

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*



**“Evaluación del Método de Colecta y del Dilutor sobre la Viabilidad  
de Espermatozoides Criopreservados de Alpaca”**

Tesis para optar el Título Profesional de  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Mariana Ángela Tamayo Salas**  
Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

**LIMA - PERÚ**

**2021**

Dedico este trabajo a mis padres y a mi hermana,  
quienes me brindaron su apoyo en todo momento.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Hugo Deza, mi Asesor de Tesis, por su apoyo profesional, guía y paciencia durante todo el tiempo del proyecto de investigación.

Al Dr. Teodosio Huanca, director del CIP Quimsachata, por sus conocimientos brindados, por su colaboración en el proyecto de investigación y por la aprobación del mismo.

Al Dr. Armando Nina, por su orientación profesional y colaboración en la ejecución del trabajo de investigación, tanto en el manejo de los animales como en el procesamiento de las muestras.

A mis padres y a mi hermana, que me brindaron apoyo incondicional y me aconsejaron durante el tiempo de ejecución del proyecto.

A Juan Diego, por su orientación, por sus consejos en momentos complicados y por motivarme en ser mejor persona y profesional.

## ABSTRACT

The aim of this study was to compare seminal characteristics of samples obtained by artificial vagina (AV) and by deviation of the vas deferens (DVD) processed with two different extenders (Steridyl® and Tris-lactose-egg yolk), the interaction effect was evaluated between both factors. Samples were collected from 6 adult male alpacas, 3 for the AV collection and 3 for the DVD collection. Vitality was assessed by Hoesch-Pi (Propidium Iodine) and functional membrane integrity and presence of acrosome were simultaneously assessed by the hypoosmotic test in combination with Coomassie Blue stain. Other characteristics like motility, sperm concentration and morphology were also evaluated. Post-thawing samples obtained by DVD and diluted with tris showed higher progressive motility ( $15.0 \pm 7.5\%$ ) and Steridyl ( $15.6 \pm 7.7\%$ ), whereas the lowest results were shown in samples obtained by AV diluted with tris ( $2.1 \pm 3.4\%$ ) and Steridyl ( $2.9 \pm 3.4\%$ ). Membrane integrity and vitality were superior in samples obtained by DVD diluted with tris ( $19.6 \pm 11.7\%$ ;  $31.4 \pm 8.4\%$ , respectively), in comparison with the results obtained by DVD diluted with Steridyl ( $12.1 \pm 4.6\%$ ,  $29.3 \pm 9.7\%$ ) and with the results obtained by AV diluted with the same extender ( $12.1 \pm 4.6\%$ ,  $11.6 \pm 4.2\%$ ). The lowest values were observed in samples collected by AV diluted with tris ( $9.8 \pm 3.4\%$ ;  $9.9 \pm 3.9\%$ ). The results indicate that the samples obtained by DVD, either way diluted with tris or steridyl, showed the best results during the cryopreservation process in alpaca semen.

Key words: cryopreservation, extender, alpaca, artificial vagina, vas deferens

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar características seminales de muestras obtenidas mediante vagina artificial (VA) y desviación del conducto deferente (DCD), procesadas con dos dilutores (Steridyl y Tris-lactosa-yema de huevo), evaluándose los resultados sobre las características seminales producto de la interacción de ambos factores. Se utilizaron 6 alpacas machos adultos, 3 para la colecta por VA y 3 para la colecta por DCD. Para la evaluación microscópica, se utilizaron técnicas de fluorescencia Hoesch-Pi (Ioduro de Propidio) para determinar la vitalidad y el test hipoosmótico en combinación con la tinción Azul de Coomassie para evaluar la integridad funcional de membrana y presencia de acrosoma. Se evaluaron también otros parámetros como la motilidad, concentración y morfología espermática. A la descongelación, una ventaja significativa se apreció en la motilidad individual progresiva en las muestras colectadas por DCD diluidas con tris ( $15.0 \pm 7.5\%$ ) y Steridyl ( $15.6 \pm 7.7\%$ ), mientras que las menores respuestas se observaron en las muestras colectadas por VA diluidas con tris ( $2.1 \pm 3.4\%$ ) y Steridyl ( $2.9 \pm 3.4\%$ ). La integridad de membrana y vitalidad a la descongelación fueron superiores en las muestras colectadas por DCD diluidas con tris ( $19.6 \pm 11.7\%$ ;  $31.4 \pm 8.4\%$ , respectivamente), en comparación a las colectadas por DCD diluidas con Steridyl ( $12.1 \pm 4.6\%$ ,  $29.3 \pm 9.7\%$ ) y de aquellas colectadas por VA y diluidas con el mismo dilutor ( $12.1 \pm 4.6\%$ ,  $11.6 \pm 4.2\%$ , respectivamente); los menores valores se observaron en las muestras colectadas por VA diluidas con tris ( $9.8 \pm 3.4\%$ ;  $9.9 \pm 3.9\%$ , respectivamente). Los resultados indican que las muestras obtenidas por desviación de conducto deferente ya sea que fueran diluidos con tris o Steridyl tuvieron los mejores resultados en la criopreservación de semen de alpacas.

Palabras clave: criopreservación, dilutor, alpaca, vagina artificial, conducto deferente

## INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos y en particular las alpacas cumplen un rol importante en el sustento económico de muchas comunidades campesinas de la zona Altoandina del Perú (Raymundo *et al.*, 2006); debido a que involucran a por lo menos un millón y medio de personas, que se encuentran ubicadas en aquellas regiones del país caracterizadas por ser las de mayor pobreza y marginación (Machaca *et al.*, 2017). Una forma de mejorar la calidad de vida de las mismas sería aportando al mejoramiento de los índices tanto productivos como reproductivos de sus rebaños y como tal sus ingresos económicos. Esto podría ser posible aplicando biotecnologías reproductivas asistidas como la criopreservación de semen e inseminación artificial, que por un lado permitirían la obtención de crías con características productivas y reproductivas superiores y por otro maximizarían el uso de machos con características genéticas deseables., además de controlar la transmisión de enfermedades entre rebaños. (Kershaw y Maxwell, 2011; Abraham *et al.*, 2017).

Sin embargo, estos métodos se encuentran aún en desarrollo en camélidos sudamericanos, debido principalmente a la baja calidad del semen y a la naturaleza viscosa del plasma seminal en llamas y alpacas (Kershaw y Maxwell, 2011; Alarcón *et al.*, 2012). Por otra parte, la colección de semen en camélidos sudamericanos puede significar un desafío debido al comportamiento de apareamiento, incluyendo la postura y el tiempo de duración de la cópula, la deposición intrauterina del semen y la eyaculación constante durante el apareamiento (Morton *et al.*, 2010). Razones por las que se han desarrollado diversas técnicas de colección de semen, siendo las principales la vagina artificial, electroeyaculación, la aspiración vaginal post coital y la colección de espermatozoides del conducto deferente (Tibary y Vaughan, 2006;Pérez *et al.*, 2014)

La colección de semen por vagina artificial implica simular una monta natural permitiendo al macho montar un maniquí con forma de alpaca, siendo la principal ventaja que el eyaculado colectado es representativo a uno obtenido durante monta natural; sin embargo, esta técnica involucra un entrenamiento previo del macho (Kershaw-Young y Maxwell, 2011; Alarcón *et al.*, 2012). La electroeyaculación no requiere que el macho este entrenado, pero tiene el inconveniente de que las muestras obtenidas presentan bajo volumen y son de baja calidad, además pueden estar contaminadas con orina y debris celular. (Tibary y Vaughan, 2006; Choez *et al.*, 2015; Abraham *et al.*, 2017). La aspiración vaginal es una técnica controversial (Abraham *et al.*, 2017), no permite obtener la porción completa del eyaculado y la muestra suele encontrarse contaminada con secreciones vaginales y glóbulos rojos (Giuliano, 2012). Además, este método implica realizar una monta natural, por lo que la posibilidad de una infección uterina es elevada, y puede suceder debido a la postura de apareamiento, por la manipulación antihigiénica de los genitales y por la inflamación uterina (Dellepiane y Morales-Cauti, 2018). La desviación del conducto deferente, es una técnica de colecta desarrollada pocos años atrás, que implica desviar quirúrgicamente el conducto deferente de alpacas macho con el fin de obtener una muestra de espermatozoides sin presencia de plasma seminal (Pérez *et al.*, 2014). Esta técnica tiene como principal ventaja que los espermatozoides presentan una mayor motilidad progresiva y facilita su manejo en el laboratorio por la ausencia de la viscosidad del plasma seminal (Giuliano, 2012).

Los dilutores comúnmente utilizados para la preservación de semen de rumiantes han sido aplicados también al semen de alpacas y llamas, con una amplia variación en los resultados de viabilidad y motilidad del semen después de la dilución, refrigeración y congelación. (Bravo *et al.*, 2013). Entre los dilutores utilizados están la leche descremada, Tris, Tes, citrato y PBS (Banda *et al.*, 2010; Morton *et al.*, 2007; Pérez *et al.*, 2014). Hasta la actualidad no hay un consenso sobre el dilutor de elección para el manejo y conservación de semen de camélidos sudamericanos; así mismo, hay una gran variación en las fórmulas empleadas en la preparación de los mismos. Por tales motivos se desarrolló el presente trabajo de investigación con el objetivo de comparar las características seminales de muestras obtenidas mediante dos métodos de colecta

de semen (vagina artificial y desviación de conducto deferente) y procesadas con dos dilutores (Tris-lactosa-yema de huevo y Steridyl). Con los resultados, se busca aportar información para la elaboración de protocolos de criopreservación de semen de alpaca y contribuir con el desarrollo de las biotecnologías reproductivas en estas especies.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. LUGAR DE ESTUDIO**

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Producción Quimsachata, anexo del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) Puno, ubicado en el distrito de Santa Lucía, provincia de Lampa, departamento de Puno y a una altitud promedio de 4300 msnm.

### **2. TIPO DE ESTUDIO**

La investigación corresponde a una de tipo experimental transversal.

### **3. POBLACIÓN OBJETIVO Y TAMAÑO DE MUESTRA**

Se utilizaron seis (06) alpacas machos adultos de raza Huacaya pertenecientes al Centro de Investigación y Producción Quimsachata; de ellos, tres (03) machos se encontraban entrenados para la colecta de semen por vagina artificial (VA) y tres (03) tenían la desviación del conducto deferente (DCD). El número de animales empleados fue condicionado por la disponibilidad de los mismos en el CIP Quimsachata, Los animales del estudio estaban entrenados o preparados para la colecta de semen y fueron seleccionados del rebaño de machos reproductores tomando en consideración el adecuado tamaño testicular, muy buen líbido y docilidad al manejo. Así mismo, se tomó en consideración experimentos previos realizados en alpacas que consideraron un número de animales similar al empleado en el presente experimento (Perez *et al.*, 2014; Ccalta *et al.*, 2017; Carretero *et al.*, 2018; Bertuzzi *et al.*, 2020)

Seis colectas fueron obtenidas por cada macho; las colectas fueron realizadas a intervalos de 2 días hasta completar 6 muestras por la técnica de DCD y 6 muestras por la técnica de VA de

cada uno de los machos donadores, tal como se observa en el cuadro 1. El intervalo entre colectas fue determinado en base experimentos anteriores en alpacas que colectaron los machos 3 veces por semana (Dávalos y Olazabal, 2002).

**Cuadro 1. Número de colectas por macho e intervalo de días entre colectas de semen realizadas por las técnicas de vagina artificial (VA) y desviación de conductos deferentes (DCD)**

Método de colecta	Desviación de conductos deferentes (DCD)			Vagina artificial (VA)		
	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Machos						
Muestras o colectas	6	6	6	6	6	6
Intervalos entre colectas (días)	2	2	2	2	2	2

Fuente: elaboración propia, 2021

#### 4. TRATAMIENTOS

Para la realización del presente estudio se emplearon dos métodos de colecta de semen y dos dilutores para el procesamiento del semen. Los métodos de colecta empleados fueron la vagina artificial (VA) y la desviación del conducto deferente (DCD) y los dilutores de semen empleados fueron el Steridyl® (Minitube, Alemania) y el dilutor Tris-lactosa-yema de huevo (tris), preparado de acuerdo a lo reportado por El-Bahrawy *et al.* (2017), de la siguiente manera: 3.25g de Tris, 5.5g de lactosa, 1.67g de ácido cítrico, 20% de yema de huevo y 3% de glicerol enrazado a un volumen de 100mL con agua bidestilada.

Cuatro tratamientos fueron evaluados en el presente estudio, los cuales fueron producto de la interacción del método de colecta por el dilutor empleado; de esta forma se tuvo T1: colecta por DCD diluido con tris; T2: colecta por DCD diluido con Steridyl; T3: colecta por VA diluido con Steridyl y T4: colecta por VA diluido con tris (cuadro 2).

**Cuadro 2. Tratamientos empleados en el presente estudio**

Método de colecta	Desviación de conducto deferente (DCD)		Vagina artificial (VA)	
	Dilutor empleado	Tris	Steridyl	Steridyl
Tratamiento	T1	T2	T3	T4

Fuente: elaboración propia, 2021

## 5. COLECTA DE SEMEN

### *Técnica de colección de semen por vagina artificial*

La colección de semen se realizó adaptando la técnica descrita por Bravo *et al.* (1997). Realizada de la siguiente manera, se utilizó un maniquí de madera recubierto de cuero y fibra de alpaca que simuló la posición de cópula de una alpaca hembra durante una monta natural. Para esta técnica se utilizó una vagina artificial modificada en base a los modelos de bovinos, la cual fue sujeta en la parte interna y posterior del maniquí. En el presente estudio, la vagina artificial estuvo constituida por el cuerpo, fabricado con un tubo de PVC de un diámetro de 2 pulgadas y 20cm de longitud, una funda recta de látex, una funda cónica fabricada con polipropileno y un tubo cónico de 15mL. Para la colecta se depositó agua caliente a 40°C entre el tubo PVC y la funda de látex, luego se aseguró la funda cónica con el tubo cónico de 15mL a uno de los extremos, finalmente se introdujo aire en la cámara del cuerpo de la vagina artificial hasta que permitiera el ingreso del dedo meñique. Una vez armada, se cubrió la vagina artificial con la frazadilla eléctrica previamente calentada y se procedió a asegurar la vagina artificial al maniquí. Por último, se aplicó lubricante B-lube ® (IMV Technologies) en el extremo expuesto de la vagina artificial para facilitar la entrada del pene.

Previo al inicio de la cópula y colecta, se realizó la higiene del área prepucial del macho donador aplicando pequeñas cantidades de NaCl 0.9% (Cloruro de sodio 9‰ ®, NIPRO Medical

Corporation Ecuador) sobre y alrededor del orificio prepucial con la ayuda de una pizeta, luego el prepucio fue secado suavemente con papel toalla descartable. Una vez listo el macho donador se le condujo al área de colecta donde el macho realizó la monta del maniquí e inició el proceso de cópula. Se midió el tiempo de cópula, desde la intromisión del pene en la vagina artificial hasta que el macho se paró y retiró.

Después de la colecta de semen, tanto el cuerpo de la vagina artificial como las fundas fueron lavadas con agua corriente, frotadas con un cepillo de laboratorio, enjuagadas con agua destilada 3 veces y finalmente colocadas en un horno seco a 60°C hasta su nuevo uso. Un total de 3 vaginas artificiales se tuvieron a disposición para el estudio. En cada día de colecta, se utilizó una vagina artificial diferente para cada macho. Al final del día se realizó el lavado de las mismas para su uso al día siguiente, y de la misma manera en los días posteriores.

#### *Técnica de recuperación de espermatozoides por desviación del conducto deferente*

Esta técnica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Pérez *et al.* (2014). Se sujetó al macho donador y suavemente se realizó el derribo del mismo, se colocó al macho en posición decúbito lateral y se realizó la limpieza de la fístula del conducto deferente con ayuda de una torunda humedecida con agua destilada, se secó el área y a continuación se realizaron suaves masajes con la yema de los dedos desde la cola del epidídimo siguiendo toda la longitud del conducto deferente, con el fin de desplazar los espermatozoides hacia la fístula del conducto deferente. Una vez que se vieron las gotas blanquecinas en la fístula, fueron aspiradas con ayuda de una micropipeta con el tip previamente calentado y humedecido con dilutor correspondiente a cada tratamiento, luego la muestra fue colocada en un vial mantenido en baño María a 37°C que contenía 200µL de dilutor (Steridyl® o Tris, según el tratamiento asignado). Al culminar cada colecta, se cubrió la fístula del conducto deferente con vaselina sólida sin aroma (Vaselina 100% pura ® Laboratorios Portugal, Lima-Perú) y se liberó al macho.

## **6. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS**

### *Dilución*

Una vez colectado el semen, éste fue inmediatamente colocado en un baño María temperado a 37°C, en el cual también se encontraba el tubo con el dilutor correspondiente. Luego de realizar la evaluación microscópica inicial se procedió a realizar la dilución, para ello el volumen del dilutor fue calculado empleando una fórmula (Fórmula 1). Posterior a realizar el cálculo, el dilutor fue adicionado empleando una micropipeta y se realizó la homogenización de la muestra con el dilutor.

Fórmula 1: Determinación del volumen de dilutor (Fórmula adaptada de Knox, 2011).

$$\text{Volumen de dilutor} = \left[ \left( \frac{V_s \times MI \times V \times K_s}{K_d} \right) \times V_d \right] - V_s$$

Donde:

$V_s$  = Volumen de semen del eyaculado obtenido

$MI$  = Motilidad individual del semen al momento de la colecta

$V$  = Vitalidad del semen al momento de la colecta

$K_s$  = Concentración espermática del semen al momento de la colecta

$K_d$  = Concentración deseada por dosis de semen congelado

$V_d$  = Volumen deseado por dosis de semen congelado, que fue 0.5mL debido a que el semen fue envasado en pajillas de 0.5

#### *Evaluación de las características macroscópicas*

La evaluación macroscópica fue dependiente del método de colecta. En las muestras obtenidas por vagina artificial se determinó el volumen y color, según lo descrito por Al-Bulushi *et al.* (2018) y la viscosidad (filancia) fue evaluada según el protocolo de Skidmore *et al.* (2018). Por otro lado, en las muestras obtenidas por desviación del conducto deferente solo se determinó la viscosidad (filancia) y el color.

El volumen y color fueron determinados por observación directa de la cantidad de semen colectado. La viscosidad se determinó a través de la prueba de filancia que consistió en colocar 5uL de semen sobre una lámina portaobjetos, luego con la punta de la micropipeta se fue extendiendo el semen hasta que este se rompa, de esta manera se determinó la medida desde donde se colocó la muestra hasta el punto en el que se rompió el filamento de semen.

#### *Evaluación de las características microscópicas*

La evaluación de las características microscópicas consistió en determinar la motilidad individual progresiva, motilidad individual oscilatoria, concentración, vitalidad, integridad funcional de la membrana, presencia o ausencia de acrosoma, y la morfología espermática.

La motilidad fue evaluada adaptando lo establecido por Kershaw-Young y Maxwell (2011). Se utilizó una platina térmica a 37°C donde fueron colocadas las láminas porta- y cubreobjetos. La motilidad individual se determinó colocando 15ul de muestra en una lámina portaobjetos, que luego fue cubierta con una lámina cubreobjetos y observada en un microscopio óptico a 400X. La motilidad progresiva fue considerada cuando un espermatozoide se movía vigorosamente en forma lineal y progresiva (hacia adelante) y la motilidad oscilante se consideró cuando el espermatozoide se movía en círculos en el mismo lugar. El valor fue reportado en porcentaje y representó la proporción de espermatozoides que se mueven en relación al total de espermatozoides observados en el campo óptico.

La concentración espermática fue realizada empleando la técnica del hemocitómetro descrita en la WHO (2010). Se diluyó el semen (1:200) en agua destilada, posterior a ello, se armó la cámara de Neubauer y se colocó 15 µL de la dilución en cada campo. Una vez realizado esto se procedió a hacer el conteo para determinar la concentración en millones de espermatozoides/mL.

La vitalidad se determinó mediante la tinción de fluorescencia Hoesch-Pi, para lo cual se tomó como guía el protocolo establecido por Santiani *et al.* (2016) con algunas modificaciones. El procedimiento consistió en colocar 12.5 µL de muestra en 125 µL de solución CFDA temperada a 37°C. A esa solución, se agregaron 2 µL del fluorocromo Hoesch y fue incubada a 37°C por 10 minutos. Posterior a ello, se agregó 1 µL de Ioduro de Propidio (Pi) y se incubó a 37°C por 10 minutos. Por último, se observó en microscopio de fluorescencia a 1000X. Se contaron 200 células y se observaron 2 patrones: Azul (vivos) y Rosado (muertos).

La integridad funcional de la membrana y el acrosoma fueron evaluados simultáneamente mediante la combinación de la prueba HOST (Hypo-osmotic Swelling Test) y la tinción Azul de Coomassie. La solución hipoosmótica se preparó según lo establecido por Jeyendran *et al.* (1984). La combinación de ambas técnicas se realizó utilizando el procedimiento descrito por Giuliano *et al.* (2012) y por Carretero *et al.* (2018). Para el protocolo se incubaron 25 µL de muestra en 100 µL de la solución hipoosmótica a 37°C por 20 minutos. Posterior a ello, se agregó 125 µL de paraformaldehído 4% y se incubó por 4 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 10 minutos, pasado el tiempo se quitó el sobrenadante y se realizó un lavado con 125 µL de PBS. Una vez culminado el procedimiento, se colocó 10 µL en una lámina portaobjetos en movimientos circulares y se dejó secar a temperatura ambiente. Cuando la lámina estuvo seca, se aplicó una gota del colorante Azul de Coomassie y se dejó actuar por 5 minutos. Por último, se realizó un lavado con agua destilada para quitar el exceso de colorante, se dejó secar y se observó en el microscopio con aceite de inmersión (1000X). Se contaron 200 células y se identificaron 4 patrones de clasificación:

Espermatozoides con membrana funcional (HOS+) y presencia de acrosoma(CB+)

Espermatozoides con membrana funcional (HOS+) y ausencia de acrosoma (CB-)

Espermatozoides con membrana no funcional (HOS-) y presencia de acrosoma (CB+)

Espermatozoides con membrana no funcional (HOS-) y ausencia de acrosoma (CB-)

Por último, la morfología fue evaluada siguiendo el protocolo de Evangelista-Vargas *et al.* (2016) con algunas modificaciones., La metodología empleada fue la siguiente: se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L de muestra en un vial temperado al cual se le agregó 15  $\mu$ L de formaldehído 5% por 5 minutos. Una vez culminado el tiempo de fijación, se colocó una gota de la solución (semen+formaldehído) en una lámina portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos para realizar su lectura con aceite de inmersión a un objetivo de 1000X. Se contaron 200 células y los parámetros de morfología se dividieron en: normales, cabeza anormal, cabeza suelta, cola anormal, presencia de gota citoplasmática y anomalías de pieza intermedia.

### *Refrigeración*

Una vez diluido el semen y realizadas las evaluaciones correspondientes de la muestra fresca, se procedió con el enfriamiento de la misma. La curva de refrigeración tuvo una velocidad de disminución de la temperatura del semen diluido de 1 °C cada 3 minutos. El monitoreo de la temperatura fue constante con el fin de cumplir con la velocidad adecuada de enfriamiento. El tiempo promedio que demoró en bajar la temperatura de la muestra desde 37°C hasta 5°C fue de 96 minutos. Una vez que se logró alcanzar la temperatura de refrigeración, se extrajo 80  $\mu$ L de la muestra refrigerada para colocarla en otro vial y se incubó en la estufa a 37°C por 15 minutos. Posterior a ello, se inició la evaluación de las características microscópicas. El restante de la muestra se mantuvo en refrigeración hasta su empajillado.

### *Congelación y descongelación*

Para la congelación se utilizó el restante de la muestra refrigerada con lo que se llenaron las pajillas de 0.5 mL. Para el proceso de congelación, las pajillas de semen fueron colocadas sobre una rejilla la cual fue ubicada sobre vapores de nitrógeno líquido que se encontraba en una caja de tecnopor. La congelación se inició con el descenso de la temperatura desde 5°C a 0°C, proceso que tomó alrededor de 1 minuto, luego el semen fue congelado siguiendo una curva de congelación con una disminución gradual de temperatura de -20°C por minuto hasta llegar a una

temperatura de  $-140^{\circ}\text{C}$ . Posterior a ello, las pajuelas fueron sumergidas en el nitrógeno líquido donde permanecieron hasta su descongelación.

### *Descongelación*

La descongelación se realizó en baño María a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos. (Al-Badry, 2012) Pasado este tiempo el contenido de la pajilla fue vertido en un vial de 1.5 mL previamente temperado a  $37^{\circ}\text{C}$  para realizar la evaluación microscópica respectiva.

## **7. ANÁLISIS DE DATOS**

Para el muestreo de los animales se utilizó el método no probabilístico por conveniencia (Martinez-Mesa *et al.*, 2016), empleándose los machos reproductores entrenados para colecta de semen por vagina artificial y aquellos preparados para la colecta de semen por desviación del conducto deferente con que contaba el CIP Quimsachata al momento del planteamiento y ejecución del presente trabajo de investigación.

El análisis estadístico de los datos se realizó empleando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis utilizando el software Stata (Versión 16.0 para Windows, StataCorp, Texas). Se estableció una diferencia significativa entre tratamientos cuando  $P < 0.05$ .

## **8. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El presente estudio contó con la aprobación del CIP Quimsachata para el uso de sus animales y con la aprobación del Comité Institucional de Ética para uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, según constancia E010-05-20.

## RESULTADOS

En la colección realizada por el método de vagina artificial, la cópula tuvo una duración promedio de  $23.22 \pm 1.26$  minutos. Mientras que, en la colección realizada por desviación de los conductos deferentes el tiempo que tomó realizar la colecta fue  $6.05 \pm 0.33$  minutos, desde el momento del derribo hasta que el macho se incorporó nuevamente.

En las muestras colectadas por el método de vagina artificial se obtuvo un volumen de  $1.17 \pm 0.20$  mL. En cuanto al color, se apreció un color blanco semi-lechoso en el 100 % de muestras colectadas por vagina artificial; mientras que, en las muestras colectadas por DCD, el 33.33% de las muestras fueron de color blanco cremoso, 22.22% de color blanco lechoso, 33.33% de color blanco semi-lechoso y el 11.11% fueron de color blanco acuoso. Además, en las muestras colectadas por vagina artificial la filancia fue  $0.89 \pm 0.14$  cm; mientras que en las colectadas por DCD fue 0.0 cm

La Tabla 1 muestra los resultados de las características microscópicas obtenidas con cada uno de los tratamientos. Se observó que existe efecto ( $P < 0.05$ ) de la interacción del método de colecta por el dilutor empleado sobre la motilidad progresiva, siendo mayor en las muestras obtenidas por DCD y diluidas con Tris (44.4 %) y Steridyl (43.9 %), que en las obtenidas por VA diluidas con Steridyl (26.7 %) y Tris (21.1 %).

También se vio un efecto de interacción sobre la vitalidad de los espermatozoides en semen fresco inmediatamente después de la colecta, apreciándose que esta es mayor en el semen colectado por desviación del conducto deferente (DCD) y diluido con Steridyl (60.7%), seguido por el semen colectado por vagina artificial (VA) y diluido con Steridyl (60.0%) y aquel colectado por DCD y diluido con Tris (55.6%); mientras que, la más baja vitalidad se observó en el semen colectado por VA y diluido con Tris (51.4 %).

En la evaluación de las características microscópicas del semen al momento de la refrigeración, cuando el semen se encontraba a 5°C; no se observó diferencia entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ), lo que indico que no hubo efecto de la interacción del método de colecta

por dilutor empleado sobre ninguna de las características microscópicas al momento de la refrigeración.

**Tabla 1. Características microscópicas de semen fresco, refrigerado y congelado/descongelado por efecto de la interacción método de colecta y dilutor empleado en alpacas.**

Método de colecta		Desviación de conducto deferente		Vagina artificial	
Dilutor		Tris †	Steridyl	Steridyl	Tris †
Tratamientos		T1	T2	T3	T4
Semen	Parámetros	n = 9	n = 9	n = 9	n = 9
Fresco	Concentración	179.6 ± 94.3 <sup>a</sup>	175.1 ± 92.7 <sup>a</sup>	86.6 ± 51.4 <sup>a</sup>	105.1 ± 45.6 <sup>a</sup>
	M. Progresiva	44.4 ± 5.3 <sup>a</sup>	43.9 ± 8.2 <sup>a</sup>	26.7 ± 3.5 <sup>b</sup>	21.1 ± 4.9 <sup>b</sup>
	M. Oscilatoria	12.8 ± 3.6 <sup>b</sup>	14.4 ± 3.0 <sup>b</sup>	29.4 ± 4.6 <sup>a</sup>	28.3 ± 0.3 <sup>a</sup>
	Vitalidad	55.6 ± 8.6 <sup>ab</sup>	60.7 ± 8.0 <sup>a</sup>	60.0 ± 7.3 <sup>ab</sup>	51.4 ± 4.2 <sup>b</sup>
	Membrana intacta	33.8 ± 15.6 <sup>a</sup>	27.1 ± 7.8 <sup>a</sup>	28.4 ± 7.5 <sup>a</sup>	27.5 ± 5.9 <sup>a</sup>
	Normalidad	32.9 ± 8.4 <sup>a</sup>	34.0 ± 7.2 <sup>a</sup>	36.4 ± 3.8 <sup>a</sup>	33.1 ± 9.8 <sup>a</sup>
Refrigerado	M. Progresiva	36.1 ± 11.9 <sup>a</sup>	35.6 ± 14.9 <sup>a</sup>	36.7 ± 7.9 <sup>a</sup>	28.3 ± 9.7 <sup>a</sup>
	M. Oscilatoria	12.8 ± 4.4 <sup>a</sup>	11.1 ± 4.9 <sup>a</sup>	12.8 ± 3.6 <sup>a</sup>	12.8 ± 4.4 <sup>a</sup>
	Vitalidad	53.2 ± 8.4 <sup>a</sup>	48.7 ± 13.3 <sup>a</sup>	54.2 ± 8.4 <sup>a</sup>	43.8 ± 8.6 <sup>a</sup>
	Membrana intacta	25.4 ± 12.4 <sup>a</sup>	17.7 ± 7.4 <sup>a</sup>	23.3 ± 5.8 <sup>a</sup>	16.4 ± 5.2 <sup>a</sup>
	Normalidad	25.2 ± 7.0 <sup>a</sup>	24.2 ± 5.1 <sup>a</sup>	29.4 ± 5.5 <sup>a</sup>	24.3 ± 6.6 <sup>a</sup>
Congelado	M. Progresiva	15.0 ± 7.5 <sup>a</sup>	15.6 ± 7.7 <sup>a</sup>	2.9 ± 3.4 <sup>b</sup>	2.1 ± 3.4 <sup>b</sup>
	M. Oscilatoria	12.2 ± 3.6 <sup>a</sup>	10.6 ± 4.6 <sup>ab</sup>	6.6 ± 4.1 <sup>b</sup>	6.6 ± 4.3 <sup>b</sup>
	Vitalidad	31.4 ± 8.4 <sup>a</sup>	29.3 ± 9.7 <sup>a</sup>	11.7 ± 3.5 <sup>b</sup>	9.9 ± 3.9 <sup>b</sup>
	Membrana intacta	19.6 ± 11.7 <sup>a</sup>	12.1 ± 4.6 <sup>ab</sup>	11.6 ± 4.2 <sup>ab</sup>	9.8 ± 3.4 <sup>b</sup>
	Normalidad	24.2 ± 6.4 <sup>a</sup>	23.1 ± 4.6 <sup>a</sup>	25.2 ± 3.9 <sup>a</sup>	22.9 ± 5.0 <sup>a</sup>

†Tris: dilutor tris-lactosa-yema de huevo. T1: interacción DCD-Tris, T2: interacción

DCD-Steridyl, T3: interacción VA-Steridyl, T4: interacción VA-Tris

<sup>a, b</sup> Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ( $P < 0.05$ )

Finalmente, al momento de la descongelación del semen se apreció diferencia entre los tratamientos para las características microscópicas de motilidad progresiva y proporción de espermatozoides con membrana funcional y acrosoma intacto. El mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva se observó en aquellos colectados por DCD y diluidos con Steridyl (15.6%) , seguido de las muestras colectadas por DCD y diluidos con Tris (15%) y las menores motilidades progresivas fueron observadas en las muestras colectadas por VA y diluidas con Steridyl (2.9%) y Tris (2.1%). En cuanto a la integridad de la membrana plasmática y presencia de acrosoma, se apreció un mayor porcentaje de espermatozoides con estas características en las muestras obtenidas por DCD y diluidas con Tris (19.6%), seguidas de las muestra obtenidas por DCD y diluidas por Steridyl (12.1%) y las obtenidas por VA y diluidas con Steridyl (11.6%); mientras que; la menor cantidad de espermatozoides con membrana intacta fue observada cuando los espermatozoides provinieron de una colecta por VA y fueron diluidos con tris (9.8%), resultados que se muestran en la tabla 1.

## DISCUSIÓN

En los camélidos sudamericanos, específicamente en las alpacas, que es una de las especies en las que más investigación en biotecnología reproductiva se ha realizado, se ha apreciado una gran variabilidad entre resultados reportados en la crioconservación de espermatozoides, hecho que no resulto ser muy diferente en el presente estudio.

Según los resultados que se obtuvieron en el presente estudio durante el manejo y crioconservación de espermatozoides de alpaca obtenidos por dos métodos de colecta como son la desviación del conducto deferente (DCD) y la vagina artificial (VA) y diluidos con dos dilutores de semen como el tris y el Steridyl, el primero preparado en nuestro laboratorio y el segundo de uso comercial; nos indicaron una clara diferencia respecto de las características de motilidad individual, apreciándose que las muestras obtenidas por DCD y diluidas con tris y Steridyl tuvieron una mayor motilidad progresiva respecto de aquellas obtenidas por VA diluidas con tris o Steridyl. Esta diferencia estaría atribuido a la presencia del plasma seminal; puesto que las muestras colectadas por el método de DCD están exentas de plasma seminal mientras que aquellas colectadas por VA contienen plasma seminal. (Garnica *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 1997). Se ha observado en diversos estudios que la viscosidad del plasma seminal sería la responsable de impedir una adecuada homogenización de la muestra con el dilutor y generaría una baja motilidad progresiva. (Garnica *et al.*, 1993; Deen *et al.*, 2003). Dicha viscosidad sería atribuida a la presencia de una alta concentración de la proteína mucina 5B secretada por las glándulas bulbouretrales y produciría principalmente una motilidad oscilatoria (Kershaw y Maxwell, 2012)

Para el caso de la vitalidad de los espermatozoides en las muestras de semen en fresco, esta fue mayor en los espermatozoides colectados por DCD diluidos con Steridyl,

superando a las muestras colectadas por DCD que fueron diluidas con tris y aquellas colectadas por VA diluidas con Steridyl, mientras que la más baja vitalidad se observó en las muestras colectadas por VA y que fueron diluidas con Steridyl, ello nos indicaría que el Steridyl brindaría una mejor protección de los espermatozoides en comparación al tris; adicionalmente se debe tener en cuenta que los espermatozoides colectados por DCD carecen del plasma seminal, el cual ha demostrado tener un efecto beneficioso sobre la protección del espermatozoide (Kershaw y Maxwell, 2012); que según los resultados obtenidos, en el presente estudio sería bien suplido por alguno de los componentes que poseería el Steridyl. Similar efecto se observaría al comparar la vitalidad en las muestras obtenidas por VA diluidas con Steridyl y tris, en las que se observó un mayor porcentajes de espermatozoides vivos cuando las muestras fueron diluidas con Steridyl en comparación a aquellas que fueron diluidas con tris.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, permiten apreciar que una importante característica de los dilutores a base de yema de huevo es la falta de estandarización en su composición, la cual sería responsable de generar los resultados tan variados de los parámetros no sólo al momento de la colecta sino también en el post descongelamiento; al respecto, Abdel-Aziz *et al.* (2019), compararon la eficiencia de dilutores comerciales a base de Tris sin yema de huevo (Andromed) y con yema de huevo (Steridyl, Triladyl) para la criopreservación de semen de camellos y encontraron que la motilidad post descongelamiento fue significativamente mejor con el Triladyl y el Steridyl ( $38.63 \pm 0.81\%$ ,  $34.4 \pm 0.84\%$ ; respectivamente) que con el Andromed ( $31.99 \pm 1.48\%$ ), resultados similares al presente estudio en el que el Steridyl, un dilutor comercial, genero una mejor protección al espermatozoide.

A pesar de los resultados variados, la yema de huevo aún parece ser un componente esencial en la composición de los dilutores, ello debido a que es un protector

de membrana convencional que ha demostrado ser eficiente en la criopreservación de semen de camélidos y otras especies ganaderas, asimismo, son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) el principal componente efectivo de la yema de huevo (Watson 1975; Panahi *et al.* 2017). De esta manera, la yema de huevo tendría la propiedad de estabilizar la membrana espermática y cumpliría su función crioprotectora mediante la formación de una capa de protección contra los cristales de hielo que se generan en el proceso de congelación (Fernández-Santos *et al.*, 2006, Pérez *et al.*, 2014; Panahi *et al.*, 2017), por resultados obtenidos en el presente estudio, se podría inferir un efecto beneficioso de la yema de huevo, pero sería importante realizar más estudios que permitan optimizar y estandarizar su manejo en la dilución de semen de alpacas, puesto que ambos dilutores empleados en el presente estudio contenían yema de huevo, con la diferencia de que uno fue de origen comercial (Steridyl) y el otro fue preparado en nuestro laboratorio, por lo que la variabilidad en la calidad de las yemas de huevo empleadas podrían incluir un efecto adicional que requiere ser estudiado.

Asimismo, no se puede conocer la composición precisa de los dilutores comerciales como el Steridyl, sin embargo, se conoce que los componentes principales de la mayoría de dilutores son tris, ácido cítrico, azúcares y glicerol. El tipo de azúcar y la proporción de los demás componentes en los dilutores a base de Tris, afectaría significativamente la eficiencia de la criopreservación de semen en alpacas (Niasari-Naslaji *et al.* 2006). Posiblemente el dilutor Steridyl contiene una adecuada proporción de cada componente lo que explicaría el resultado superior de vitalidad en las muestras frescas diluidas con dicho dilutor, en comparación con los obtenidos con el tris-lactosa-yema de huevo.

El valor más alto de vitalidad en el semen fresco observado en las muestras obtenidas por DCD, podría ser debido a que las muestras obtenidas por este método

carecen de secreciones de glándulas anexas, eliminando por completo la viscosidad del semen lo que permitiría una mejor dilución y un mayor contacto del dilutor con la membrana de los espermatozoides, por ende un mejor mantenimiento de la vitalidad. (Garnica *et al.*, 1993; Deen *et al.*, 2003).

En la evaluación de las diferentes características microscópicas del semen al momento de la refrigeración, cuando este se encontró a 5°C, no se observó ninguna diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, ello haría suponer que el tris o Steridyl generarían una protección similar a los espermatozoides del semen ya sea colectado por DCD o VA.

A la descongelación, diferencias significativas entre tratamientos fueron apreciadas para las variables motilidad individual progresiva, motilidad individual oscilatoria, vitalidad e integridad de membrana. Tanto la motilidad individual progresiva como la oscilatoria fueron superiores en las muestras colectadas por DCD diluidas con tris o Steridyl en comparación a las obtenidas por VA diluidas con tris o Steridyl, esta respuesta correspondería en parte a que la motilidad individual progresiva también fue mayor al momento de la colecta con el método de DCD en comparación a la VA, pero adicionalmente habría un mejor efecto de protección de los espermatozoides por parte de ambos dilutores, como consecuencia de una mejor homogenización entre el dilutor y el semen al momento de la dilución en las muestras obtenidas por DCD, debido a que estas carecían de plasma seminal, en comparación a las muestras colectadas por VA en las que la viscosidad del plasma seminal no permitió una adecuada homogenización (Skidmore *et al.*, 2018) entre el semen y ambos dilutores evaluados en el presente estudio.

La disminución en la motilidad individual progresiva desde el momento de la colecta hasta el momento de la descongelación en todos los tratamientos; sería debida a que la criopreservación es un proceso que implica una serie de cambios perjudiciales

sobre la función espermática y la fertilidad, genera cambios estructurales en la membrana plasmática y membrana acrosomal, altera la función mitocondrial, genera estrés oxidativo mediante peroxidación lipídica y disminuyen la motilidad (Miguel-Jiménez *et al.* 2020).

Aller *et al.* (2003), evaluaron el efecto de la criopreservación sobre la motilidad y viabilidad de espermatozoides de llama colectados por vagina artificial, y de igual manera, obtuvieron una considerable disminución de la motilidad desde la colecta ( $54.3 \pm 10.5 \%$ ) a la descongelación ( $20.4 \pm 7.5 \%$ ). Santiani *et al.* (2005), empleando distintos dilutores y crioprotectores en semen de alpaca obtenido por vagina artificial, obtuvo valores de motilidad pre congelamiento de  $66.5 \pm 6.4 \%$ , que descendieron hasta  $1.0 \pm 1.4\%$  post descongelamiento. Por otro lado, Morton *et al.* (2007), al evaluar la motilidad de espermatozoides epididimarios de alpaca también observaron una disminución en la motilidad desde  $46.9 \pm 4.5 \%$  al momento de la colecta hasta  $18.2 \pm 5.7\%$  post descongelamiento. Como se puede apreciar en los reportes de los diferentes autores y los observados en el presente estudio; existe una marcada disminución en la motilidad individual entre la colecta y congelación que podría ser atribuida a las diferentes crioinjurias por las que atraviesa el espermatozoide al momento de la congelación, principalmente debido al estrés generado por la interacción agua – soluto, y también al momento de la descongelación debido el reingreso de agua a la célula espermática que genera una alteración en la membrana celular (Holt, 2000).

La vitalidad de los espermatozoides a la post descongelación fue también superior cuando el semen fue colectado por DCD y diluido con tris o Steridyl en comparación a lo colectado por VA y diluido con ambos dilutores; en tanto que, el mayor porcentaje de espermatozoides con membrana intacta se apreció en aquellos procedentes de DCD y que fueron diluidos con tris, en comparación a los obtenidos por DCD diluidos con Steridyl y a los colectados por VA diluidos con Steridyl y el menor porcentaje se apreció cuando se

colectó por VA y la dilución se realizó con tris. Es probable que gran parte de esta respuesta sea debida a la presencia (en las muestras colectadas por VA) o ausencia (en las muestras colectadas por DCD) del plasma seminal que estaría muy relacionado con la adecuada homogenización entre el semen y el dilutor, puesto que cuando esta es mejor habría un mejor contacto de los crioprotectores del dilutor con el espermatozoide por ende genera una mejor preservación de sus características. (Skidmore *et al.*, 2018).

Tal vez la superioridad en el mantenimiento de las características mencionadas en las muestras colectadas por DCD y diluidas con tris, pueda ser debido a la presencia de la lactosa como componente del tris en el presente estudio; pues se han observado efectos positivos del uso de la lactosa en la criopreservación de semen de camélidos sudamericanos. Así, El-Bahrawy *et al.* (2006), evaluaron el efecto de distintos dilutores en la criopreservación de semen de camellos y observaron una mayor motilidad post descongelamiento con el uso del Tris-Lactosa ( $62.3 \pm 3.6\%$ ) en comparación con el Tris-Sucrosa ( $26.7 \pm 4.9\%$ ) y Tris-Citrato ( $25.8 \pm 4.9\%$ ). Asimismo, Morton *et al.* (2007) evaluaron el efecto de dilutores a base de tris, lactosa y citrato sobre la criopreservación de semen de alpacas y obtuvieron una mayor motilidad post descongelamiento en las muestras diluidas con el dilutor a base de lactosa ( $18.2 \pm 5.7$ ) en comparación que con el de citrato ( $6.9 \pm 2.3$ ) y tris ( $11.3 \pm 3.0$ ). La glucosa y fructosa son los azúcares más utilizados para la dilución de semen de diversas especies, esto debido a que son de bajo peso molecular y pueden ser fácilmente metabolizados por los espermatozoides. Por otro lado, la lactosa es de un peso molecular elevado por lo que no puede permear la membrana del espermatozoide y su efecto protector se centra más en atenuar cambios osmóticos durante la dilución. (Stuart *et al.*, 2019).

En el presente estudio, la viscosidad del semen obtenido por vagina artificial afectó la integridad funcional de la membrana y presencia de acrosoma intacto al

momento de la descongelación, así como también dificultó la adecuada dilución del semen, razones que impiden el desarrollo de protocolos efectivos de criopreservación de semen de alpacas, tal como lo reportan también Kershaw-Young y Maxwell (2011); sin embargo, es de importancia considerar que la viscosidad del plasma seminal podría tener un rol muy importante en mantener la viabilidad de los espermatozoides en el útero y favorecer la disponibilidad de los mismos en el momento en el que ocurra la ovulación (Kershaw y Maxwell, 2012) que en las alpacas se produce entre las 28 y 30 horas después de la cópula (Tibary y Vaughan, 2006).

En cuanto a la morfología espermática, no se encontraron diferencias significativas en los tratamientos en ninguno de los momentos evaluados, sin embargo, se pudo observar que en general los resultados obtenidos para éste parámetro en el presente estudio (34.1%, en el caso del semen fresco), está muy por debajo de lo reportado por otros autores como Flores *et al.* (2002), quienes obtuvieron un promedio de 51% y Bravo *et al.* (1997), que reportan 73.7 y 75.9% de espermatozoides con morfología normal. El bajo porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales observados en este estudio podría deberse a un shock térmico durante la colecta, pues estas se realizaron en el medio ambiente (10°C aproximadamente) sin temperatura controlada, ello podría haber generado cambios en la morfología espermática con una mayor presentación de anomalías en la cola del espermatozoide tal como se observó en el presente estudio y como lo indica Suhee *et al.* (2011), es justamente esta parte del espermatozoide que cambia su conformación en respuesta al shock térmico.

## CONCLUSIONES

A través del presente estudio se llega a las siguientes conclusiones:

- En semen fresco una mejor respuesta fue observada en las características de motilidad individual progresiva y vitalidad en los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes y diluidos con tris o Steridyl en comparación a los obtenidos por vagina artificial.
- Las características microscópicas evaluadas al momento de la refrigeración fueron similares en los espermatozoides procedentes de una colecta por desviación de los conductos deferentes o vagina artificial ya sea que estos fueron diluidos con tris o Steridyl.
- Los espermatozoides colectados por desviación de conducto deferente en alpacas ya sea que fueran diluidos con tris o Steridyl tuvieron los mejores resultados en la criopreservación en comparación con los colectados por el método de vagina artificial diluidos con ambos dilutores.

## LITERATURA CITADA

1. Abdel-Aziz, A., Saadeldin, I., Ba-Awadh, H., Al-Mutary, M., Moumen, A., Aloweimer, A., y Abdalla, H. (2019). Efficiency of commercial egg yolk-free and egg yolk-supplemented tris-based extenders for dromedary camel semen cryopreservation. *Animals*, 9, 999.
2. Abraham, M., De Verdier, K., Båge, R., y Morrell, J. (2017). Semen collection methods in alpacas. *Veterinary Record*, 180, 613-614.
3. Alarcón, V., García, W., y Bravo, W. (2012). Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev Inv Vet Perú*, 23, 58-64.
4. Al-Badry, K. (2012). Effect of various thawing times and temperatures on frozen semen quality of Friesian bulls in Iraq. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 4, 384-388.
5. Al-Bulushi, S., Manjunatha, B.M., Bathgate, R., y de Graaf, S.P. (2016). Effect of different extenders on sperm motion characteristics, viability and acrosome integrity during liquid storage of dromedary camel semen. *Anim Reprod Sci*, 169, 99-135.
6. Al-Bulushi, S., Manjunatha, B.M., Bathgate, R., Rickard, J.P., y de Graaf, S.P. (2018). Effect of semen collection frequency on the semen characteristics of dromedary camels. *Anim Reprod Sci*
7. Al-Essawe, E., Abraham, C., Kunkitti, P., Axner, E., de Verdier, K., Bage, R., y Morrell, J. (2020). Extenders for alpaca epididymal spermatozoa: Comparison of INRA96 and Andromed. *Anim Reprod Sci*, 223, 106629.
8. Aller, J., Rebuffi, G., Cancino, A., y Alberio, R. (2003). Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec*, 52, 15-23.
9. Banda, J., Evangelista, S., Ruiz, L., Sandoval, R., Rodriguez, C., Valdivia, M., y Santiani, A. (2010). Efecto de dilutores en base a Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. *Rev Inv Vet Perú*, 21, 145-153.

10. Bertuzzi, M., Torres, E., Huanca, T., Neild, D., Carretero, M. (2020). Comparison of extenders with the addition of egg yolk for cooling alpaca sperm obtained from deferent ducts. *Front. Vet. Sci*, 7, 597954.
11. Bravo, W., Flores, U., Garnica, J., y Ordonez, C.(1997). Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47,619–626.
12. Bravo, W., Alarcón, V., Baca, L., Cuba, Y., Ordoñez, C., Salinas, J., y Tito F. (2013). Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Anim Reprod Sci*, 136,157-163.
13. Carretero, M., Pigretti, C., Bertuzzi, M., y Fumuso, F. (2018). Test hipoosmótico combinado a la Tinción de Coomassie Blue en espermatozoides de llama. *Spermova*, 8, 129-132.
14. Ccalta, R., Ordoñez, C., Ampuero, E., Cucho, H. (2017). Efecto de la criopreservación en la morfometría del espermatozoide de alpaca. *Spermova*, 7, 2: 100-105.
15. Choez, K., Arriaga, I., Terreros, M., Condori, R., Arroyo, G., y Huanca, W. (2015). Características del semen de alpacas obtenido por electroeyaculación y su motilidad durante la refrigeración. *Spermova*, 5, 42-46.
16. Dávalos, R., y Olazábal, L. (2002). Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Rev Inv Vet Perú*, 13, 2, 98-99.
17. Deen, A., Vyas, S., y Sahani, MS. (2003). Semen collection, cryopreservation and artificial insemination in the dromedary camel. *Anim Reprod Sci*, 77, 223–233.
18. Dellepiane, H., y Morales-Cauti, S. (2018). Identificación de bacterias patógenas oportunistas en útero de alpaca pre y poscópula. *Rev Inv Vet Perú*, 29, 602-610.
19. El-Badry, D., Scholkamy, T., Abeer, M., Mahmoud, K. (2015). Assessment of freezability and functional integrity of dromedary camel spermatozoa harvested from caput, corpus and cauda epididymides. *Alex. J. Vet. Sci*, 44, 147-158.
20. El-Bahrawy, K., El-Hassanien, E., El-Bab, F., y Zeitoun, M. (2006). Semen characteristics of the male camel and its freezability after dilution in different extenders. In: Int. Sci. Camel Conf. El-Qaseem, KSA. 2037-2053.

21. El-Bahrawy, K., Rateb, S., Khalifa, M., Monaco, D., y Lacalandra, G. (2017). Physical and kinematic properties of cryopreserved camel sperm after elimination of semen viscosity by different techniques. *Anim Reprod Sci*, 187, 100–108.
22. Fernandez-Santos, M., Estes, M., Montoro, V., Soler, A., y Garde, J. (2006). Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology*, 66, 1931-1942.
23. Flores, P., García-Huidobro, J., Muñoz, C., Bustos-Obregón, E., y Urquieta, B. (2002). Alpaca semen characteristics previous to a mating period. *Anim Reprod Sci*. 72, 259-266.
24. Garnica, J., Achata, R., y Bravo, W. (1993). Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci*, 32, 85–90.
25. Giuliano, S. (2012). Extracción y evaluación de semen de camélidos sudamericanos. *Spermova*, 2, 6-9.
26. Giuliano, S., Bisiau, C., Carretero, M., Arraztoa, C., y Neild, D. (2012). Use of Comassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *Invet*, 14, 279
27. Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*. 62, 3–22.
28. Jeyendran, R., Van der Ven, H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B., y Zaneveld, L. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, 70 (1), 219-28.
29. Kershaw-Young, C., y Maxwell, C. (2011). Advancing Artificial Insemination in Camelids, Particularly the Alpaca. Rural Industries Research and Development Corporation. Publication No. 11.
30. Kershaw-Young, C.M., y Maxwell, W.M.C. (2011). The effect of seminal plasma on alpaca sperm function. *Theriogenology*, 76, 1197-1206.
31. Kershaw-Young, CM., y Maxwell, WMC. (2012). Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reprod Dom Anim*, 47, 369–375.
32. Knox, R.V. Semen processing, extending and storage for artificial insemination in swine. (2011). *Swine Reproductive Extension Specialist* Department of Animal Sciences, University of Illinois, USA.

33. Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F., y Cesari, A. (2016). Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Anim Reprod Sci.*
34. Machaca, V., Bustinza, A.V., Corredor, F.A., Paucara, V., Quispe, E.E., y Machaca, R. (2017). Características de la Fibra de Alpaca Huacaya de Cotaruse, Apurímac, Perú. *Rev Inv Vet Perú*, 28, 843-851.
35. Miguel-Jiménez, S., Riviera del Alamo, M., Álvarez-Rodríguez, M., Olegario, C., Peña, A.I., Muíño, R., Rodríguez-Gil, J., y Mogas, T. (2020). *In vitro* assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome- based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Anim Reprod Sci.* 215.
36. Mata-Campuzano, C., Soleilhavoup, G., Tsikis, F., Martinez-Pastor, S.P., de Graaf, X.. Druart. (2015). Motility of liquid stored ram spermatozoa is altered by dilution rate independent of seminal plasma concentration. *Anim Reprod Sci*, 162, 31-36.
37. Morton, K., Bathgate, R., Evans, GC y Maxwell, W.M. (2007). Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev*, 19, 792–796
38. Morton, KM., Thomson, PC., Bailey, K., Evans, G., y Maxwell, WMC. (2010). Quality Parameters for Alpaca (*Vicugna pacos*) Semen are Affected by Semen Collection Procedure. *Reprod Dom Anim*, 45, 637-643.
39. Niasari-Naslaji, A., Mosaféri, S., Bahmani, N., Gharahdaghi, A.A.; Abarghani, A.; Ghanbari, A.; Gerami, A. (2006). Effectiveness of a tris-based extender (SHOTOR diluent) for the preservation of Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) semen. *Cryobiology*. 53, 12–21.
40. Panahi, F., Niasari-Naslaji, A., Seyedasgari, F., Ararooti, T., Razavi, K., y Moosavi-Movaheddi, A. (2017). Supplementation of tris-based extender with plasma egg yolk of six avian species and camel skim milk for chilled preservation of dromedary camel semen. *Anim Reprod Sci*, 184, 11-19.

41. Pérez, MG., Quintano, J., y Pérez, H. (2014). Sobrevivencia espermática en refrigeración a 5°C recuperados del conducto deferente de alpaca en tres dilutores con dos protectores de membrana. *Spermova*, 4, 153-158.
42. Pérez, MG., Zevallos, J., y Harold Pérez, U. (2014). Recuperación de espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. *Spermova*, 4, 139 – 144.
43. Raymundo, F., Huanca, W., Huanca, T., Huerta, S., y Cordero, A. (2006). Efecto de tres dilutores en la conservación del semen de alpacas. *Rev Inv Vet Perú*, 17, 125-130.
44. Santiani, A., Huanca, W., Sapana, R., Huanca, T., Sepúlveda, N., y Sánchez, R. (2005). Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl*, 7, 303-309.
45. Santiani, A., Ugarelli, A., y Evangelista-Vargas, S. (2016). Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim Reprod Sci*, 173, 49-55.
46. Skidmore, J., Malo, C., Crichton, E., Morrell, J., y Pukazhenth, B. (2018). An update on semen collection, preservation and artificial insemination in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*). *Anim Reprod Sci*.
47. Stuart, C., Vaughan, J., Kershaw, C., de Gaaf, S., y Bathgate, R. (2019). Effect of diluent type, cryoprotectant concentration, storage method and freeze/thaw rates on the post-thaw quality and fertility of cryopreserved alpaca spermatozoa. *Nature Research*, 9, 12826.
48. Suhee, K., Young-Jun, L., y Yong-Jun, K. (2011). Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 °C. *Anim Reprod Sci*, 124, 118-124.
49. Tibary, A., y Vaughan, J. (2006). Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations. *Small Ruminant Res*, 61, 283-298.
50. Vaughan, J., Galloway, D., y Hopkins, D. (2003). Artificial Insemination in Alpacas (*Lama pacos*). *Rural Industries Research and Development*. No 03/104.
51. Vaughan, J., y Tibary, A. (2006) Reproduction in female South American camelids: a review and clinical observations. *Small Rumin Res*, 61, 259–281.

52. Watson, P. F. (1975). The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. *J. Thermal Biology*,1, 137-141.
53. World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition.