

CRYOPRESERVATION OF ALPACA SPERMATOZOA OBTAINED VIA POST COPULA IN A TRIS EXTENDER WITH EGG YOLK FROM THREE AVIAN SPECIES.

Criopreservación de espermatozoides de alpaca obtenidos vía post cópula en un diluyente Tris con yema de huevo de tres especies de aves

Wilber García^{1*}, Edwar Maxi², Veronica Macedo², Enrique Ampuero³, Julio Malaga⁴

¹ IVITA-Marangani-
Facultad de Medicina
Veterinaria,
Universidad Nacional
Mayor de San
Marcos, Lima, Perú.

² Escuela Profesional de
Veterinaria,
Universidad Nacional
San Antonio Abad del
Cusco, Cusco, Perú.

³ Escuela Profesional de
Zootecnia,
Universidad Nacional
San Antonio Abad del
Cusco, Cusco, Perú

⁴ Facultad de Medicina
Veterinaria y
Zootecnia,
Universidad Nacional
del Altiplano, Puno,
Peru.

* Corresponding author:
Wilber García; e-
mail:
wgarcia@unmsm.edu.pe

Recibido: 08/01/2021

Aceptado: 20/02/2021

Publicado: 13/08/2021

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the cryopreservation of alpaca spermatozoa obtained via post copula in a Tris extender with egg yolk from three avian species. Forty samples of eight alpacas were collected by the post-copula method. After the collection, we proceeded to evaluate sperm volume, color, motility and concentration. The 25 samples with volume 1 ml and total motility 60% were mixed to form pool (5 samples/pool), divided into three aliquots and diluted in Tris-base with 20% egg yolk from three avian species (hen, quail, paw). These diluted samples were refrigerated for 1,5 h at 5 °C. Once this temperature was reached, the 5% glycerol basic dilutor was added, balanced for 20 min, packed in 0,5 mL straws and frozen in liquid nitrogen vapours for 20 min. The thawed samples were evaluated at different incubation times at 37 °C: 0; 1,5 and 3 h. All parameters of fresh and thawed sperm quality were analyzed using the GLM procedure (ANOVA). The samples collected (fresh) showed a motility of 69,1%, viability of 82,8%, membrane functionality of 77,9% and acrosomal integrity of 85,8%. After the cooling process, no differences were observed between the different egg yolk when comparing the sperm characteristics evaluated ($p > 0,05$). At thawing, motility and acrosomal integrity were superior ($p < 0,05$) when hen and quail were used compared to paw egg yolk. At 1,5 and 3 h of incubation, motility and acrosomal integrity were superior ($p < 0,05$) in the samples with hen and quail with respect to paw. In conclusion, the use of hen and quail provided better cryoprotective action than paw egg yolk in cryopreserved alpaca sperm and incubated at 37°C for 3 h.

Keywords: Spermatozoa, cryopreservation, egg yolk, alpaca

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la criopreservación de espermatozoides de alpaca obtenidos vía post cópula en un diluyente Tris con yema de huevo de tres especies de aves. Se colectaron 40 muestras de ocho alpacas mediante el método post cópula. Tras la colecta, se procedió a evaluar: volumen, color, motilidad y concentración espermáticas. Las 25 muestras con volumen ≥ 1 ml y motilidad total $\geq 60\%$ fueron mezcladas para formar pool (5 muestras/pool), divididas en tres alícuotas y diluidas en Tris-base con 20 % de yema de huevo de tres especies de aves (gallina, codorniz, pata). Estas muestras diluidas se refrigeraron durante 1,5 h a 5 °C. Alcanzada esta temperatura se agregó el dilutor con glicerol al 5%, se equilibró durante 20 min, se envasaron en pajuelas de 0,5 mL y se congelaron en vapores de nitrógeno líquido por 20 min. Las muestras descongeladas se evaluaron a diferentes tiempos de incubación a 37 °C: 0; 1,5 y 3 h. Todos los parámetros de calidad espermática en fresco y descongelado se analizaron utilizando el procedimiento GLM, (ANOVA). Las muestras colectadas (fresco) presentaron una motilidad de 69,1%, viabilidad de 82,8%, funcionalidad de membrana de 77,9% e integridad acrosomal de 85,8%. Luego del proceso de refrigeración, no se observaron diferencias ($p > 0,05$) en las características espermáticas utilizando yema de huevo de tres especies de aves. Luego de descongelar, la motilidad y la integridad acrosomal fueron superiores ($p < 0,05$) cuando se usó yema de huevo de gallina y codorniz en comparación a la yema de huevo de pata. A 1,5 y 3 h de incubación, la motilidad, e integridad acrosomal fueron superiores ($p < 0,05$) en las muestras con yema de huevo de gallina y codorniz respecto a la yema de huevo de pata. En conclusión, el uso de yema de huevo de gallina y codorniz proporcionaron mejor acción crioprotectora que la pata en espermatozoides criopreservados de alpaca e incubados a 37 °C durante 3 h.

Palabras clave: Espermatozoide, criopreservación, yema de huevo, alpaca

INTRODUCCION

La criopreservación de semen de los camélidos sudamericanos tiene larga historia, siendo la yema de huevo fresca de gallina (YHG) el crioprotector no penetrante más comúnmente utilizado en estas especies (Bravo et al., 2000; Santiani et al., 2005; Morton et al., 2007, 2010; Choez et al., 2017). Su composición es una mezcla compleja basada principalmente en un 68% de lipoproteínas de baja densidad, 16% de lipoproteínas de alta densidad, 10% de levetelinas y 4% de fosfivitinas (revisado por Dauphas et al., 2006). Aunque el mecanismo exacto por el cual la yema de huevo ayuda a preservar los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación sigue siendo desconocido (Salamon y Maxwell 2000), su acción crioprotectora ha sido atribuida en gran parte a las lipoproteínas de baja densidad que protegerían a los espermatozoides contra el shock por frío, al interactuar a nivel de la membrana celular, manteniendo la motilidad espermática, reduciendo la producción del enzima acrosomal hialuronidasa, y manteniendo la integridad de la membrana mitocondrial (Thérien et al., 1999; Bergeron et al., 2004).

En los últimos años numerosos estudios indican que la yema de huevo de diversas especies de aves (pata, codorniz, paloma, gallina y pava), tienen diferentes combinaciones de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol, que podrían causar distintos efectos en la criopreservación del semen de especies domésticas y salvajes (burro: Trimeche et al., 1997; aves: Choi et al., 2001; búfalo: Andrabi et al., 2007; porcino: Bahtgate et al., 2006; caballo: Humes y Webb, 2006; Clulow et al., 2007; chivo: Moreno et al., 2008; toro: Su et al., 2008 y alpaca: Bravo et al., 2013). Asimismo, no hay estudios que comparen el efecto de la yema de huevo de diferentes especies (gallina, pata, codorniz) en los protocolos de criopreservación de espermatozoides de los camélidos sudamericanos. El objetivo de este estudio fue evaluar la criopreservación de espermatozoides de alpaca obtenidos vía post cópula en un diluyente Tris con yema de huevo de tres especies de aves.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio y animales

El estudio se realizó en el Centro de Investigación de Camélidos Sudamericanos "CICAS-La Raya", de la Universidad Nacional San Antonio Abad, situado en el distrito de Marangani, Cusco, Perú, a una altitud de 4200 msnm. Se utilizaron ocho alpacas macho de la raza Huacaya, de 4 a 8 años de edad y peso promedio de $62 \pm 5,1$ kg. Los animales pertenecen al grupo élite de reproductores del centro y se mantuvieron en pasturas naturales durante todo el estudio.

Preparación del diluyente de congelación

Se utilizó el diluyente para congelación de espermatozoides alpacas descrito por Bravo et al. (2000). La fracción A contenía: 3,03 g de Tris; 1,70 g de ácido cítrico; 1,25 g de fructosa; 10 mg de tilosina; 50 mg de gentamicina; 180 mg de lincomicina y 20 ml de yema de huevo de tres especies de aves (gallina-YHG, codorniz-YHC, pata-YHP) y agregando agua bidestilada hasta completar los 100 ml. La fracción B se

preparó con 10 ml de glicerol completando hasta 100 ml con la fracción A.

Colecta de las muestras

La colecta de las muestras espermáticas se realizó durante los meses de enero y febrero mediante el método post cópula descrito por Alarcón et al., (2012). Brevemente, al finalizar la cópula se introdujo un proctoscopio de huso humano por la vagina; se localizó la os externa del cérvix con ayuda de una fuente de luz y se recuperó los espermatozoides (semen + secreciones vaginales) en un tubo de vidrio graduado y mantenido a 30 °C. Tras la colecta, se procedió a evaluar: volumen, color, motilidad y concentración espermáticas. Se colectó un total de 40 muestras, 15 se descartó debido que presentan el volumen ≤ 1 ml y motilidad total ≤ 60 %. A continuación, 5 muestras como promedio fueron mezclados en un solo tubo formando un pool que posteriormente se dividió en tres alícuotas para continuar con la criopreservación.

Criopreservación de las muestras

Para el proceso de crioconservación las alícuotas se diluyeron (1:1) con la fracción A del dilutor a 30 °C al que se le había agregado previamente yema de huevo (gallina, codorniz, pata). Seguidamente, las muestras fueron enfriadas hasta 5 °C en un tiempo de 1,5 h. Alcanzada esta temperatura los espermatozoides enfriados se diluyeron 1:1 con la fracción B del dilutor (concentración final de glicerol de 5%) dejándose equilibrar por 20 min. Luego, las muestras se envasaron en pajuelas de 0,5 ml y se congelaron en vapores de nitrógeno líquido, a 3 cm por encima del nivel durante 20 min. Finalmente fueron sumergidas en nitrógeno líquido para su almacenamiento. Para la descongelación, las pajillas se retiraron del tanque y se sumergió en agua a 37 °C durante 1 min recuperando su contenido en un vial. A continuación, se procedió a la incubación a 37 °C en baño maría seco por 3 h. Las muestras descongeladas se evaluaron a las 0 h (inmediatamente luego del descongelamiento) y 1,5 y 3 h de incubación a 37 °C.

Evaluación de la calidad espermática

Concentración espermática. Se determinó mediante la técnica descrita por (Alarcón et al., 2012) utilizando una cámara de Neubauer. Brevemente, una muestra de semen se diluyó 1:50 o 1:100, de acuerdo con la evaluación previa de la motilidad, en solución de NaCl al 3%. Se expresó en millones de espermatozoides por mililitro.

Motilidad total. Se evaluó en forma subjetiva colocando una alícuota de 10 μ L de la muestra en fresco-diluida de espermatozoides en una lámina precalentada y cubierta con una laminilla precalentada, como describen Evans y Maxwell (1987), y se observó bajo microscopía de luz a 200X.

Viabilidad. Se evaluó utilizando el colorante vital eosina (Hancock, 1957). Se colocó una gota de muestra y una gota del colorante eosina y se incubó a 37 °C por 5 min. Luego, se procedió a realizar el conteo de 200 espermatozoides en un microscopio de contraste de fases a 1000X los espermatozoides vivos (no coloreados) y espermatozoides muertos (coloreados de naranja/rosa).

Funcionalidad de la membrana plasmática. Se utilizó el test hipoosmótico (HOST) de acuerdo (Canorio et al., 2015). Brevemente, se incubaron 100 µl de la muestra en 900 µl del medio hipoosmótico (7,35 g de citrato de sodio y 13,51 g de fructosa en 1000 ml, 150 mOsm/kg) a 37 °C por 60 min. Se evaluó por microscopía a 1000X. Los patrones observados se clasificaron en dos categorías: 1- espermatozoides con enrollamiento de la cola (membrana funcional: HOST positivo) y 2- espermatozoides sin enrollamiento de la cola (membrana no funcional: HOST negativo).

Integridad acrosomal. Se evaluó por medio de la tinción de eosina-nigrosina (Bamba, 1988). Para esta técnica utilizamos colorante eosina que se adhiere a la membrana acrosomal dañado. En portaobjetos temperados a 37 °C se colocó 10 µl de muestra y 10 µl de eosina-nigrosina y se incubó a 37 °C por 5 min. y con la ayuda de un microscopio óptico a 1000X se evaluaron 200 espermatozoides en varios campos del microscopio. Se consideraron como espermatozoides con acrosoma íntegro, aquellos donde se observa una especie de semiluna de color blanco con bordes muy nítidos, sin ninguna irregularidad en la parte más externa de la cabeza del espermatozoide.

Análisis Estadístico

Los datos se analizaron utilizando el procedimiento GLM, (ANOVA) de SPSS 23 (SPSS Inc, Chicago, IL, EE. UU). Se utilizó estadística descriptiva para analizar el volumen, color y concentración de las muestras colectadas. Los parámetros de motilidad, viabilidad, HOST+ e integridad acrosomal, de espermatozoides frescos, descongelado e incubados a 1.5 y 3 h fueron transformados a valores angulares (ángulo=arcoseno

√porcentaje final) para acercar los datos a la distribución normal. Para determinar de diferencias estadísticas entre tratamientos se utilizó la prueba de análisis de varianza, así como la prueba de Duncan.

RESULTADOS

Los resultados de las variables evaluadas en las 40 muestras colectadas por el método post cópula pueden observarse en la Tabla 1, de las cuales 25 muestras se utilizaron para el pool y el resto se descartó.

Tabla 1. Valores medios \pm desviación estándar, valores máximos y mínimos de las características seminales en muestras post cópula (n= 8; repeticiones= 5).

Variables	Media \pm D.E.	Min	Max
Volumen (mL)	3,6 \pm 2,9	0,5	11
Conc. Esperm. (10 ⁶ /mL)	138 \pm 37,1	94	182,1
Motilidad (%)	55,7 \pm 12,9	10	80
Esperm normales (%)	73,6 \pm 8,5	64,2	84,6
Color (%)			
- Rojo claro	65,9		
- Rojo oscuro	15,9		
- Blanco lechoso	13,6		
- Blanco cristalino	4,6		

Tabla 2. Motilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática (HOST+) e integridad acrosomal en las muestras de alpaca diluidas, refrigeradas y congeladas-descongeladas con yema de huevo de tres especies de aves (gallina (YHG), codorniz (YHC) y pata (YHP))

Características	Tipo de yema	Diluidas	Refrigeradas	Descongeladas
Motilidad (%)	YHG		61,5 \pm 2,2	49,0 \pm 2,3 ^b
	YHC	69,1 \pm 10,5	57,3 \pm 1,8	50,2 \pm 1,4 ^b
	YHP		60,4 \pm 2,2	40,9 \pm 1,9 ^a
Viabilidad (%)	YHG		79,7 \pm 1,7	56,7 \pm 3,2
	YHC	82,8 \pm 6,1	78,3 \pm 1,2	56,7 \pm 5,2
	YHP		78,8 \pm 2,5	63,3 \pm 5,3
HOST+ (%)	YHG		76,5 \pm 2,7	50,4 \pm 2,8
	YHC	77,9 \pm 5,8	76,1 \pm 2,7	51,5 \pm 3,0
	YHP		77,9 \pm 2,1	52,3 \pm 3,6
Integridad Acrosomal (%)	YHG		80,8 \pm 1,6	77,7 \pm 1,4 ^b
	YHC	85,8 \pm 5,4	80,8 \pm 2,4	77,0 \pm 1,6 ^b
	YHP		75,7 \pm 2,2	71,2 \pm 1,6 ^a

^{a-b}Letras diferentes dentro de una misma columna representan diferencias significativas para cada una de las características evaluadas (p<0,05).

Los resultados de motilidad, viabilidad, funcionalidad de la membrana plasmática (HOST) e integridad acrosomal en las muestras diluidas, refrigeradas y congeladas-descongeladas se observan en la Tabla 2. En las muestras descongeladas, la motilidad y la integridad acrosomal fueron mejores (p<0,05) cuando se utilizó yema de huevo de gallina y

codorniz en comparación con la de pata, no observándose diferencias significativas entre la yema de huevo de gallina y codorniz. En el caso de la viabilidad y funcionalidad de membrana, no se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los tres tipos de yema de huevo en las muestras descongeladas.

Al incubar los espermatozoides descongelados, la yema de huevo de gallina y codorniz proporcionaron valores superiores ($p < 0,05$) de motilidad, e integridad acrosomal respecto a la de pata (YHP), tanto a las 1,5 como a las 3 h de incubación (Figura 1).

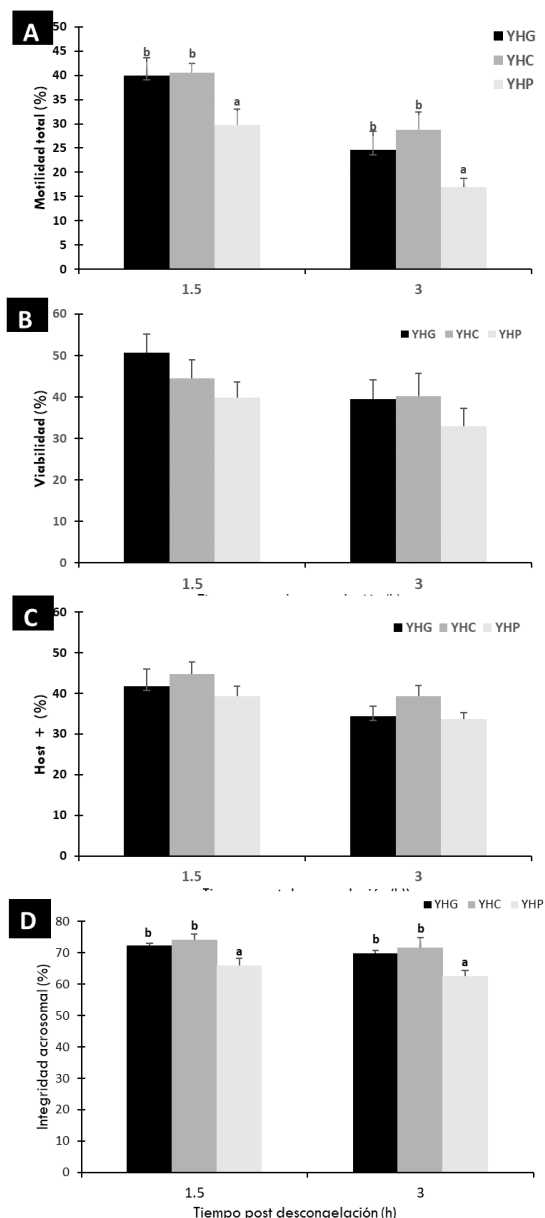


Figura 1. Efecto de la incubación durante 1,5 y 3 h en espermatozoides de alpaca descongelados en dilutor tris con yema de huevo de tres especies de aves (YHG, YHC y YHP). (A) evaluación de motilidad, (B) viabilidad, (C) funcionalidad de membrana e (D) integridad acrosomal. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en los diferentes tratamientos (YHG, YHC y YHP) para un mismo tiempo de incubación.

DISCUSIÓN

Las características seminales encontradas en este estudio en las muestras post cópula (Tabla 1) fueron similares a otros

reportes en alpacas (Alarcón et al., 2012; Bravo et al., 2013; García, 2015; García et al., 2017) colectadas post cópula y en llamas (Aller et al., 2003) colectada con vagina artificial (VA). Sin embargo, los valores de motilidad, viabilidad, funcionalidad de membrana e, integridad acrosomal fueron mejores al semen colectado mediante VA en alpacas (Dávalos y Olazábal, 2002; Santiani et al., 2005; Zirena, 2014; Morton et al., 2007), electroeyaculación en llamas (Giuliano et al., 2012) y a los observados en espermatozoides epididimarios de alpacas (Canorio et al., 2015; Ugarelli et al., 2017; Choez et al., 2017; Juárez y Santiani, 2019).

Por otro lado, la concentración espermática fue inferior a los valores reportados por estos autores, tanto en alpacas como en llamas. Las diferencias entre los parámetros seminales analizados podrían deberse a la ya reportada variabilidad inherente a la especie, la cual se manifiesta no sólo con diferencias entre los machos y eyaculados de un mismo macho, sino también de acuerdo con la época del año, a la edad, al método de colecta y a las diferentes técnicas de evaluación de las características espermáticas utilizadas (Bravo, 2000; Aller et al., 2003; Tibary y Vaughan, 2006; Giuliano et al., 2012). Así, eyaculados obtenidos por VA en alpacas tienden a presentar menor volumen, concentración y viscosidad, cuando se incrementa la frecuencia de colecta (Bravo et al., 2013).

Giuliano et al. (2008) observaron eyaculados con mayor volumen, movilidad e integridad de la membrana espermática y con menor porcentaje de cabezas sueltas al utilizar EE respecto a la VA. De igual manera, Alarcón et al., (2012) compararon el semen obtenido por método post cópula con el método de VA en alpacas, obteniendo semen de menor viscosidad y mejor calidad seminal con el método post cópula y más manejable en términos de evaluación y adición del dilutor.

La criopreservación de semen de alpaca ha tenido un progreso pobre y desalentador comparado con otras especies domésticas (Vaughan et al., 2003; Santiani et al., 2005), así como también no existen datos disponibles en criopreservación de espermatozoides de alpaca utilizando yema de huevo de tres especies de aves. La yema de huevo es el crioprotector no penetrante más utilizado durante el proceso de criopreservación debido a su capacidad de estabilizar la membrana de los espermatozoides (Salomon y Maxwell, 2000).

La yema de huevo de diferentes especies de aves ha sido exitosamente utilizada como crioprotector para la criopreservación de espermatozoides en ciertas especies, especialmente equino y ovino (Clulow et al., 2007; Su et al., 2008; Kulaksız et al., 2010; García et al., 2017). Al analizar los resultados del presente estudio podemos afirmar que no se aprecian grandes diferencias al comparar la yema de huevo de gallina con la de codorniz y la de pata en la protección de los espermatozoides de alpaca durante el proceso de refrigeración. Cabe destacar, una vez descongeladas las muestras, la YH de gallina y codorniz proporcionaron mayores valores de motilidad e integridad acrosomal respecto a la yema de huevo de pata. Esta misma tendencia se presentó cuando se incubaron los espermatozoides descongelados. Cabe indicar, que no se encontraron diferencias en ninguna de las características espermáticas evaluadas en las muestras descongeladas e incubadas al comparar la yema de huevo de

gallina y la de codorniz. Contrariamente, otros investigadores como Moreno et al. (2008) observaron mejores valores de motilidad, funcionalidad de la membrana plasmática y viabilidad en la YHG al comparar con YHC en espermatozoides epididímales descongelados de macho cabrío. En cambio, Trimeche et al. (1997) observaron mejores parámetros cinéticos de velocidad espermática en muestras de semen de burro congeladas con YHC respecto a las congeladas con YHG. Por otra parte, Andrabi et al. (2007) y Clulow et al. (2007) obtuvieron una mejor calidad espermática en términos de motilidad, viabilidad e integridad de la membrana plasmática en espermatozoides descongelados de búfalo y caballo, cuando utilizaron YHP como crioprotector, en comparación a la YHG y pava. Las diferencias observadas entre nuestros resultados y los de otros autores pueden atribuirse a la diferente composición de la YH según la especie, por ejemplo, la YHP tiene mayor cantidad de ácidos grasos monoinsaturados que la YH de gallina y codorniz (Bathgate et al., 2006), mientras que la YHC contiene cantidades significativamente mayores de fosfatidilcolina y menores de fosfatidiletanolamina y ácidos grasos poliinsaturados que la YHG (Trimeche et al., 1997). Además, debemos tener en consideración que la YH de gallina, codorniz y pata tienen una proporción diferente de los ácidos grasos que comprenden los lípidos totales de la yema (Bathgate et al., 2006). Estas diferencias químicas pueden explicar, en parte, los resultados distintos cuando se utilizan diferentes tipos de yema de huevo para criopreservar los espermatozoides (Bathgate et al., 2006). Cabe destacar que, el método de criopreservación utilizado, los aditivos en el diluyente y la proporción colesterol/fosfolípidos de la membrana plasmática, son factores importantes para tener en cuenta al momento de criopreservar espermatozoides (Poulos et al., 1973). De hecho, los espermatozoides de toro, carnero y cerdo presentan una mayor susceptibilidad al choque térmico debido a la menor proporción de colesterol presente en sus membranas con respecto al humano y conejo (Darin-Bennett y White, 1977). Estas diferencias en la composición de la membrana plasmática y los diferentes componentes de la YH pueden redundar en interacciones especie-específicas durante la criopreservación de los espermatozoides (Moreno et al., 2008) que contribuyan a la observación de diferentes resultados.

CONCLUSIONES

La yema de huevo de gallina o de codorniz proporcionaron mejor acción crioprotectora que la yema de huevo de pata en espermatozoides criopreservados de alpaca e incubados a 37 °C durante 3 horas. En base a los resultados de este estudio, se recomienda realizar una evaluación de la fertilidad mediante inseminación artificial con el objetivo de confirmar la inclusión de estos dos crioprotectores en la criopreservación de los espermatozoides de alpacas.

AGRACEDICMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias al proyecto N.º 014-FONDECYT-BM.

CONTRIBUCIÓN DE AUTORES

Concepción y diseño del estudio (WG), adquisición de datos (EM y VM), análisis e interpretación de los datos (JM y EA), redacción del artículo y aprobación (WG).

CONFLICTO DE INTERESES

No hay conflicto de intereses

REFERENCIA

- Alarcón V, García W, Bravo W. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2012; 23: 58-64. <https://doi.org/10.15381/rivep.v23i1.882>
- Aller J, Rebuffi G, Cancino A, Alberio R. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *Arch. Zootec.* 2003; 52: 15-23. <https://www.researchgate.net/publication/28104494>
- Andrabi S, Ansari M, Ulah N, Anwar M, Mehmood A, Akter S. Duck egg yolk in extender improves the freezability in buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2007; 104: 427-433. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.07.003>
- Bathgate R, Maxwell W, Evans G. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction in Domestic Animals* 2006; 41: 68-73. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x>
- Bamba K. Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology* 1988; 29:1245-1251. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90004-0)
- Bergeron A, Crete M, Brindle Y, Manjunath P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biology of Reproduction* 2004; 70: 708-717. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022996>
- Bravo W, Skidmore A, Zhao X. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science* 2000; 62: 173-193. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00158-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00158-5)
- Bravo W, Alarcon V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, Tito F. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Animal Reproduction Science* 2013; 136: 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.10.005>
- Canorio N, Paredes P, Valdivia M. Agentes Crioprotectores Alternativos para el Congelamiento Lento de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca (Vicugna pacos) *Rev. Inv. Vet. Perú* 2015; 26(3): 434-443 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v26i3.11185>
- Choez K, Ruiz L, Sandoval R, Evangelista S, Santiani A. Determinación de la Concentración Óptima de Tres Crioprotectores para la Criopreservación de Espermatozoides Epididimarios de Alpaca. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2017; 28(3): 619-628 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i3.13367>
- Choi S, Song K, Oh H. Cholesterol contents and fatty acid composition of chukar, pheasant, guinea fowl and quail egg yolk. *Asian-Australian Journal Animal Science* 2001; 14: 831-836. <https://doi.org/10.5713/ajas.2001.831>
- Clulow J, Maxwell W, Evans G, Morris L. A comparison of duck and chicken egg yolk for the cryopreservation of

- stallion sperm. *Australian Veterinaria Journal* 2007; 85: 232–235.
<https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2007.00151.x>
13. Darin-Bennett A, White I. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 1977; 14: 466–470.
[https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90008-6)
 14. Dauphas S, Beaumal B, Riaublanc A, Anton M. Hen Egg Yolk Low-Density Lipoproteins Film Spreading at the Air-Water and Oil-Water Interfaces. *Journal Agriculture and Food Chemistry* 2006; 54: 3733-3737
<https://doi.org/10.1021/jf053174e>
 15. Dávalos R, Olazábal J. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2002; 13: 98-99. <https://doi.org/10.15381/rivep.v13i2.7340>
 16. Evans G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney, Australia: Butterworths. 1987; 194 p.
 17. García W. Nueva metodología de colección de semen e inseminación artificial en alpacas y llamas [conferencia]. VII Congreso Mundial en Camélidos Sudamericanos. 2015; Puno, Perú.
 18. 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. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.13080>
 19. Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal Reproduction Science* 2008; 104: 359–369.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.02.016>
 20. Giuliano S, Chavez M, Trasorras V, Gambarotta M, Neild D, Director A, Pinto M, Miragaya M. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Animal Reproduction Science* 2012; 131: 204-210.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.010>
 21. Hancock J. The morphology of boar spermatozoa. *J. R. microsc. Soc.* 1957; 76: 84-97.
 22. Humes R, Webb G. Use of chicken or chukar egg yolk with two cryoprotectants for preservation of stallion semen. *Animal Reproduction Science* 2006; 94: 62–63.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.023>
 23. Juárez J, Santiani A. Determinación del porcentaje de viabilidad espermática mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación en espermatozoides obtenidos de epidídimo de alpaca. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2019; 30(3): 1175-1183
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i3.16608>
 24. Kulaksız R, Cebic E, Daskin A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research* 2010; 88:12–15.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.014>
 25. Moreno J, Coloma M, Diaz A, Brunet A, Pastor A, Soria A, Carrizosa J, Urritia B, Sebastian A. A comparison of the protective action of chicken and quail egg yolk in the cryopreservation of Spanish ibex epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 2008; 57: 25–29.
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2008.05.001>
 26. Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of Citrate, Tris and Lactose based diluents, and pellets and straws. *Reproduction Fertility and Development* 2007; 19:792– 6.
<https://doi.org/10.1071/RD07049>
 27. Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology* 2010; 74: 311–316
 28. Poulos A, Darrin-Bennet A, White I. The phospholipidbound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. *Biochemistry Molecular Biology* 1973; 46: 41–549.
 29. Salamon S, Maxwell W. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 2000; 62: 77-111.
[https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
 30. Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian Journal Andrology* 2005; 7: 303-309.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x>
 31. Su L, Li X, Quan X, Yang S, Li Y, He X, Tang X. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal Reproduction Science* 2008; 104: 212–219.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.019>
 32. Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Bovine Seminal Plasma Phospholipid-Binding Proteins Stimulate Phospholipid Efflux from Epididymal Sperm. *Biology of Reproduction*, 1999; 61: 590–598.
 33. Tibary A, Vaughan J. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations', *Small Ruminant Research* 2006; 61: 283-298.
<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.018>
 34. Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology* 1997; 34: 385–393. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2009>
 35. Ugarelli A, Evangelista-Vargas S, Santiani A. Evaluación de la Integridad Acrosomal en Espermatozoides Epididimarios de Alpaca mediante Citometría de Flujo. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2017; 28(1): 130-140
<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v28i1.12947>
 36. Vaughan J, Galloway D, Hopkins D. Artificial insemination in alpacas (*Lama pacos*). RIRDC Rural Industries Research and Development Corporation 2003; Pub. No. 03/104, Kingston, Australia, pp. 74–77.
<http://www.rirdc.gov.au/reports/Index.htm>
 37. Zirena N. Comparación de dos métodos físicos en el tratamiento del semen fresco de alpaca y su relación con la calidad espermática post congelación. 2014; [Tesis para optar al grado de Médico Veterinario, Universidad Nacional Mayor de San Marcos].
<https://hdl.handle.net/20.500.12672/4313>.