

## Efecto de la criopreservación en la integridad acrosomal de espermatozoides viables de alpaca evaluada mediante citometría de flujo

Effect of cryopreservation on the acrosomal integrity of viable alpaca spermatozoa evaluated by flow cytometry

María Pérez-Rosales<sup>1</sup>, Brian Román<sup>2</sup>, Alexei Santiani<sup>1,3</sup>

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de la criopreservación sobre la integridad acrosomal en espermatozoides viables de alpaca. Se procesaron muestras de 46 testículos de alpaca que presentaron una motilidad  $\geq 30\%$  y concentración espermática  $\geq 50 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo se separaron en dos alícuotas de 500  $\mu\text{l}$ . La primera alícuota fue para la evaluación inicial en fresco y la segunda alícuota se congeló en pajillas que fueron almacenadas en nitrógeno líquido hasta el día de su evaluación. Para la evaluación de viabilidad e integridad acrosomal, 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra fueron incubadas con 2.5  $\mu\text{l}$  de FITC-PSA (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y 0.5  $\mu\text{l}$  de ioduro de propidio (PI, 2.4 mM) por 10 min a 38 °C. Inmediatamente después, las muestras se evaluaron por citometría de flujo, adquiriéndose diez mil eventos compatibles con espermatozoides por muestra. FITC-PSA y PI fueron excitados con un láser de 488 nm, y la emisión de fluorescencia fue detectada utilizando los canales Ch02 (505-560 nm) para FITC-PSA y Ch05 (642-740nm) para PI. Se determinó el porcentaje de espermatozoides con integridad acrosomal (FITC-PSA negativos) de la población de espermatozoides viables (PI negativos). Se utilizó la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon para determinar como la criopreservación afecta la integridad acrosomal en los espermatozoides viables. Se encontró que la integridad acrosomal de los espermatozoides viables frescos ( $98.25 \pm 5.41\%$ ) fue similar a la de los espermatozoides

<sup>1</sup> Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Biotecnologías Reproductivas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

<sup>3</sup> E-mail: [asantiania@unmsm.edu.pe](mailto:asantiania@unmsm.edu.pe)

Recibido: 1 de octubre de 2019

Aceptado para publicación: 18 de junio de 2020

Publicado: 11 de agosto de 2020

viabiles pos-descongelamiento ( $98.75 \pm 2.17\%$ ). Se concluye que los espermatozoides viabiles de alpaca antes y después del proceso de criopreservación mantienen un elevado porcentaje de integridad acrosomal.

**Palabras clave:** alpaca, espermatozoides, viabilidad, integridad acrosomal, FITC-PSA, yoduro de propidio, citometría de flujo

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of cryopreservation on acrosomal integrity in viable alpaca sperm. Samples from 46 alpaca testicles that had motility  $>30\%$  and sperm concentration  $>50 \times 10^6$  sperm/ml were processed. Sperm recovered from the tail of the epididymis were separated into two 500  $\mu$ l aliquots. The first aliquot was for the initial fresh evaluation and the second aliquot was frozen in straws and stored in liquid nitrogen until the evaluation of acrosomal integrity. For the evaluation of viability and acrosomal integrity, 100  $\mu$ l of each sample were incubated with 2.5  $\mu$ l of FITC-PSA (100  $\mu$ g/ml) and 0.5  $\mu$ l of propidium iodide (PI, 2.4 mM) for 10 min at 38 °C. Immediately afterwards, the samples were evaluated by flow cytometry, acquiring 10 000 events compatible with sperm per sample. FITC-PSA and PI were excited with a 488 nm laser, and fluorescence emission was detected using channels Ch02 (505-560 nm) for FITC-PSA and Ch05 (642-740 nm) for PI. The percentage of sperm with acrosomal integrity (FITC-PSA negative) of the population of viable sperm (PI negative) was determined. Wilcoxon's signed rank test was used to determine how cryopreservation affects acrosomal integrity in viable sperm. The acrosomal integrity of fresh viable spermatozoa ( $98.25 \pm 5.41\%$ ) was found to be similar to that of viable post-thaw spermatozoa ( $98.75 \pm 2.17\%$ ). It is concluded that viable alpaca sperm before and after the cryopreservation process maintain a high percentage of acrosomal integrity.

**Key words:** alpaca, spermatozoa, viability, acrosomal integrity, FITC-PSA, propidium iodide, flow cytometry

## INTRODUCCIÓN

El acrosoma es una organela presente en la zona apical de la cabeza del espermatozoide que juega un papel fundamental en la fecundación. La reacción acrosomal permite el ingreso del espermatozoide al espacio perivitelino del ovocito mediante la fase de penetración de la zona pelúcida, permitiendo la posterior recombinación genética de ambos gametos y formación del embrión (Januskauskas *et al.*, 2000). Ickowicz (2012) demostró que la reacción acrosomal es pro-

ducida por una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos como la elevación de calcio, la fosfoliración de la  $PI_3K$ , la hidrolización de  $PIP_2$ , la despolarización de la F-actina y finalmente la reacción acrosómica. Las muestras seminales que presentan un gran porcentaje de espermatozoides con daño acrosomal tienen generalmente una fertilidad baja (Peña y Linde-Forsberg, 2000). Por ello, la capacidad fecundante de las muestras espermáticas puede estimarse a través de la evaluación de la integridad acrosomal y viabilidad.

La técnica de citometría de flujo ha ofrecido una mayor precisión al evaluar la calidad espermática (Hallap *et al.*, 2005), debido a que permite evaluar un gran número de espermatozoides por muestra en un tiempo menor en comparación a otros métodos, además de analizar varios parámetros en un mismo espermatozoide (Graham *et al.*, 1990). Utilizando la citometría de flujo se ha reportado la evaluación de viabilidad e integridad acrosomal como parámetro en especies tales como el ovino (Hernández *et al.*, 2012a), equino (Hernández *et al.*, 2012b), bovino (Januskauskas *et al.*, 2000), además de espermatozoides de alpaca (Cheuquemán *et al.*, 2013; Santiani *et al.*, 2016; Ugarelli *et al.*, 2017).

En la alpaca se reporta que la integridad acrosomal en espermatozoides frescos varía alrededor del 90%. Por otro lado, recientemente se ha demostrado que el proceso de criopreservación induce la pérdida de viabilidad espermática (Juárez y Santiani, 2019) y del potencial de membrana mitocondrial (Allauca *et al.*, 2019); sin embargo, no existe información de la integridad acrosomal en los espermatozoides de alpaca que sobreviven al proceso de criopreservación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la criopreservación sobre la integridad acrosomal de los espermatozoides viables de alpaca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar y Muestras

Se emplearon 52 testículos/epidídimos provenientes del camal municipal de Ninacaca, Pasco (Perú), los cuales fueron enviados al Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, para su procesamiento. En el laboratorio se seleccionaron 46 epidídimos de testículos con peso mayor o igual a 10 g, longitud testicular mayor o igual a 3 cm, concen-

tración espermática mayor o igual a  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml (recuento realizado mediante cámara de Neubauer) y motilidad mayor o igual a 30% (evaluada en forma subjetiva mediante microscopía). Seis testículos/epidídimos fueron descartados por no cumplir con los criterios de inclusión.

### Recuperación de Espermatozoides

Inmediatamente después del beneficio se colectaron ambos testículos y se colocaron en bolsas herméticas con NaCl 0.9% dentro de cajas de transporte a 4 °C para ser trasladados a Lima en las próximas 20 horas. En el laboratorio, se realizó el lavado y separación de la cola del epidídimo, la cual fue lavada con PBS temperado (38 °C) y colocada en una placa Petri. Se le adicionó 1.5 ml del dilutor a base de leche descremada, yema de huevo y fructosa, de acuerdo con lo descrito por Santiani *et al.* (2005). Posteriormente, con una hoja de bisturí se realizaron cortes seriados sobre la superficie de la cola para la recuperación de los espermatozoides.

Se utilizó 10 µl de la suspensión para la evaluación de la motilidad espermática y 10 µl para la evaluación de la concentración espermática. Así mismo, se separaron dos alícuotas de 500 µl, una para la evaluación en fresco y la otra luego del congelamiento.

### Criopreservación y Descongelamiento

Las muestras diluidas fueron envasadas en pajillas de plástico de 0.25 ml y congeladas utilizando el programa #7 del sistema automático de congelamiento (Freeze Control®, Cryologic, Australia). Brevemente, se inició con 18 °C, descendiendo la temperatura hasta 5 °C en un periodo de 90 min, cuando se realizó una meseta de 5 °C por 30 min, y finalmente se sumergieron en nitrógeno líquido (-196 °C), donde permanecieron hasta su evaluación.

La descongelación de las pajillas se realizó en baño maría (38 °C) por 1 min (Morton *et al.*, 2007). La viabilidad e integridad acro-

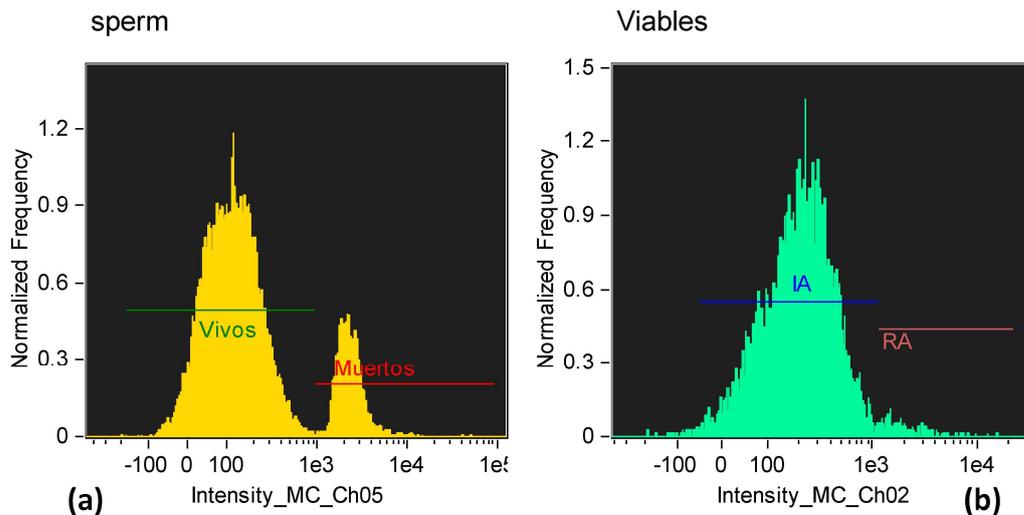


Figura 1. Histogramas para seleccionar las poblaciones de espermatozoides viables (a) y de espermatozoides con acrosoma intacto (b). (a) Intensidad de fluorescencia en canal 5 (PI). La población de la izquierda tiene baja intensidad de fluorescencia en canal 5, considerándose espermatozoides viables; (b) Intensidad de fluorescencia en canal 2 (FITC-PSA). Se observa que la mayoría de los espermatozoides viables tienen baja intensidad de fluorescencia en canal 2, considerándose espermatozoides viables con acrosoma intacto

somal se evaluaron en todas las muestras mediante citometría de flujo, antes y después del proceso de criopreservación. Del mismo modo, se evaluó la motilidad mediante microscopía (400x).

### Viabilidad e Integridad Acrosomal

Para la evaluación espermática se empleó el fluorocromo ioduro de propidio (PI, L7011, Molecular-Probes) como indicador de espermatozoides no viables y el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína conjugado con *Pisum sativum* (FITC-PSA, L0770, Sigma-Aldrich), como indicador de daño acrosomal. Antes de la incubación con estos fluorocromos, se retiró el dilutor de las muestras mediante dos lavados por centrifugación con 1 ml de PBS (600 G durante 8 min). Luego, los pellets obtenidos fueron resuspendidos con 100  $\mu$ l de PBS a 38 °C. Posteriormente, a 100  $\mu$ l de cada muestra se le agregó 2.5  $\mu$ l de

FITC-PSA (100  $\mu$ g/ml) y 0.5  $\mu$ l de PI (2.4 mM). Se incubaron las muestras a 38 °C en oscuridad por 10 min.

### Citometría de Flujo

Las muestras fueron evaluadas utilizando un citómetro de flujo con analizador de imágenes FlowSight (Amnis, Seattle, WA, USA) adquiriendo 10 000 eventos compatibles con espermatozoides mediante el programa INSPIRE v. 100.3.218.0 (Amnis, Seattle, WA, USA). Para la identificación de la población de espermatozoides se consideró el tamaño y la proporción largo/ancho de cada evento. Un láser de 488 nm con una potencia de 20 mW fue utilizado para excitar a FITC-PSA y PI. La fluorescencia emitida por FITC-PSA fue detectada en el canal 2 (Ch02: 505-560 nm) y la fluorescencia emitida por PI fue detectada en el canal 5 (Ch05: 642-740 nm). Se utilizó el software de análisis

Cuadro 1. Espermatozoides epididimarios de alpacas, frescos y descongelados, analizados con los fluorocromos FITC-PSA y PI para evaluar integridad acrosomal de los espermatozoides viables (n=46 muestras)

	Integridad acrosomal de espermatozoides viables	
	Muestras frescas (%)	Muestras descongeladas (%)
Promedio	98.25	98.75
Mediana	99.67	99.37
Desviación estándar	5.41	2.17
Coefficiente de variación	5.50	2.20
Intervalo de confianza	1.61	0.65

sis de datos IDEAS v. 6.2 (Amnis, Seattle, WA, USA) el cual permitió utilizar histogramas para PI y FITC-PSA.

Se consideraron espermatozoides vivos a aquellos que presentaron baja intensidad de fluorescencia en el canal 5 (PI), tal como se observa en la Figura 1a. Luego, considerando únicamente a los espermatozoides viables, se realizó un histograma para detectar la intensidad de fluorescencia en canal 2 (FITC-PSA). Se consideraron espermatozoides vivos con integridad acrosomal a los que no mostraron fluorescencia en el canal 2 (FITC-PSA), tal como se observa en la Figura 1b.

#### Análisis Estadístico

Los parámetros de integridad acrosomal en espermatozoides viables y de motilidad fueron evaluados mediante el test de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para determinar si siguen la distribución normal. Para evaluar el efecto de la criopreservación sobre el porcentaje de integridad acrosomal en espermatozoides viables se utilizó la prueba de rangos y signos de Wilcoxon; mientras que para evaluar el efecto de la criopreservación sobre la motilidad se utilizó la prueba de t-student pareada. Se empleó el paquete estadístico SPSS Statistics 22.0.

## RESULTADOS

Se obtuvo una viabilidad en espermatozoides frescos de 75 y de 42% en espermatozoides congelados/descongelados. Los valores de la integridad acrosomal de los espermatozoides viables de las muestras frescas y congeladas/descongeladas se presentan en el Cuadro 1. La integridad acrosomal de las muestras frescas fue de  $98.25 \pm 5.40\%$ , mientras que en las muestras congeladas/descongeladas fue de  $98.75 \pm 2.17\%$ .

El efecto de la criopreservación sobre la integridad acrosomal de los espermatozoides viables no presentó diferencias significativas. Los resultados muestran valores similares de integridad acrosomal entre las muestras de espermatozoides frescos ( $98.25 \pm 5.41\%$ ) y las muestras de espermatozoides descongelados ( $98.75 \pm 2.17\%$ ) (Cuadro 2). Ejemplos de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y espermatozoides muertos con reacción acrosomal se muestran en la Figura 2. Por otro lado, se observa que la motilidad disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) por efecto de la criopreservación ( $46.63 \pm 7.68\%$  en muestras frescas vs.  $23.74 \pm 6.24\%$  en muestras congeladas/descongeladas).

Cuadro 2. Evaluación de la integridad acrosomal de espermatozoides viables y de la motilidad en espermatozoides epididimarios de alpaca frescos y congelados/descongelados

	Espermatozoides	
	Frescos	Descongelados
Integridad acrosomal (%)	98.25 ± 5.41 <sup>a</sup>	98.75 ± 2.17 <sup>a</sup>
Motilidad (%)	46.63 ± 7.68 <sup>a</sup>	23.74 ± 6.24 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes en las filas indican diferencia estadística significativa  $p < 0.05$ .

El análisis de correlación entre la motilidad espermática y la integridad acrosomal de espermatozoides viables presentó una correlación positiva débil ( $r = 0.1528$ , pero no significativa ( $p = 0.1458$ )).

## DISCUSIÓN

Este es el primer reporte que confirma que la integridad acrosomal de los espermatozoides viables no varía significativamente durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas analizados mediante el citómetro de flujo, utilizando los fluorocromos yoduro de propidio y FITC-PSA. La membrana acrosomal delimita el acrosoma, protegiendo las enzimas hidrolíticas que lo conforman; de allí la importancia de que se mantenga intacta la membrana acrosomal en los espermatozoides viables.

Se esperaba encontrar valores elevados de integridad acrosomal en los espermatozoides viables en muestras espermáticas frescas de alpaca. Santiani *et al.* (2013, 2016) evaluaron eyaculados de alpaca obteniendo 46 y 61% de viabilidad con integridad acrosomal, mientras que Ugarelli *et al.* (2017) reportaron valores de 61%. No obstante, en el presente estudio se encontraron valores superiores de integridad acrosomal (98.25%),

esto posiblemente debido a que en el estudio de Santiani *et al.* (2013) se utilizó la técnica de doble tinción con azul de tripán y Giemsa, la cual es una técnica subjetiva. Por otro lado, el 61% de integridad acrosomal reportado por Ugarelli *et al.* (2017) y Santiani *et al.* (2016) corresponde al total de espermatozoides evaluados, incluyendo la población de espermatozoides muertos, mientras que en este estudio solo se incluyeron espermatozoides viables.

La calidad espermática disminuyó significativamente por el proceso de criopreservación, disminuyendo asimismo la cantidad de espermatozoides viables; sin embargo, el porcentaje de integridad acrosomal dentro del grupo de espermatozoides viables se mantuvo alrededor del 98%. En el estudio de Santiani *et al.* (2013) se obtuvo 33% de espermatozoides viables con integridad acrosomal; es decir, una disminución del 13% tras la criopreservación. Ccalta *et al.* (2017), utilizando el método de tinción de Coomassie, obtuvo 45% de integridad acrosomal en espermatozoides descongelados de alpaca, lo que indicó una disminución de 32% de la integridad acrosomal; sin embargo, en dicho estudio no se especifica si se incluyeron espermatozoides viables y muertos, ya que se evaluó a la integridad acrosomal como variable independiente.

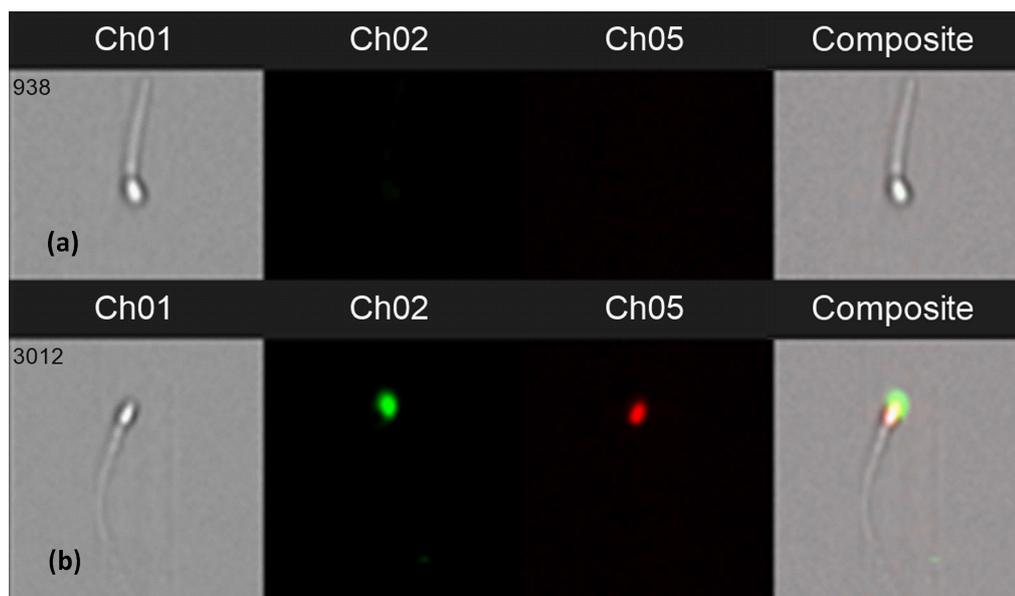


Figura 2. Espermatozoides epididimarios de alpaca evaluados mediante el sistema analizador de imagen del citómetro de flujo observados en campo claro (Ch01), canal 2 (Ch02), canal 5 (Ch05) y con una imagen compuesta de los canales 1, 2 y 5 (Composite). (a) Espermatozoide viable con integridad acrosomal (FITC-PSA negativo / PI negativo). (b) Espermatozoide muerto con daño acrosomal (FITC-PSA positivo / PI positivo)

No se disponen de reportes adicionales sobre la integridad acrosomal en los espermatozoides viables de alpaca luego del proceso de criopreservación; sin embargo, Hernández *et al.* (2012a,b) evaluaron eyaculados de ovinos y equinos, respectivamente, utilizando el fluorocromo FITC-PNA y PI, encontrando que los espermatozoides descongelados presentaron 27 y 43% de viabilidad e integridad acrosomal, lo cual indicaba una disminución de 49 y 22% de espermatozoides viables de ovinos y equinos, respectivamente con integridad acrosomal. En dichos estudios, no obstante, los resultados son expresados sobre el total de espermatozoides evaluados, no permitiendo determinar si la disminución de las poblaciones de viabilidad con integridad acrosomal fue debido a la muerte de los espermatozoides o a la reacción acrosomal.

La medición de la viabilidad en conjunto con la integridad acrosomal es un parámetro que indica la capacidad fecundante de la muestra espermática, por lo que es necesario conocer el porcentaje de espermatozoides vivos que mantienen la capacidad fecundante después del proceso de criopreservación. Este estudio demuestra que la integridad acrosomal se mantiene porcentualmente dentro del grupo de espermatozoides vivos, incluso después del proceso de criopreservación.

La motilidad en las muestras frescas fue de 46.33% y en muestras congeladas/descongeladas de 23.74% ( $p < 0.05$ ). En trabajos similares se encontraron diferencias análogas; así Valdivia *et al.* (1999) reportaron 98 y 20% de motilidad en muestras frescas y congeladas/descongeladas, mientras que Santiani

*et al.* (2005, 2013) reportaron 72 y 53% de motilidad en muestras frescas y 20 y 22% en muestras descongeladas.

Hasta el momento se desconocen los mecanismos específicos por lo que la criopreservación disminuye la calidad espermática, sin embargo en términos generales los espermatozoides son sometidos a diferentes condiciones físicas y químicas durante el proceso de congelación y descongelación, y es por estas variaciones que valores como motilidad y viabilidad disminuyen. Sin embargo este estudio demuestra que a pesar de ello dentro del grupo de espermatozoides viables, el porcentaje de integridad acrosomal se mantiene.

### CONCLUSIONES

- El porcentaje de integridad acrosomal de los espermatozoides viables en muestras espermáticas obtenidas de la cola del epidídimo se mantiene luego del proceso de criopreservación.
- La integridad acrosomal mantiene una correlación débil y no significativa con la motilidad ( $r = 0.1528$ ;  $p = 0.1458$ ).

### LITERATURA CITADA

1. **Allauca P, Ugarelli A, Santiani A. 2019.** Determinación del potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas. *Rev Inv Vet Perú* 30: 288-298. doi: 10.15381/rivep.v30i1.15677
2. **Ccalta R, Ordoñez C, Ampuero E, Cuzcho H. 2017.** Efecto de la criopreservación en la morfometría del espermatozoide de alpaca. *Spermova* 7: 100-105. doi: 10.18548/asppe/0005.17
3. **Cheuquemán C, Merino O, Giojalas L, Von Baer A, Sánchez R, Risopatrón J. 2013.** Assessment of sperm function parameters and DNA fragmentation in ejaculated alpaca sperm (*Lama pacos*) by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* 48: 447-453. doi: 10.1111/rda.12096
4. **Graham JK, Kunze E, Hammerstedt RH. 1990.** Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol Reprod* 43: 55-64. doi: 10.1095/biolreprod43.1.55
5. **Hallap T, Nagy S, Jaakma U, Johannisson A, Rodríguez-Martínez H. 2005.** Mitochondrial activity of frozen-thawed spermatozoa assessed by Mitotracker Deep Red 633. *Theriogenology* 63: 2311-2322. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.10.010
6. **Hernández PJE, Fernández R, Rodríguez S, Juárez R, Soto M, García R. 2012.** Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. *Rev Salud Anim* 34: 78-83.
7. **Hernández PJE, Fernández RF, Rodríguez SJ, Soto MY, Verona JE, García RA. 2012.** Post-thaw acrosomal viability and reaction in sperm obtained from equine epididymis tail. *Rev Salud Anim* 34: 84-88.
8. **Ickowicz D, Finkelstein M, Breitbart H. 2012.** Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl* 14: 816-821. doi: 10.1038/aja.2012.81
9. **Januskauskas A, Johannisson L, Soderquist, Rodríguez-Martínez H. 2000.** Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53: 859-875. doi:10.1016/s0093-691x-(00)00235-1
10. **Juárez J, Santiani A. 2019.** 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* 30: 1175-1183. doi: 10.15381/rivep.v30i3.-16608.

11. **Morton KM, Bathgate R, Evans G, Maxwell WMC. 2007.** Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate based, Tris-based and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev* 19: 792-796. doi: 10.1071/RD07049
12. **Peña A, Linde-Forsberg C. 2000.** Effect of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718. doi: 10.1016/s0093-691x(00)00384-8
13. **Santiani A, Evangelista S, Valdivia M, Risopatrón J, Sanchez R. 2013.** Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to semen extender for cryopreservation. *Theriogenology* 79: 842-846. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.12.012
14. **Santiani A, Huanca W, Sapana R, Huanca T, Sepúlveda N, Sánchez R. 2005.** Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*Lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. *Asian J Androl* 7: 303-309. doi: 10.1111/j.1745-7262.2005.00021.x
15. **Santiani A, Ugarelli A, Evangelista S. 2016.** Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Anim Reprod Sci* 173: 49-55. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.010
16. **Ugarelli A, Evangelista S, Santiani A. 2017.** Evaluación de la integridad acrosomal en espermatozoides epididimarios de alpaca mediante citometría de flujo. *Rev Inv Vet Perú* 28: 130-140.
17. **Valdivia M, Ruiz M, Bermúdez L, Quinteros S, Gonzales A, Manosalva I, Ponce C, Olazábal J, Dávalos R. 1999.** Criopreservación de semen de alpacas. En: II Congreso Mundial Sobre Camélidos, Cusco.