membrana espermática en el semen congelado, siendo la integridad de la membrana espermática con el dilutor Optixcell 45,33% y con el dilutor Triladyl 38,89%; no obstante, al existir diferencia entre los dos dilutores, el mejor efecto sobre la integridad de la membrana se debe a que el dilutor Optixcell es más estable que el Triladyl, por la composición que tiene generalmente puede incluir una combinación de agua purificada, agentes tamponantes para mantener el pH adecuado, estabilizadores para preservar la integridad de los reactivos y, en algunos casos, agentes antimicrobianos para prevenir el crecimiento de bacterias u otros microorganismos Montenegro (2022).

La integridad de la membrana está relacionada con diversos factores que pueden afectar su estabilidad, como el proceso de criopreservación. Es fundamental entender ciertas características celulares que pueden afectar la viabilidad del producto congelado para poder aplicar la técnica más adecuada. Para lograr este objetivo, es crucial conocer las propiedades fisicoquímicas de las células o tejidos, ya que diversas variables, como la permeabilidad celular, el volumen osmóticamente inactivo y la relación entre la superficie y el volumen de la célula, pueden variar dependiendo de la especie, el tipo y el estado de la célula durante el proceso de congelación. La estructura y composición de la membrana plasmática impactan en los eventos celulares esenciales durante la criopreservación; las bajas temperaturas influyen en la difusión y la ósmosis a

través de las membranas, y cada célula exhibe un perfil biofísico particular. Ávila et al. (2006).

En los resultados del ANOVA, se encontró que el semen descongelado mostraba un $41,15 \pm 10,26\%$ y un $26,82 \pm 7,30\%$ de endosmosis con Optixcell y Andromed, respectivamente. (Cabrera, 2021). Se llegó a la conclusión de que el dilutor Optixcell favoreció la conservación de la integridad de la membrana citoplasmática de los espermatozoides. Además, se observaron diferencias en la motilidad y vitalidad del semen refrigerado y descongelado en función de la raza del toro. Sin embargo, la prueba de HOST no reveló diferencias significativas ($P \geq 0,05$) entre el semen refrigerado y el descongelado. Se trató a los diluyentes como tratamientos y a las razas de toros como bloques. Se utilizó un diseño completamente al azar (DBCA) para evaluar la motilidad, vitalidad y características del HOST de los espermatozoides en ambas condiciones, con ocho réplicas. Los resultados indicaron un volumen medio de $3,34 \pm 1,42$ ml, una concentración de $1442,40 \pm 327,34$ millones de espermatozoides/ml, una motilidad de masa de 3,8, un pH de 7 y un color blanco cremoso. En la prueba de HOST, no se detectaron diferencias estadísticas ($P \geq 0,05$) entre el semen refrigerado y el descongelado, según Cabrera (2021).

La Tabla 4 presenta los valores promedio del efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad del acrosoma de los espermatozoides, donde se observa que Optixcell tiene un mejor efecto conservante, mostrando un 28,89 % frente al 25,28 % de Triladyl. Calle (2020) encontró que la viabilidad post-descongelación variaba entre 30 y 40 %, la motilidad progresiva individual de 20 a 60 % y el porcentaje de espermatozoides normales entre 81 y 98 %, considerados valores normales. El análisis de varianza y la prueba de Tukey revelaron que no había diferencias significativas en el uso de los diferentes medios de criopreservación para las variables estudiadas. Por lo tanto, se concluyó que, al comparar los cuatro medios de crioconservación, no había diferencias estadísticamente significativas en viabilidad, motilidad individual progresiva y morfología; las muestras no presentaron cambios drásticos al pasar de fresco a congelado, y la elección del medio comercial dependió únicamente de la disponibilidad en la zona de trabajo. Sin embargo, existe poca información sobre el uso de diluidores en el semen de camélidos sudamericanos, y la mayoría de las investigaciones han intentado adaptar diluidores de otras especies. Por ello, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de dos diluidores en la integridad acrosomal de los

espermatozoides de alpaca en semen refrigerado y congelado. Gonzales (2016) señaló que no hubo diferencias significativas en la concentración de espermatozoides según el dilutor, aunque sí se encontraron diferencias en la cantidad de pajillas producidas. La raza Angus puede producir entre 200 y 350 pajillas, superando a las razas Simmental, Jersey y Brangus. Sin embargo, se observó diferencia en las características del semen fresco entre razas. Es crucial considerar el sistema de producción del semental para obtener semen de buenas características y conservarlo con cualquier dilutor, ya sea Triladyl o Andromed.

En la Tabla 5, la evaluación de la integridad de la membrana espermática por color de semen en estado refrigerado usando el dilutor Optixcell mostró un 72,3 %, mientras que con Triladyl fue del 69 %, siendo ambas muestras de semen de color transparente. En el semen congelado, Optixcell presentó un 58,3 % y Triladyl un 51,7 %, también con muestras transparentes. El color del semen depende de la concentración de espermatozoides y varía entre especies. En alpacas, el color de los eyaculados varía de blanco lechoso a blanco cristalino. El color del eyaculado, independientemente del volumen, fue de blanco lechoso a blanco cristalino claro, sin registrar muestras de color cristalino que se observan en las colecciones con electroeyaculado, según Trujillo (2019).

Por otro lado, Santoso et al. (2021) indicaron que el color y la consistencia del semen del toro Pasundan fueron similares en dos grupos diferentes. El color, consistencia, movimiento masal y concentración de espermatozoides son parámetros interrelacionados, ya que el color del semen se determina por la densidad (concentración) de espermatozoides, lo que se refleja en su consistencia y movimiento. Resultados similares se encontraron en el semen del toro Sumba Ongole, que mostró consistencia moderada y un color cremoso, según la investigación.

La Tabla 6 reporta la evaluación de la integridad del acrosoma del espermatozoide por color de semen en estado refrigerado, donde Optixcell presentó un 40,7 % y Triladyl un 39,7 %, ambas muestras de color transparente. En estado congelado, Optixcell mostró un 36 % y Triladyl un 30,7 %, con muestras transparentes destacadas. Santiani et al. (2020) Se encontraron los siguientes valores (medias $\pm$ IC 95%): 6,1 $\pm$ 2,7 ml de volumen, de color blanquecino; 66,7 $\pm$ 10,5 % de motilidad; 262,7 $\pm$ 20,4 $\times 10^6$ espermatozoides/ml de concentración; 77,7 $\pm$ 9,7 % de viabilidad espermática; 85,9 $\pm$ 5,1 % de alta motilidad progresiva; y 83,6 $\pm$ 14,9 % de integridad acrosomal. Estos resultados constituyen el primer informe

sobre las características seminales de esta raza de perro y podrían servir como valores de referencia para la selección de machos reproductores y el diagnóstico de posibles alteraciones reproductivas en la raza. El semen del perro sin pelo del Perú presentó un color blanquecino en todos los eyaculados, lo que sugiere la presencia de espermatozoides en la muestra. A pesar de la variabilidad en el volumen del semen, no se observaron diferencias en los matices del color de los eyaculados, lo que puede atribuirse a que la variación en la concentración de espermatozoides entre los eyaculados fue mínima, oscilando entre 210 y 320 millones de espermatozoides/ml.

VI. CONCLUSIONES

1. En semen refrigerado, el diluyente Optixcel mostró un mayor porcentaje de integridad de membrana espermática (61,11 %) en comparación con Triladyl (55,06 %). Lo mismo ocurrió con la integridad del acrosoma, donde Optixcel presentó un porcentaje más alto (36,61 %) que Triladyl (32,78 %), teniendo diferencia significativa entre los tratamientos ($p>0,05$).
2. En semen congelado, nuevamente el diluyente Optixcell demostró un mejor efecto crioprotector en cuanto a la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en comparación con Triladyl. En semen congelado, nuevamente Optixcel demostró una mayor integridad tanto en la membrana espermática (45,33 %) como en el acrosoma (28,89 %) en comparación con Triladyl (38,89 % y 25,28 %, respectivamente).
3. La viabilidad de la integridad de la membrana espermática de acuerdo al color del semen fue más alta en semen refrigerado con Optixcel (72,3 %) en comparación con Triladyl (69 %), y en semen congelado con Optixcel (58,3 %) en comparación con Triladyl (51,7 %). No hubo diferencia significativa en la viabilidad de la integridad de acrosoma en semen refrigerado entre Optixcel (40,7 %) y Triladyl (39,7 %), pero en semen congelado Optixcel mostró una mayor viabilidad (36 %) que Triladyl (30,7 %).

VII. RECOMENDACIONES

1. Asegurarnos de que el animal esté cómodo y tranquilo durante el proceso de recolección para evitar el estrés, lo que podría afectar la calidad del semen.
2. Seguir cuidadosamente los protocolos de refrigeración o congelación del semen para mantener su viabilidad y funcionalidad.
3. Utilizar contenedores adecuados y condiciones de temperatura controlada para el transporte del semen desde el lugar de recolección hasta el laboratorio.
4. Fomentar la actualización continua del conocimiento y la adopción de buenas prácticas en el laboratorio.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdel-Aziz Swelum, A., M Saadeldin, I., BA-Awadh, H., G AL-Mutary, M., F Moumen, A., N Alowaimer, A., & Abdalla, H. (2019). Efficiency of Commercial Egg Yolk-Free and Egg Yolk-Supplemented Tris-Based Extenders for Dromedary Camel Semen Cryopreservation. *Animals: an open access journal from MDPI*, 9(11), 999.<https://doi.org/10.3390/ani9110999>
2. Aisen EG. (2004). Recolección y evaluación de semen. En: Aisen EG, director. *Reproducción Ovina y Caprina*. 1a ed. Buenos Aires: Inter-Médica.
3. Ansari MS, Rakha BA, Akhter S, Ashiq M. (2016). OPTIXcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. *Theriogenology*. 85:528–532.
4. Apaza-Callisaya, B.N., Loza-Murguía, M., Quispe, C.H., Machicado, R.M., & Achu-Nina, C. (2020). Parámetros cinéticos de espermatozoides en semen fresco y crioconservado de alpaca (*Vicugna pacos* L.). *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 7(1), 17-29.
5. Ávila LM, Madero JI, López C, León MF, Acosta L, & Gómez C. (2006). Fundamentos de Criopreservación. *Rev Colomb Obstet Ginecol*. 57:291–300.
6. Cabrera, P.L. (2021). Integridad de la membrana citoplasmática en semen refrigerado y congelado de toros usando dos dilutores sintéticos. [Tesis para optar el título de ingeniero zootecnista]. Universidad Nacional Agraria la Molina; Lima.
7. Calderón, 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 para optar el título de médico veterinario y zootecnista]. Universidad Nacional del Altiplano, Puno.
8. Calle, C. (2020). Evaluación de semen bovino utilizando medios comerciales de criopreservación, provincia de Morona Santiago, Ecuador. [Trabajo final para optar el grado académico especialista en reproducción bovina]. Universidad Nacional de Córdoba, Colombia.
9. Carretero, M.I., Fumuso, F.G., Miragaya, M., Giuliano, S.M., (2015). Evaluación del estado acrosomal de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Spermova*. 5(2):258-63.
10. Capcha, MR. (2016). Efecto de la selección por ganancia media diaria durante el engorde sobre la calidad espermática en conejo [Tesis de fin de master]. Universidad Politécnica de Valencia, España.
11. Cueva, RCP. (2018). Integridad acrosomal y de la membrana plasmática en espermatozoides de *Vicugna pacos* “alpaca” recuperados de semen fresco, refrigerado y congelado. [Tesis para optar el título profesional de biólogo especialidad de biotecnología]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho.
12. Davies K. J. (1999). The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB life*, 48(1), 41–47. <https://doi.org/10.1080/713803463>
13. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
14. Fumuso F, Carretero M, Neild D, Miragaya M, Giuliano S. Evaluación de la viabilidad y el estado acrosomal de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Resultados preliminares. En: I Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2015.p.399-402.
15. Giuliano SM, Bisiau C, Carretero MI, Arraztoa CC, Neild D. Use of Comassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet* .2012; 14(1): 279.

16. Gonzales, G.W. (2016). Evaluación de tres métodos para uso de albúmina sérica bovina en el sexado de espermatozoides de toros [Tesis para optar el título de médico veterinario]. Universidad Nacional Agraria La Molina; Lima.
17. Gómez, O.E. (2020). Diseño y evaluación de un método de conservación de semen de Alpaca (*Vicugna pacos*) en medio sólido [Tesis para optar el grado de doctor en ciencia animal]. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.
18. Hafez ESE. (2000). Reproducción e Inseminación Artificial en Animales, Traducido por: Roberto Palacios Martínez. 6a ed. México: Editorial Interamericana - Mc Graw – Hill.
19. Hidalgo, C.O., Tamargo, M.C., & Díez, M.C. (2015). Análisis del semen bovino. 2a ed. Villaviciosa: Serida.
20. Kang, S.-S., Lee, M.-S., Kim, U.-H., Lee, S.-D., Yang, B.-C., Yang, B.-S., & Cho S.-R. (2019). Effect of Optixcell and Triladyl extenders on frozen-thawed sperm motilities and calving rates following artificial insemination in Hanwoo. Korean Journal of Agricultural Science, 46(1), 195–204. <https://doi.org/10.7744/KJOAS.20190009>
21. Leeuw FE, Colembrander B, Verkleij AJ. (1991). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. J Androl. 12(1):112-8.
22. Kovács, A., & Foote, R. H. (1992). Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission, 67(3), 119. <https://doi.org/10.3109/10520299209110020>
23. Luna-Orozco, J. R., Gonzales-Ramos, M. A., Calderón-Leyva, G., Gaytán-Alemán, L. R., Arellano-R, F., Ángel-García, O., & Véliz-Deras, F. G. (2019). Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. Iranian journal of veterinary research, 20(2), 126–130.
24. Manosalva I., Cortés, C., Leyva V., Valdivia C., De Los Reyes, M., Barros C., Barros R., & Moreno M. (2005). Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, Integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 16(2), 114-128.
25. Medeiros, C. M., Forell, F., Oliveira, A. T., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology, 57(1), 327–344. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00674-4).
26. Minitube.com. Androvisión-más que un CASA. Alemania: Minitube.com; 2017-[actualizada diciembre de 2017; acceso 25 de enero de 2021]. Disponible en: https://www.minitube.es/pdf/index/12500010_LeafletandroVision_es_171205.pdf.
27. Moína, M. (2014). Efecto de dos dilutores y dos métodos de congelación sobre la viabilidad de espermatozoides epididimarios de alpaca (*vicugna pacos*) obtenidos postmortem sólido [Tesis para optar el título de ingeniero zootecnista]. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.
28. Montenegro Troya, A. C. (2022). Evaluación de tres crioprotectores para la crioconservación de semen de cuy (*Cavia porcellus*) extraído de la cola del epidídimo en el Centro Experimental Uyumbicho. Trabajo de titulación modalidad Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador, Quito.
29. Muiño 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, Coruña.
30. Ordoñez, C., Montenegro, V., Vásquez, R., & Morán, G. (2015). Evaluación de tres dilutores en la criopreservación de semen de alpaca (*Vicugna pacos*) en pelets. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 26(3), 352-359.
31. Röpke, T., Oldenhof, H., Leiding, C., Sieme, H., Bollwein, H., & Wolkers, W. F. (2011). Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. Theriogenology, 76(8), 1465–1472. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.015>

32. Rota, A., Linde, F., Catharina, V., Romagnoli, Stefano., & Rodriguez- Martinez, H. (2011). Cryosurvival of Dog Spermatozoa at Different Glycerol Concentrations and Freezing/Thawing Rates. *Reproduction in Domestic Animals*. 33.355 — 361.
33. Santiani, A., Pérez-Rosales, M., & Challco, C. (2020). Caracterización básica y funcional del semen del Perro sin Pelo del Perú [Basic and functional characterization of the Peruvian Hairless Dog semen]. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(4), octubre, diciembre, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v31i4.19251>
34. Santoso, A., Herdis, Arifiantini, R. I., Gunawan, A., & Sumantri, C. (2021). Characteristics and Potential Production of Frozen Semen of Pasundan Bull. *Tropical Animal Science Journal*, 44(1), 24-31. DOI: <https://doi.org/10.5398/tasj.2021.44.1.24>
35. Suárez Pinedo, M. (2014). Efecto de la suplementación de L-Cisteína en el Dilutor Tes-Tris-Yema, sobre la calidad espermática post-descongelamiento en alpaca. [Tesis para optar al Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
36. Suhevic, J, Malcervelli, D, Torres, P, Fratto C, Miguel, J, Fischman, ML. (2015). Determinación de la calidad de las membranas espermáticas porcinas mediante triple tinción fluorocrómica en semen fresco y refrigerado. *Spermova*. 5. 134-138. 10.18548/aspe/0002.30.
37. Tartaglionea, C. M., & Rittaa, M. N. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. School of Agrarian Sciences, University of Lomas de Zamora, Buenos Aires, Argentina & Instituto de Biología y Medicina Experimental, Obligado 2490, 1428-Buenos Aires, Argentina. Received 17 October 2002; accepted 15 January 2004.
38. Trujillo Bravo, J. (2019). Estudio Histológico del Espermatozoide de Alpacas y su correlación con las características microscópicas de calidad Seminal en el fundo Ucrucancha . Tesis para optar al título profesional de Ingeniero Zootecnista, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Formación Profesional de Zootecnia.cerro de Pasco.
39. Vargas, P. (2015). Efecto del factor dilutor y raza en la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen crioconservado de carneros [Tesis de pregrado]. Universidad Nacional del Altiplano, Puno.
40. Watson P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60-61, 481–492. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00099-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00099-3)

ANEXOS

Anexo 1. Registro total de datos: valores en porcentaje de la media y desviación estándar de la integridad acrosomal y de membrana plasmática de espermatozoides de seis machos reproductores de *Vicugna pacos* “alpaca” sometidos a diferentes momentos en semen refrigerado y congelado, utilizando los dilutores Optixcell y Triladyl. INIA. Ayacucho, 2021.

Código de arete	Semen Refrigerado				Semen Congelado			
	Integridad de membrana espermatica (%)		Integridad del acrosoma (%)		Integridad de membrana espermatica (%)		Integridad del acrosoma (%)	
	Optixcell	Triladyl	Optixcell	Triladyl	Optixcell	Triladyl	Optixcell	Triladyl
	Media ± D.S	Media ± D.S	Media ± D.S	Media ± D.S	Media ± D.S	Media ± D.S	Media ± D.S	Media ± D.S
B	72.3 ± 2.5	69.0 ± 3.6	40.7 ± 1.2	39.7 ± 1.5	58.3 ± 2.9	51.7 ± 2.9	36 ± 1.7	30.7 ± 1.2
C	53.3 ± 2.9	50.7 ± 5.1	31.3 ± 1.2	30.0 ± 2.0	32.3 ± 2.5	28.3 ± 2.9	21.3 ± 1.2	20.7 ± 1.2
M12006	54.0 ± 12.8	49.7 ± 10.5	35.0 ± 3.0	29.0 ± 6.1	36.3 ± 15.1	27.7 ± 15.8	26.0 ± 8.9	19.0 ± 9.9
M9184	68.8 ± 13.5	63.2 ± 11.9	40.7 ± 8.8	36.3 ± 7.2	54.7 ± 11.3	48.7 ± 11.3	33.2 ± 4.9	30.4 ± 6.3
M9210	60.3 ± 11.0	46.0 ± 6.1	34.0 ± 4.4	29.7 ± 1.5	44.0 ± 14.7	36.3 ± 12.2	29.3 ± 4.7	25.3 ± 6.4
S/A	57.9 ± 9.2	52.6 ± 8.3	36.8 ± 9.3	31.4 ± 7.6	46.5 ± 8.0	40.3 ± 7.0	27.6 ± 4.5	25.2 ± 4.9

Anexo 2. Prueba de ANOVA del efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad de la membrana espermática en semen refrigerado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	2456.75	11	223.34	3.16	0.009	
ARETE	1990.92	5	398.18	14.66	0.0052	(ARETE*DILUTOR)
DILUTOR	330.03	1	330.03	12.15	0.0175	(ARETE*DILUTOR)
ARETE*DILUTOR	135.81	5	27.16	0.38	0.8548	
Error	1698	24	70.75			
Total	4154.75	35				
Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)						
DILUTOR	Medias		n		E.E.	
OPTIXCEL	61.11		18		1.23	A
TRILADYL	55.06		18		1.23	B

Anexo 3. Prueba de ANOVA del efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad del acrosoma en semen refrigerado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	625.64	11	56.88	2.98	0.0122	
ARETE	457.14	5	91.43	12.61	0.0073	(ARETE*DILUTOR)
DILUTOR	132.25	1	132.25	18.24	0.0079	(ARETE*DILUTOR)
ARETE*DILUTOR	36.25	5	7.25	0.38	0.8575	
Error	458	24	19.08			
Total	1083.64	35				

Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)					
DILUTOR	Medias		n	E.E.	
OPTIXCEL	36.61		18	0.63	A
TRILADYL	32.78		18	0.63	B

Anexo 4. Prueba ANOVA del efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad de la membrana espermática en semen congelado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	3418.22	11	310.75	3.43	0.0056	
ARETE	3024.56	5	604.91	152.07	<0.0001	(ARETE*DILUTOR)
DILUTOR	373.78	1	373.78	93.97	0.0002	(ARETE*DILUTOR)
ARETE*DILUTOR	15.89	5	3.98	0.04	0.9987	
Error	2171.33	24	90.47			
Total	5589.56	35				
Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)						
DILUTOR		Medias		n	E.E.	
OPTIXCEL		45.33		18	0.47	A
TRILADYL		38.89		18	0.47	B

Anexo 5. Prueba de ANOVA del efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad del acrosoma en semen congelado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo	877.42	n	79.77	3.08	0.0102	
ARETE	720.25	5	144.05	18.09	0.0032	(ARETE*DILUTOR)
DILUTOR	117.36	1	117.36	14.74	0.0121	(ARETE*DILUTOR)
ARETE*DILUTOR	39.81	5	7.96	0.31	0.9036	
Error	621.33	24	25.89			
Total	1498.75	35				
Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)						
DILUTOR	Medias		n		E.E.	
OPTIXCEL	28.89		18		0.67	A
TRILADYL	25.28		18		0.67	B

Anexo 6. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para % de viabilidad por tratamientos de integridad de la membrana espermática (IME) de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.

SEMEN REFRIGERADO

Tratamiento	Shapiro-Wilk	
	W	Sig.
SEMEN REFRIGERADO-OPTIXCEL	0.88	0.0696
SEMEN REFRIGERADO-TRILADYL	0.90	0.1628

SEMEN CONGELADO

Tratamiento	Shapiro-Wilk	
	W	Sig.
SEMEN CONGELADO-OPTIXCEL	0.93	0.3822
SEMEN CONGELADO-TRILADYL	0.95	0.7205

Anexo 7. Prueba de homogeneidad de varianzas de Bartlett's K-squared para % de viabilidad por tratamientos de integridad de la membrana espermática (IME) de *Vicugna pacos* "alpaca". INIA. Ayacucho, 2021.

SEMEN REFRIGERADO

Método	Estadística de prueba	Valor p
Bartlett's K-squared	0.0205	0.886

SEMEN CONGELADO

Método	Estadística de prueba	Valor p
Bartlett's K-squared	0.0043	0.9477

Anexo 8. Prueba de normalidad de Anderson-Darling para % de viabilidad por tratamientos de integridad del acrosoma (IA) de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.

SEMEN REFRIGERADO

Tratamiento	Shapiro-Wilk	
	W	Sig.
SEMEN REFRIGERADO-OPTIXCEL	0.88	0.0505
SEMEN REFRIGERADO-TRILADYL	0.91	0.1760

SEMEN CONGELADO

Tratamiento	Shapiro-Wilk	
	W	Sig.
SEMEN CONGELADO-OPTIXCEL	0.94	0.5178
SEMEN CONGELADO-TRILADYL	0.96	0.7506

Anexo 9. Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene para % de viabilidad por tratamientos de integridad del acrosoma (IA) de *Vicugna pacos* “alpaca”.INIA. Ayacucho, 2021.

SEMEN REFRIGERADO

Método	Estadística de prueba	Valor p
Bartlett's K-squared	2.48e-05	0.996

SEMEN CONGELADO

Método	Estadística de prueba	Valor p
Bartlett's K-squared	0.0192	0.8927

Anexo 10. Estadísticas descriptivas para porcentaje de integridad de la membrana espermática (IME) de *Vicugna pacos* “alpaca”.INIA. Ayacucho, 2021.

Tratamiento	Variable	COLOR	Media	Desv.Est.	Varianza	Mínimo	Máximo
Semen refrigerado	OPTIXCEL	Blanco lech.	55	5.6	30.9	51	63
		Semi lechoso	60	11.5	132.9	43	78
		Transparente	72	2.5	6.3	70	75
	TRILADYL	Blanco lech.	51	4.6	20.7	46	57
		Semi lechoso	53	10.2	104.8	39	70
		Transparente	69	3.6	13.0	65	72
Semen congelado	OPTIXCEL	Blanco lech.	46	2.5	6.0	44	49
		Semi lechoso	42	14.0	194.9	19	63
		Transparente	58	2.9	8.3	55	60
	TRILADYL	Blanco lech.	42	2.2	4.7	40	45
		Semi lechoso	34	13.3	177.2	14	60
		Transparente	52	2.9	8.3	50	55

Anexo 11. Estadísticas descriptivas para porcentaje de integridad del acrosoma (IA) de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.

Tratamiento	Variable	COLOR	Media	Desv.Est.	Varianza	Mínimo	Máximo
Semen refrigerado	OPTIXCEL	Blanco lech.	37	5.6	31.3	32	45
		Semi lechoso	35	5.6	31.3	30	47
		Transparente	41	1.2	1.3	40	42
	TRILADYL	Blanco lech.	32	2.9	8.7	29	36
		Semi lechoso	31	5.2	27.2	22	40
		Transparente	40	1.5	2.3	38	41
Semen congelado	OPTIXCEL	Blanco lech.	28	1.0	0.9	27	29
		Semi lechoso	27	6.9	47.4	16	38
		Transparente	36	1.7	3.0	35	38
	TRILADYL	Blanco lech.	26	2.2	4.7	23	28
		Semi lechoso	24	7.6	57.5	8	37
		Transparente	31	1.2	1.3	30	32

Anexo 12. Armado de la vagina artificial antes de envolver con las frasadillas para la colecta de semen de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.



Anexo 13. Armado total de la vagina artificial y recolección de semen de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.



Anexo 14. Procesamiento de muestras de semen de *Vicugna pacos* “alpaca” para su evaluación de integridad del acrosoma y membrana espermática. INIA. Ayacucho, 2021.



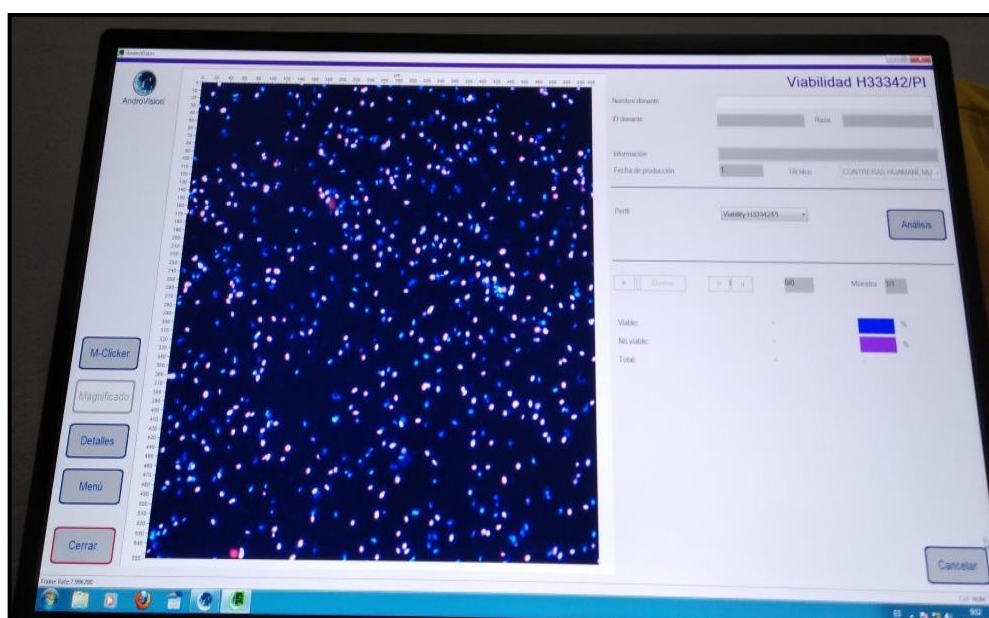
Anexo 15. Registro de las muestras de semen de *Vicugna pacos* “alpaca” para su evaluación macroscópica. INIA. Ayacucho, 2021.

DATOS GENERALES										DATOS DE EVALUACIÓN									
FECHA	AMPA	CELE	ESPE	SEDA	SEDA (cm)	N. SEM	N. SEM	FECHA DE SEM	SEDA	SEDA (cm)	SEDA (cm)	SEDA (cm)	SEDA (cm)	SEDA (cm)	SEDA (cm)	SEDA (cm)	SEDA (cm)	SEDA (cm)	SEDA (cm)
08-05-21	7210	B	H	V.A	7.00	0.25	0.5	0.5	0	0	140	70							
08-05-21	7210	E	H	V.A	7.00	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
08-05-21	7210	C	H	V.A	7.00	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
09-05-21	7210	C	H	V.A	7.50	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
09-05-21	7210	S/A	N	S	V.A	7.50	0.5	0.5	1	1	70								
09-05-21	7210	B	H	V.A	7.50	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
12-05-21	7210	B	H	V.A	7.50	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
12-05-21	7210	B	H	V.A	7.50	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
12-05-21	7210	S/A	N	H	V.A	7.50	0.5	0.5	0	1.2	85	102	80	70	60	60	40	30	30
12-05-21	7210	LF	H	V.A	8.00	0.5	0.5	0.5	0	0	70								
12-05-21	7210	B	H	V.A	8.00	0.5	0.5	0.5	0	3	70								
14-05-21	7210	C	H	V.A	8.00	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
14-05-21	7210	B	H	V.A	8.00	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
14-05-21	7210	B	H	V.A	8.00	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
15-05-21	7210	S/A	N	H	V.A	8.00	0.5	0.5	0	5	80								
15-05-21	7210	B	H	V.A	8.00	0.15	0.5	0.5	0	0	70								
15-05-21	7210	B	H	V.A	8.00	0.15	0.5	0.5	0	1	70								

Anexo 16. Observación microscópica de espermatozoides vivos y muertos con y sin acrosoma de *Vicugna pacos* “alpaca”, utilizando la triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa. INIA. Ayacucho, 2021.



Anexo 17. Equipo de AndroVision (Sistema CASA) para la evaluación de la integridad de membrana espermática y observación microscópica de espermatozoides con membrana intacta y dañada de *Vicugna pacos* “alpaca”, usando el colorante fluorescente Hoechst 33342/PI. INIA. Ayacucho, 2021.



Anexo 18. Composición de los Dilutores Optixcell y Triladyl para la preservación de los espermatozoides usados en semen refrigerado y congelado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.



- ❖ Liposomas
- ❖ Tampones
- ❖ Glicerol
- ❖ Proteínas
- ❖ Sales
- ❖ Azúcares
- ❖ Agentes protectores de membrana

Anexo 19. Composición de los Dilutores Optixcell y Triladyl para la preservación de los espermatozoides usados en semen refrigerado y congelado de *Vicugna pacos* “alpaca”. INIA. Ayacucho, 2021.



- ❖ TRIS
- ❖ Ácido cítrico
- ❖ Azúcar
- ❖ Tampones
- ❖ Glicerina
- ❖ Antibióticos
- ❖ Agua de extrema pureza

Anexo 20. Matriz de consistencia

Título: Efecto de dos dilutores en la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen refrigerado y congelado de *Vicugna pacos* “alpaca”.

Ayacucho – 2021

Autor: Bach. ALARCÓN CRISANTE, Coralí

PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Cuál será efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad de la membrana espermática y del acrosoma después del proceso de refrigeración y congelación en el semen de alpaca?	Objetivo general: Evaluar el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl en la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen de alpaca refrigerado y congelado. Objetivos específicos: 1. Evaluar el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen refrigerado. 2. Evaluar el efecto de los dilutores Optixcell y Triladyl sobre la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen congelado. 3. Evaluar la integridad de membrana y acrosoma por color de semen en estado fresco refrigerado y congelado usando dilutor Optixcell y Triladyl	Antecedentes Marco Conceptual . Antecedentes . Estructura del espermatozoide . Integridad del acrosoma . Integridad de la membrana espermática . Refrigeración del semen . Congelación del semen . Función de los diluyentes en la criopreservación del semen. . Dilutores usados en la congelación de semen . Técnicas para la evaluación de la integridad acrosomal . Tinción compuesta azul de tripán, rojo neutro y solución de Giemsa . Técnicas para la evaluación de la integridad de membrana espermática . Test hipoosmótico (HOS)	Los dilutores Optixcell y Triladyl tienen efecto protector sobre la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen refrigerado y congelado conservando mejor sus estructuras.	Variable independiente Los dilutores Optixcell y Triladyl Variable dependiente Integridad de la membrana espermática y del acrosoma	Tipo de investigación: Básica Nivel de investigación: Experimental básica Diseño: Experimental Muestreo: Aleatorio Técnicas: Observación Determinación Instrumentos: Observación Triple tinción azul de tripán, rojo neutro y Giemsa tinción fluorescente de Hoechst 33342/PI

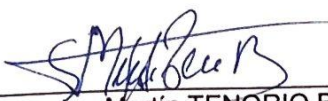
**UNSCH**FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Corali ALARCON CRISANTE
RESOLUCIÓN DECANAL N 450-2024-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día lunes cuatro de noviembre del año dos mil veinticuatro; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente el Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA (miembro jurado), Dr. Jesús Javier ÑACCHA URBANO (miembro – jurado), Mg. Sonia Haydee PALOMINO FELICES (miembro - jurado), Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA (miembro – asesor), actuando como secretario docente el Mg. Luis Uriel MOSCOSO GARCÍA; para presenciar el acto de sustentación de tesis titulada: **Efecto de dos dilutores en la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen refrigerado y congelado de *Vicugna pacos* "alpaca". Ayacucho – 2021**, presentado por la **Bach. Corali ALARCON CRISANTE**, el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando a la sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas a la sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó a la sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

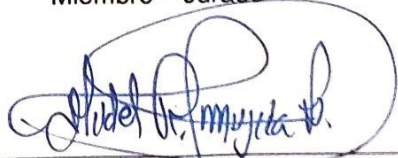
Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta a preguntas	Promedio
Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA	15	15	15
Dr. Jesús Javier ÑACCHA URBANO	15	14	15
Mg. Sonia Haydee PALOMINO FELICES	13	11	12
		PROMEDIO	14

La sustentante alcanzó el promedio de 14 aprobatorio. Acto seguido, el presidente autorizó el ingreso de la sustentante y el público al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis con quince minutos; firmando al pie del presente en señal de conformidad.


Dr. Saturnino Martín TENORIO BAUTISTA
Presidente – Miembro Jurado


Dr. Jesús Javier ÑACCHA URBANO
Miembro – Jurado


Mg. Sonia Haydee PALOMINO FELICES
Miembro – Jurado


Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA
Miembro – Asesor


Mg. Luis Uriel MOSCOSO GARCÍA
Secretario – Docente



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA - ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

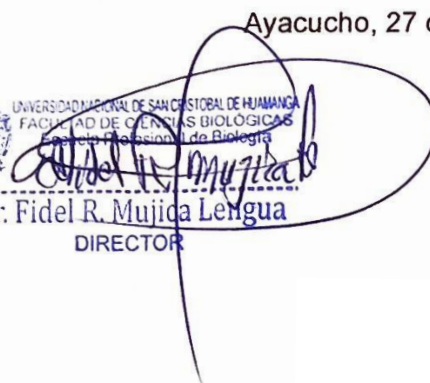
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

Nº 001-2025-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Efecto de dos dilutores en la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen refrigerado y congelado de *Vicugna pacos* "alpaca". Ayacucho – 2021**, por CORALI ALARCON CRISANTE; 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 Nº 039-2021-UNSCH-CU.

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

Ayacucho, 27 de febrero de 2025.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela Profesional de Biología
Dr. Fidel R. Mujica Lengua
DIRECTOR

Efecto de dos dilutores en la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen refrigerado y congelado de Vicugna pacos “alpaca”.

Ayacucho - 2021

por Corali ALARCON CRISANTE

Fecha de entrega: 27-feb-2025 12:52p.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2600460284

Nombre del archivo: d_ALARCON_CRISANTE-Corali-pregrado-2025_TURNITIN_PDF.pdf (1.61M)

Total de palabras: 11865

Total de caracteres: 62922

Efecto de dos dilutores en la integridad de la membrana espermática y del acrosoma en semen refrigerado y congelado de Vicugna pacos "alpaca". Ayacucho - 2021

INFORME DE ORIGINALIDAD

26%

INDICE DE SIMILITUD

27%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	17%
2	repositorio.unamba.edu.pe Fuente de Internet	2%
3	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	2%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
5	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	1%
6	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1%
7	dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet	<1%
8	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	<1%
9	dehesa.unex.es:8080 Fuente de Internet	<1%
10	dev.scielo.org.pe Fuente de Internet	<1%
11	www.researchgate.net Fuente de Internet	

<1%

Excluir citas	Activo	Excluir coincidencias	< 30 words
Excluir bibliografía	Activo		