

## EFFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN EN LA MORFOMETRÍA DEL ESPERMATOZOIDE DE ALPACA

### Effect of cryopreservation on Alpaca sperm morphometry

Ruth Ccalta, César Ordoñez, Enrique Ampuero, Hernán Cucho\*

Escuela Profesional de  
Zootecnia, Universidad  
Nacional de San Antonio  
Abad del Cusco, Perú

\* Corresponding author:  
Hernán Cucho.  
Facultad de Ciencias  
Agrarias, Granja K'ayra,  
San Jerónimo, Cusco, Perú.

E-mail:  
hernan.cucho@unsaac.edu.pe

#### ABSTRACT

The objective of the study was to evaluate the effect of cryopreservation on the morphometric parameters of alpaca spermatozoa. We used six male alpacas of the Huacaya breed, between 6 to 8 years; 3 for the collection of semen by the post-copulation method (MPC) and 3 by recovered the sperm from the vas deferens (DCD). The volume, color, filament, motility, concentration, viability, integrity of the membrane, acrosomal integrity, and the morphometry of the spermatozoa were evaluated. All the microscopic variables were determined with a CASA system (ISAS®, Proiser). The freezing process was carried out with a TRIS base diluent with three cryopreservation treatments 0, 1.5 and 3 mg of cholesterol loaded cyclodextrins (CLC), dimethylformamide was used as cryoprotectant. We analyzed 12 morphometric parameters, length, width, area, perimeter, ellipticity, elongation, regularity and roughness of the sperm head, percentage of acrosome, and the width, distance and angle of insertion of the intermediate piece of alpaca sperm. We evaluated 2565 spermatozoa collected by post-copulation and 2387 spermatozoa recovered from the vas deferens, both in fresh and thawed. The result shows the effect of cryopreservation in area and perimeter for both evaluated methods.

**Keywords:** CASA, sperm morphometry, cryopreservation, alpaca semen.

#### RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la criopreservación en los parámetros morfométricos de espermatozoides de alpaca. Se utilizaron 6 alpacas machos de la raza Huacaya de 6 a 8 años; 3 para la colección de semen por el método de post-cópula (MPC) y 3 se recuperaron los espermatozoides de la desviación de los conductos deferentes (DCD). Se evaluaron el volumen, color, filancia, motilidad, concentración, viabilidad, integridad de la membrana, integridad acrosomal, y la morfometría de los espermatozoides. Todas las variables microscópicas se determinaron con un sistema CASA (ISAS®, Proiser). El proceso de congelación se realizó con un diluyente base TRIS con tres tratamientos de criopreservación 0, 1.5 y 3 mg de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC), se empleó la dimetilformamida como crioprotector. Se analizaron 12 parámetros morfométricos, longitud, anchura, área, perímetro, elipticidad, elongación, regularidad y rugosidad de la cabeza del espermatozoide, porcentaje de acrosoma, y la anchura, distancia y ángulo de inserción de la pieza intermedia del espermatozoide de alpaca. Se evaluaron 2565 espermatozoides colectados por post cópula y 2387 espermatozoides recuperados del conducto deferente, en fresco y descongelado. Los resultados muestran el efecto de la criopreservación en el área y perímetro en ambos métodos evaluados.

**Palabras clave:** CASA, morfometría espermática, criopreservación, semen alpaca

## INTRODUCCION

La conservación de las estructuras espermáticas y de su capacidad fertilizante exige la reducción o interrupción reversible del metabolismo celular (Choez, 2010). Durante el proceso de criopreservación los espermatozoides se ven sometidos a diversos tipos de estrés, los cuales pueden inducir, en la célula espermática, daños letales o sub-letales los cuales comprometen su funcionalidad (Choez, 2010). El mayor impedimento para desarrollar protocolos de criopreservación probablemente sea la viscosidad del semen, la cual puede ser reducida empleando enzimas como la papaína (Kershaw-Young et al., 2013); también se encontró que la adición de colesterol estabiliza las membranas y disminuye la temperatura a la cual se produce el cambio de fase de los lípidos de líquida a gel, reduciendo los daños que se producen la membrana plasmática del espermatozoide (Gillan et al., 1997).

La morfología espermática es parte esencial de una evaluación seminal, puesto que muestras con alta proporción de espermatozoides anormales presentan una baja fertilidad (Hafez y Hafez, 2004). Los sistemas CASA, se ha desarrollado para proveer mediciones más objetivas y confiables de estas características (Verstegen et al., 2002). Buendía et al., (2002), Ordóñez et al., (2012), López (2014), Meza (2014), Calderón (2015), Evangelista et al., (2015), han determinado la morfometría del espermatozoide de alpaca en fresco. Maroto (2012), manifiesta que en los estudios realizados para evaluar el efecto del proceso de criopreservación sobre la forma de la cabeza del espermatozoide se ha demostrado una reducción de las dimensiones de la misma tras la descongelación. Las diferencias en el tamaño de la cabeza entre los espermatozoides vivos y muertos posiblemente se deben a que estos últimos se hidratan por los componentes del medio, como consecuencia de la pérdida de la permeabilidad de la membrana (Marco-Jiménez et al., 2006). Se cree también que las modificaciones en la forma y dimensión de la cabeza espermática puedan reflejar defectos en la estructura e integridad de la cromatina del espermatozoide (Núñez-Martínez et al., 2005).

No existe información respecto al efecto de la criopreservación en los parámetros morfométricos del espermatozoide de alpaca, por ello el presente trabajo, tiene como objetivo el estudio del efecto de la congelación en los parámetros morfométricos del espermatozoide de alpaca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Código de ética

Los autores declaran que el presente estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa: [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm).

### Zona de estudio y animales

El estudio se realizó en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ubicada en la provincia de Canchis en las coordenadas 14°28'27.01" S y 71°02'45.40" W, a 4130 metros de altitud, el trabajo se realizó entre febrero y mayo del 2016. Se utilizó 3 alpacas machos para la colección de semen por post cópula y 3 animales para la recuperación de espermatozoides de la desviación de los conductos deferentes, con edades de entre 6 y 8 años, y un peso corporal promedio de 71 kg. Los animales

exentos de anomalías físicas y libres de lesiones en prepucio y pene. Las alpacas se alimentaron a base a rye grass inglés y trébol blanco, además de pasto nativo, con agua a libre disposición.

### Colección y evaluación de espermatozoides y semen

Las alpacas machos fueron sometidos a un período de preparación de 45 días. Por el método de post cópula, se colectó el semen de 3 alpacas macho (3 repeticiones con intervalo semanal), según el método descrito por Neely y Bravo (1998), para lo que usaron hembras adultas sexualmente receptivas. La recuperación de los espermatozoides de los conductos deferentes desviados con anterioridad se hizo según lo descrito por Quispe et al., (2015), también de 3 animales, en 3 oportunidades y con intervalos de una semana entre cada recuperación de espermatozoides.

El volumen del eyaculado se determinó por observación directa en el método de post cópula, y una estimación por el número y tamaño de gotas en el método de desviación de los conductos deferentes. El color fue determinado subjetivamente por el investigador y la filancia se calcularon por la ruptura del hilo de la muestra, medida en una regla.

Se determinó la motilidad y concentración espermática empleando 5µL de semen, los que fueron evaluados a 100X aumentos, se empleó el kit Vital Test® para determinar el porcentaje de viabilidad; para la integridad funcional de la membrana (HOST) se utilizó una solución hipoosmótica de 50 mOsm/L; el análisis de la integridad acrosomal se hizo empleando el Coomassie blue. Los análisis de la motilidad, concentración, viabilidad, integridad funcional de la membrana e integridad acrosomal, fueron realizados usando el Integrated Semen Analysis System (ISAS® v1.1) dotado de un microscopio UOP-UB200i (Proiser R+D, Paterna, Valencia, España).

Para la morfometría espermática, se realizaron frotis empleando 5µL de muestra diluida hasta una concentración de 30 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por ml; una vez secos se tiñeron con Hemacolor® (Merck, Darmstadt, Alemania), según protocolo del producto. La morfometría se evaluó con el módulo de morfología del ISAS®, empleando un objetivo de 100X de campo claro; la resolución del análisis fue de 0.084 µm/pixel en ambos ejes, se realizó este análisis de la segunda colecta de cada animal, las imágenes de no menos de 200 espermatozoides de cada muestra de semen fresco y de los 3 tratamientos de descongelado fueron capturadas y analizadas.

Se analizaron 12 parámetros morfométricos, de la cabeza del espermatozoide, la longitud (L, µm), anchura (W, µm), área (A, µm<sup>2</sup>) y perímetro (P, µm), elipticidad (L/W), elongación ((L-W)/[L+W]), regularidad ( $\pi LW/4A$ ) y rugosidad ( $4\pi A/P^2$ ) y acrosoma (% del total de la cabeza); y de la pieza intermedia del espermatozoide la anchura (µm), distancia de inserción (distancia entre la cabeza y el eje de la pieza intermedia, µm) y ángulo de inserción (°).

### Dilución y criopreservación

El semen combinado con fluido vaginal, obtenido por método de post cópula fueron diluidas con un dilutor base TRIS, hasta alcanzar una concentración final de 15 millones de espermatozoides/mL; luego se añadió papaína (1:1) (v: v) (Sigma-Aldrich) y fue incubado durante 30 minutos a 37°C en baño maría, tras lo que se agregó el inhibidor de papaína (E-64, Sigma) durante 5 minutos en la misma una temperatura. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos (Crichton et al., 2015).

Se separó tres alícuotas para la adición de las ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC), con 0, 1.5 y 3.0 mg de CLC; éstas fueron incubadas durante 15 minutos a una temperatura de 37°C en oscuridad y fueron sometidas a centrifugación de 1750 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se eliminó. Se empleó la dimetilformamida como crioprotector.

Para el congelamiento se empleó pajuelas de 0.5 mL, y fue realizada en una caja de poliestireno expandido (tecnopork) conteniendo 3 cm de nitrógeno líquido, en la que las pajuelas fueron colocadas 5 cm sobre éste, durante 15 minutos para su congelación con los vapores, tras lo cual fueron vertidas dentro del nitrógeno líquido donde permanecieron 10 minutos. Para los espermatozoides obtenidos por el método de desviación de los conductos deferentes se realizó el mismo procedimiento a exceptuando la suplementación de papaína e inhibidor. La preparación de ciclodextrinas saturadas de colesterol se realizó según lo descrito por Purdy y Graham (2004).

#### Análisis estadístico

Se empleó la estadística descriptiva para evaluar la motilidad, concentración, viabilidad, integridad funcional de la

membrana e integridad acrosomal. Para los parámetros morfométricos se determinó la normalidad de las variables en estudio (test de Kolmogorov-Smirnov), se transformó los datos (proc transreg) de las variables que no mostraban distribución normal y se analizaron en un modelo lineal; para comparar las medias se usó la prueba de Duncan con una significancia de  $p < 0.05$ . Se empleó el SAS en los análisis estadísticos.

## RESULTADOS

El uso método de post cópula en la obtención de semen, se obtuvo un volumen de  $3.73 \pm 1.60$  mL, color predominante rojo claro (44.44%) y la filancia fue de  $23.8 \pm 0.70$  mm. Con el uso de método de desviación de los conductos deferentes, se obtuvo una porción espermática con volumen de  $0.031 \pm 0.0101$  mL y el 44% fue de color blanco lechoso (mas detalles ver tabla 1).

Tabla 1. Características de espermatozoides obtenidos de alpacas por método de post cópula y el método de desviación de los conductos deferentes.

Variables	Método de post cópula		Método de desviación de los conductos deferentes	
	N	Promedio $\pm$ DS	n	Promedio $\pm$ DS
Motilidad total (%)	9	13.6 $\pm$ 7.3	9	30.34 $\pm$ 15.65
Concentración (spz $10^6$ /mL)	9	215.32 $\pm$ 110.09	9	296.32 $\pm$ 145.41
Total, spz recuperados ( $10^6$ )	9	803.14	9	9.17
Viabilidad (%)	9	47.82 $\pm$ 4.96	9	50.72 $\pm$ 1.78
HOST (%)	9	46.89 $\pm$ 8.39	9	54.89 $\pm$ 4.92
Integridad Acrosomal (%)	9	76.92 $\pm$ 2.41	9	68.15 $\pm$ 4.81

DS: Desviación estándar; n: colecta; spz: espermatozoides

Los parámetros de los espermatozoides obtenidos por el método de post cópula, después de la congelación y descongelación diluidos en CLC de diferentes concentraciones, tuvieron las siguientes características: motilidad total de  $7.45 \pm 2.69\%$ , una viabilidad de  $13.82 \pm 3.06\%$ , una integridad funcional de la membrana de  $13.46 \pm 1.67\%$ , e integridad acrosomal de  $44.97 \pm 5.47\%$ . Los parámetros para los espermatozoides obtenidos por el método de desviación de los conductos deferentes, fueron: motilidad total de  $7.63 \pm 2.61\%$ , viabilidad de  $13.65 \pm 2.54\%$ , integridad funcional de la membrana (HOST) de  $12.41 \pm 2.42\%$ , e integridad acrosomal de  $30.76 \pm 7.83\%$ .

Se han evaluado 12 parámetros morfométricos del espermatozoide de alpaca (Figura 1) (Tablas 2 y 3). Se han encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para el longitud, anchura, área, elipticidad y rugosidad de la cabeza del espermatozoide de las alpacas tras ser descongelados, en relación con sus medidas en fresco, similar comportamiento se halló para la anchura, distancia y ángulo de inserción de la pieza intermedia (Tabla 2), ello los espermatozoides provenientes de la colección de semen por el método de post cópula.

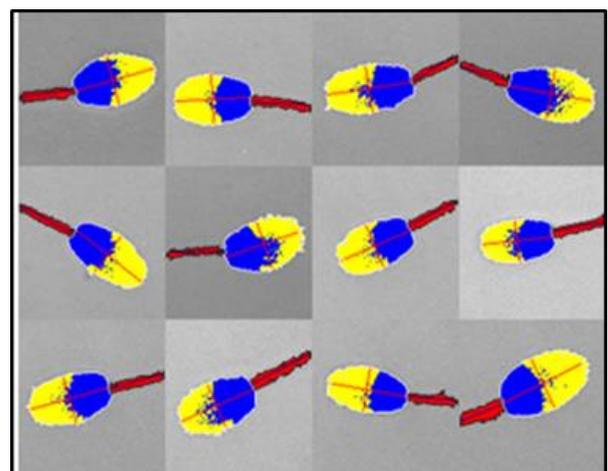


Figura 1. Imágenes digitalizadas de morfología espermática de alpaca: amarillo (acrosoma); azul (sección post acrosomal); rojo (pieza intermedia).

En los espermatozoides recuperados de los conductos deferentes, se han encontrado diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para el longitud, anchura, área, perímetro y porcentaje de acrosoma de la cabeza del espermatozoide de las alpacas tras ser congelados/descongelados, en relación a sus medidas en fresco, similar comportamiento se encontro para la anchura, distancia y ángulo de inserción de la pieza intermedia (Tabla 3), siendo los espermatozoides

congelados/descongelados mayores que los hallados en fresco, opuesto a la hallado con los espermatozoides de método post cópula. Las variables no dimensionales de elongación y regularidad en fresco son mayores ( $p < 0.05$ ) a las encontradas en congelado/descongelado.

Tabla 2. Parámetros morfométricos de los espermatozoides de alpacas en fresco y congelado/descongelado con la adición de las ciclodextrinas saturadas de colesterol de espermatozoides recuperados por el método de post cópula.

Parámetros morfométricos	Fresco	Descongelado		
		CLC 0 mg	CLC 1.5 mg	CLC 3.0 mg
n	610	663	653	639
Longitud cabeza ( $\mu\text{m}$ )	$5.71 \pm 0.66^a$	$5.25 \pm 0.66^b$	$5.11 \pm 0.65^c$	$5.70 \pm 0.71^b$
Anchura cabeza ( $\mu\text{m}$ )	$3.27 \pm 0.36^a$	$3.07 \pm 0.34^b$	$2.98 \pm 0.32^c$	$3.07 \pm 0.36^b$
Área cabeza ( $\mu\text{m}^2$ )	$15.27 \pm 2.27^a$	$13.38 \pm 2.30^b$	$12.59 \pm 2.26^c$	$13.39 \pm 2.61^b$
Perímetro cabeza ( $\mu\text{m}$ )	$17.79 \pm 2.70^a$	$17.80 \pm 2.22^a$	$17.87 \pm 2.84^a$	$17.77 \pm 2.78^a$
Acrosoma (% cabeza)	$52.65 \pm 6.39^a$	$56.32 \pm 5.56^a$	$56.00 \pm 5.78^a$	$56.28 \pm 6.52^a$
Elipticidad	$1.76 \pm 0.23^a$	$1.72 \pm 0.21^b$	$1.73 \pm 0.23^b$	$1.74 \pm 0.23^a$
Rugosidad	$1.33 \pm 17.86^a$	$0.54 \pm 0.09^a$	$0.61 \pm 1.94^a$	$0.55 \pm 0.11^a$
Elongación	$0.27 \pm 0.06^b$	$0.26 \pm 0.26^a$	$0.26 \pm 0.06^a$	$0.26 \pm 0.06^b$
Regularidad	$0.96 \pm 0.06^a$	$0.95 \pm 0.07^a$	$0.96 \pm 0.08^a$	$0.96 \pm 0.08^b$
Anchura pieza intermedia ( $\mu\text{m}$ )	$1.48 \pm 0.59^a$	$1.33 \pm 0.67^b$	$1.44 \pm 0.70^a$	$1.31 \pm 0.66^b$
Distancia pieza intermedia ( $\mu\text{m}$ )	$0.25 \pm 0.27^a$	$0.23 \pm 0.20^b$	$0.25 \pm 0.25^a$	$0.27 \pm 0.88^a$
Ángulo pieza intermedia ( $^\circ$ )	$10.35 \pm 13.29^a$	$9.04 \pm 10.70^b$	$8.46 \pm 11.79^b$	$8.94 \pm 8.72^b$

n: espermatozoides

Tabla 3. Parámetros morfométricos de los espermatozoides de alpacas en fresco y congelado/descongelado con la adición de las ciclodextrinas saturadas de colesterol de espermatozoides recuperados por el método de desviación de los conductos deferentes.

Parámetros morfométricos	Fresco	Descongelado		
		CLC 0 mg	CLC 1.5 mg	CLC 3.0 mg
n	671	550	602	564
Longitud cabeza ( $\mu\text{m}$ )	$5.34 \pm 0.47^b$	$5.45 \pm 0.52^a$	$5.49 \pm 0.54^a$	$5.58 \pm 0.73^a$
Anchura cabeza ( $\mu\text{m}$ )	$3.05 \pm 0.29^b$	$3.22 \pm 0.39^a$	$3.19 \pm 0.36^a$	$3.32 \pm 0.39^a$
Área cabeza ( $\mu\text{m}^2$ )	$13.08 \pm 1.70^c$	$14.11 \pm 2.33^a$	$14.07 \pm 2.16^a$	$13.87 \pm 2.12^b$
Perímetro cabeza ( $\mu\text{m}$ )	$17.41 \pm 2.06^c$	$17.68 \pm 2.30^b$	$17.78 \pm 2.36^a$	$17.98 \pm 2.70^a$
Acrosoma (% cabeza)	$59.34 \pm 4.56^b$	$60.32 \pm 60.32^a$	$60.68 \pm 4.35^a$	$59.66 \pm 5.37^b$
Elipticidad	$1.76 \pm 0.21^a$	$1.71 \pm 0.23^b$	$1.74 \pm 0.23^a$	$1.75 \pm 0.28^a$
Rugosidad	$0.57 \pm 0.08^a$	$0.58 \pm 0.08^a$	$0.57 \pm 0.57^a$	$0.60 \pm 0.93^a$
Elongación	$0.27 \pm 0.06^a$	$0.26 \pm 0.06^b$	$0.27 \pm 0.06^a$	$0.27 \pm 0.70^a$
Regularidad	$0.98 \pm 0.05^a$	$0.98 \pm 0.06^b$	$0.98 \pm 0.67^b$	$0.99 \pm 0.10^a$
Anchura pieza intermedia ( $\mu\text{m}$ )	$1.31 \pm 0.65^b$	$1.34 \pm 0.67^b$	$1.26 \pm 0.65^b$	$1.57 \pm 0.77^a$
Distancia pieza intermedia ( $\mu\text{m}$ )	$0.22 \pm 0.27^b$	$0.27 \pm 0.31^a$	$0.27 \pm 0.27^a$	$0.29 \pm 0.39^a$
Ángulo pieza intermedia ( $^\circ$ )	$9.83 \pm 6.80^c$	$9.28 \pm 810^b$	$8.90 \pm 8.0^b$	$11.65 \pm 14.08^a$

n: espermatozoides

## DISCUSIÓN

Los parámetros morfométricos de la cabeza del espermatozoide obtenidos por método de desviación de los conductos deferentes en fresco son ligeramente menores que los reportados por López (2014), Meza (2014) y Calderón (2015), la diferencia se debería a los intervalos entre recuperaciones y el número de espermatozoides evaluados, menores en nuestro caso comparados con ambos trabajos. Estos mismos parámetros, pero de espermatozoides provenientes del método de post cópula son similares a los obtenidos por Ordoñez et al. (2012), y Buendía et al. (2002). En todos los casos y también en el nuestro se ha podido observar una gran variabilidad entre animales.

En el presente trabajo encontramos que tanto el área como el perímetro del espermatozoide de alpaca criopreservado y proveniente del método de post cópula, es significativamente menor ( $p < 0.05$ ), en relación a sus dimensiones en fresco, lo cual también ha sido comprobado por Marco-Jiménez et al., (2006) en espermatozoides de anguilas y Ramón et al., (2013) en ovinos, que podría deberse a diferentes razones que incluyen los cambios osmóticos, las alteraciones en algunos compartimientos de las células, sobrecondensación de la cromatina nuclear y daño o pérdida del acrosoma (Maroto-Morales et al., 2016). Un comportamiento opuesto presentan los espermatozoides provenientes de la desviación de los conductos deferentes, lo cual podría deberse a que éstos aún no han completado su proceso de maduración y por ello en vez de disminuir sus dimensiones de área y perímetro la incrementan. Ante estos resultados es necesario proseguir con los estudios sobre la incidencia de la criopreservación en la morfometría del espermatozoide de alpaca.

García et al., (2017), en similares condiciones ambientales, en semen fresco y proveniente de PC, halló menores volumen y concentración espermática; mayor viabilidad y motilidad, y similar integridad de la membrana plasmática, las diferencias se deberían al factor animal y los métodos y equipos para evaluar dichas variables, en especial las microscópicas. En el caso de los espermatozoides provenientes de la desviación de los conductos deferentes, Huanca (2015), encontró similares volúmenes, menores motilidades y concentración que se podrían deberse a la época de evaluación, y mayores vitalidades y HOST, debido a las mismas razones. Ugarelli et al. (2017), determinó menores valores de integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios, la diferencia radicaría en el método de evaluación de dicha variable.

## CONCLUSIÓN

Se hallaron dos comportamientos de los espermatozoides, los que provinieron del método post cópula en su mayoría muestran menores dimensiones (área y perímetro) en congelado que en fresco ( $p < 0.05$ ); mientras los que fueron recuperados por el método de la desviación de los conductos deferentes, muestran menores dimensiones (área y perímetro) en fresco que en descongelado ( $p < 0.05$ ).

## Agradecimientos

Agradecemos al Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas de la Escuela Profesional de Zootecnia en el Centro Experimental La Raya, por las facilidades brindadas para la ejecución de la presente investigación, así como al proyecto canon Estudio, Validación y Aplicación de Biotecnologías Reproductivas en el Proceso de Mejoramiento y Valoración Genética en Alpacas en las Provincias de Canas, Canchis y

Quispicanchi en la Región Cusco, por las facilidades en reactivos y material de laboratorio.

## CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: HC, RC, EA; desarrollo de la metodología: RC, CO, EA; concepción y diseño: HC, CO; edición del artículo: HC, RC; supervisión del estudio: HC, CO.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés personal o económico, ni sus intereses han influenciado en los resultados del estudio.

## REFERENCIAS

- Buendía P, Soler C, Paolicchi F, Gago G, Urquieta B, Pérez-Sánchez F, Bustos-Obregón E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer-assisted system. *Theriogenology*. 2002; 57: 1207-1218
- Calderón N. Caracterización de patrones de movimiento de espermatozoides de alpaca (Vicugna pacos). Tesis Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú. 2015. 111 pp
- Choez K. Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos. Sistema de revisiones en Veterinaria. UNMSM. Lima. Perú. 2010. 8 pp
- Crichton EG, Pukazhenth BS, Billah M, Skidmore JA. Cholesterol additions aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedaries*) spermatozoa. *Theriogenology*. 2015; 83: 168 – 174.
- Evangelista-Vargas D, Evangelista-Vargas S, Santiani A, Valdivia M. Análisis morfométrico de espermatozoides de alpaca utilizando softwares de captura y medición de imágenes. Primer congreso de la Sociedad Latinoamericana de Reproducción Animal. Buenos Aires. Argentina. 2015; 395-398
- García W, Alarcón V, Bravo W. Inseminación artificial de alpacas con semen refrigerado y con inclusión de dos tipos de yema de huevo. *Rev Inv Vet Perú*. 2017; 28: 337 - 344
- Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 1997; 9: 481-487.
- Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Mcgraw-Hill Inteamericana. México DF. 2004. 512pp.
- Huanca N. Índice de fragmentación de ADN espermático en semen de alpacas (Vicugna pacos) utilizando el Integrated Semen Analysis System – ISAS. Tesis Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú. 2015. 119 pp
- Kershaw-Young CM, Stuart C, Evans G, Maxwell WM. The effect of glycosaminoglycans enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Anim Reprod Sci*. 2013; 138: 261 - 267
- López Y. Comparación de tres métodos de tinción para determinar la morfometría del espermatozoide de alpaca usando el Integrated Sperm Analysis System (ISAS). Tesis Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú. 2014. 84 pp.
- Marco-Jiménez F, Garzón D, Peñaranda D, Pérez L, Viudes de Castro M, Vicente J, Asturiano J. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation and cryoprotectants. *Cryobiology*. 2006; 53 (1): 51-57.

- Maroto A. Evaluación objetiva de la morfometría de los espermatozoides de ovino (*Ovis aries*). Relaciones con la fertilidad. Tesis Doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos. Albacete. España. 2012
- Maroto-Morales A, García-Álvarez O, Ramón M, Martínez-Pastor F, Fernández-Santos M, Soler A, Garde. Current status and potencial of morphometric sperm analysis. *J. Asian Journal of Andrology*. 2016; 18 (6): 863-870.
- Meza A. Estimación de parámetros de motilidad y determinación de subpoblaciones espermáticas en semen de alpaca (*Lama pacos*), colectado por desviación del conducto deferente. Tesis Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. Cusco. Perú. 2014. 113 pp.
- Neely DP, Bravo PW. Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. In Youngquist RS (ed). *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. USA: WB Saunder. 1998. 787 – 792
- Núñez-Martínez I, Moran JM, Peña FJ. Do computer-assisted, morphometric – derived sperm characteristics reflects DNA status in canine spermatozoa? *Reprod. Domest Anim*. 2005; 40 (6): 537 – 543
- Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H, Chalco. Caracterización morfométrica de los espermatozoides de alpacas usando el Integrated sperm analysis System (ISAS – CASA). *Spermova*; 2012; 2: 67-68.
- Quispe HA, Ciprián R, Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H. Test hipoosmótico en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) recuperados del conducto deferente. *Spermova*. 2015; 5: 10 – 14.
- Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 2004; 48: 36 – 45.
- Ramón M, Pérez-Guzmán MD, Jiménez-Rabadán P, Estes MC, García-Alvarez O, Maroto A, Anel-López L, Soler A, Fernández R, Garde J. Sperm cell population dynamics in ram semen during the cryopreservation process. *PLoS ONE*. 2013; 8 (3): e59189.
- Ugarelli A, Evangelista-Vargas S, Santiani. Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Rev Inv Vet Perú*. 2017; 28: 130 – 140.
- Versteegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*. 2002; 57(1): 149-179.