

Evaluación de dimetilacetamida y dimetilformamida como agentes crioprotectores para espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*)

Evaluation of dimethylacetamide and dimethylformamide as cryoprotectants for epididymal alpaca sperm (*Vicugna pacos*)

Winnie Contreras¹, Luis Ruiz García¹, Alexei Santiani^{1,2}

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de dos tipos (dimetilacetamida [DMA] y dimetilformamida [DMF]) y tres concentraciones (1, 3.5, 7%) de agentes crioprotectores sobre parámetros espermáticos durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. Se empleó un diseño factorial 2 x 3 formado por los dos crioprotectores y las tres concentraciones. Se evaluaron los parámetros de viabilidad espermática (SYBR-14/PI) y potencial de membrana mitocondrial (MitoTracker Deep Red FM) mediante citometría de flujo y motilidad pos-descongelación por microscopía de muestras de material espermático de 40 epidídimos. Se encontró un mayor porcentaje de motilidad pos-descongelamiento con DMA (14%) que con DMF (10%) ($p=0.001$). Además, hubo efecto significativo de la concentración del crioprotector en todos los parámetros evaluados ($p<0.001$), siendo mejor en las concentraciones de 1 y 3.5% que con 7%. No se halló efecto significativo de la interacción crioprotector-concentración.

Palabras clave: *Vicugna pacos*, criopreservación, espermatozoides, epidídimo, dimetilacetamida, dimetilformamida, citometría

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of the type (dimethylacetamide [DMA] and dimethylformamide [DMF]) and concentrations (1, 3.5, 7%) of cryoprotective agents on three sperm parameters during the cryopreservation process of epididymal alpaca sperm. A 2x3 factorial design consisting of the two cryoprotectants and the three

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

² E-mail: asantiania@unmsm.edu.pe

Recibido: 2 de abril de 2019

Aceptado para publicación: 14 de enero de 2020

Publicado: 31 de marzo de 2020

concentrations was used. The parameters of sperm viability (SYBR-14/PI) and mitochondrial membrane potential (MitoTracker Deep Red FM) of sperm of 40 epididymis were evaluated by flow cytometry and motility by microscopy after thawing. A higher percentage of motility after thawing was found with AMD (14%) than with DMF (10%) ($p=0.001$). In addition, there was a significant effect of the cryoprotectant concentration in all the parameters evaluated ($p<0.001$), being better at concentrations of 1 and 3.5% than with 7%. No significant effect of the cryoprotectant-concentration interaction was found.

Key words: *Vicugna pacos*, cryopreservation, spermatozoa, epididymis, dimethylacetamide, dimethylformamide, cytometry

INTRODUCCIÓN

La crianza de camélidos sudamericanos (CSA) constituye una actividad productiva y económica de gran valor para la población altoandina en Perú. Su crianza representa el 70-80% del ingreso familiar anual (Portal Agrario, 2017). El uso de biotecnologías reproductivas en estas especies, como la inseminación artificial (IA) con semen congelado, ha obtenido resultados desalentadores que aún no justifican su aplicación masiva. La dificultad en la colecta de semen de buena calidad, así como la alta viscosidad y baja concentración y motilidad seminal condiciona su evaluación y limita su manipulación para trabajos de criopreservación.

Los estudios sobre criopreservación de espermatozoides de alpaca muestran resultados variables y, en general, deficientes para su aplicación en campo obteniéndose entre 5 y 36% de motilidad pos-descongelación, entre 17 y 61% de integridad de la membrana plasmática y entre 21 y 93% de viabilidad e integridad acrosomal (Morton *et al.*, 2007, 2010; Canorio, 2008; Rodríguez, 2009; Banda *et al.*, 2010; Mancisidor, 2013; Terreros *et al.*, 2015; Choez *et al.*, 2017). Por consiguiente, se reportan bajos porcentajes de fertilidad (16%) utilizando la técnica de inseminación artificial (Pacheco *et al.*, 2009).

La baja tasa de supervivencia de espermatozoides criopreservados de CSA podría estar relacionada a los agentes crioprotectores (ACPs). El glicerol, como ACP, ha venido usándose de manera masiva en diversos protocolos de criopreservación de semen de varias especies. Sin embargo, puede causar toxicidad y ser contraceptivo debido a su lenta permeabilidad en la membrana celular, por lo que es eliminado del semen en algunas especies antes de la IA (Holt, 2000; Watson, 2000). En alpacas se ha empleado glicerol al 2% (0.27 M) y 8% (1.16 M) (Santiani *et al.*, 2005; Morton *et al.*, 2007, 2010; Banda *et al.*, 2010; Terreros *et al.*, 2015; Choez *et al.*, 2017) obteniéndose porcentajes bajos de motilidad pos-descongelación (entre 4 y 31%), los cuales son insuficientes para lograr tasas de preñez aceptables luego de la IA. En ese sentido, el empleo de crioprotectores alternativos como las amidas surge como tentativa por su menor peso molecular y, por lo tanto, causar menor daño osmótico en comparación con el glicerol.

En los últimos cinco años se ha venido empleando dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en estudios de criopreservación de semen de alpaca. Se ha obtenido entre 9 y 34% de motilidad pos-descongelación utilizando DMA al 3.5% (Mancisidor, 2013; Banda *et al.*, 2010; Canorio, 2008), mientras que con DMF al 4 y

7% solo se ha logrado obtener 8 y 10% de motilidad luego del descongelamiento, respectivamente (Flores *et al.*, 2015). Por otro lado, Carretero *et al.* (2014) obtuvo 23% de motilidad pos-descongelamiento en llamas empleando DMF al 7%. Debido a esta gran variabilidad, se requiere evaluar y comparar crioprotectores del grupo amida, DMA y DMF, a concentraciones distintas y bajo los mismos parámetros. Por ello, el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de dos tipos (dimetilacetamida y dimetilformamida) y tres concentraciones (1, 3.5 y 7%) de agentes crioprotectores sobre parámetros espermáticos durante el proceso de criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y Muestra de Estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Lima, Perú). Se emplearon 40 epidídimos de alpaca provenientes del camal municipal de Huancavelica.

Se utilizaron aquellos testículos con un peso mayor o igual a 10 g, longitud testicular mayor o igual a 3 cm, concentración espermática mayor o igual a 50×10^6 espermatozoides/ml y motilidad mayor o igual a 30%.

Espermatozoides Epididimarios

Inmediatamente después del sacrificio se colectaron ambos testículos y se colocaron en bolsas herméticas con NaCl 0.9% dentro de cajas de transporte a 5 °C para su traslado a Lima en las 20 horas siguientes. En el laboratorio se realizó la divulsión del testículo identificando y separando la cola del epidídimo. Se lavaron con PBS temperado (38 °C) y se colocaron en una placa Petri. Se les adicionó 1.5 ml de un dilutor a base de

leche descremada, yema de huevo y fructosa, 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 espermatozoides.

Se utilizaron 10 µl de la suspensión para la evaluación de la motilidad y otros 10 µl para evaluar la concentración espermática. Asimismo, a la muestra se le añadió 1 ml del dilutor, consiguiendo un total de 2.5 ml que fueron distribuidos en seis alícuotas de 300 µl cada una.

Diseño Experimental

Se empleó un diseño factorial de 2x3 (dos crioprotectores: DMA y DMF x tres concentraciones: 1, 3.5 y 7%) y 40 repeticiones por tratamiento mediante el uso de 40 epidídimos. Una alícuota de 300 µl se utilizó en cada tratamiento y para alcanzar una concentración final de 1, 3.5 y 7% se adicionó 3, 10.5 y 21 µl de DMA y DMF a cada Eppendorf, respectivamente.

Criopreservación y Descongelamiento

Se colocaron las pajillas en un sistema automático de congelamiento (Cryobath, Cryologic, Australia) y utilizó el programa #7. Este programa inicia con una temperatura de 18 °C, desciende hasta 5 °C en un lapso de 90 min y hace una meseta a 5 °C por 30 min, y a partir de allí la temperatura desciende hasta la congelación. Las pajillas congeladas fueron guardadas en el tanque de nitrógeno líquido a -196 °C. La descongelación se realizó sumergiendo las pajillas en baño maría a 38 °C por 1 min (Morton *et al.*, 2007).

Evaluación de Espermatozoides

La motilidad de todas las muestras fue evaluada mediante microscopía (400x).

Para evaluar la viabilidad espermática se empleó el kit Sperm Viability (D3861-Molecular Probes, Eugene, USA) que consta de dos componentes: Componente A

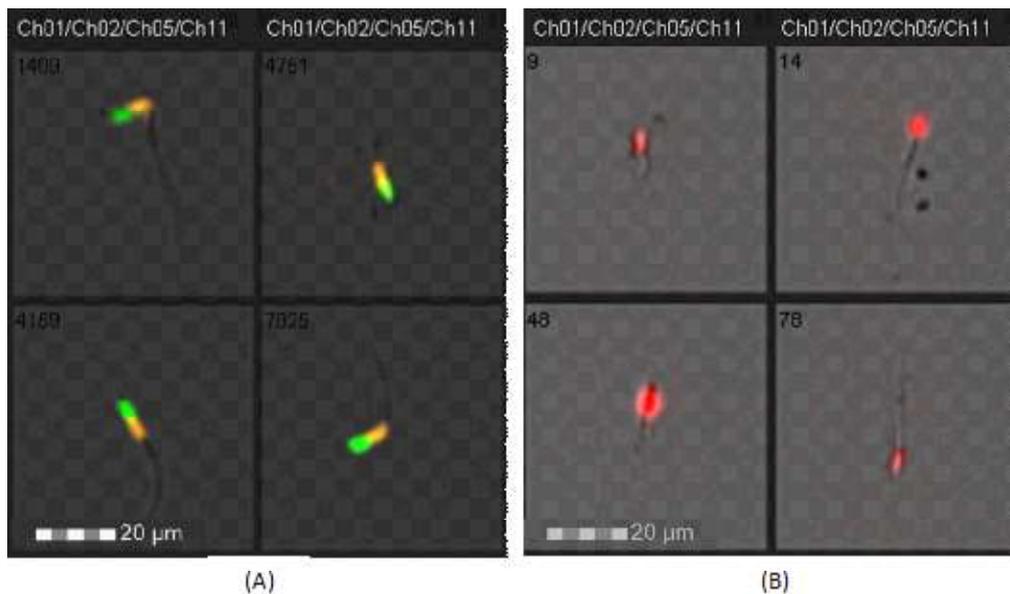


Figura 1. Patrones de espermatozoides epididimarios de alpaca con SYBR-14/PI/Mitotracker Deep Red FM evaluados por citometría de flujo en los canales 2, 5 y 11; respectivamente. (A) Espermatozoides viables con alto potencial de membrana mitocondrial (PMM); (B) Espermatozoides muertos con bajo PMM

(SYBR-14) y Componente B (PI). Asimismo, el potencial de membrana mitocondrial fue evaluado por Mitotracker Deep Red FM (M22426- Molecular Probes, Eugene, USA). Para esta evaluación, las muestras primeramente fueron lavadas dos veces con 1 ml de PBS mediante centrifugación a 600 g por 8 min. El resultante fue resuspendido con 100 μ l de PBS. Luego se agregaron los componentes en el siguiente orden: 0.5 μ l de Solución Stock de SYBR-14 (20 μ M), 0.5 μ l de Mitotracker Deep Red FM (1 mM) y 0.5 μ l de solución Stock de PI (2.4 mM). Las muestras fueron incubadas durante 10 min en oscuridad a 38 °C.

Citometría de Flujo

Se utilizó un citómetro de flujo con analizador de imágenes FlowSight (Amnis, Seattle, USA) adquiriendo 10 000 eventos compatibles con espermatozoides mediante el programa INSPIRE v. 100.3.218.0 (Amnis, Seattle, USA). Para la identificación de espermatozoides se utilizaron gráficos Dotplot

de campo claro versus relación de aspecto, así como la galería de imágenes para su verificación.

El láser de excitación de 488 nm fue utilizado para SYBR-14 y PI, mientras que MitoTracker Deep Red FM fue excitado por el láser de longitud de 642 nm. La fluorescencia emitida fue detectada por el canal 2 (Ch02: 505-560 nm) para SYBR-14, Canal 5 (Ch05: 642-740 nm) para PI y Canal 11 (Ch11: 642-740 nm) para MitoTracker Deep Red FM.

Se utilizó el software de análisis de datos IDEAS v. 6.2 (Amnis, Seattle, USA) el cual permitió utilizar diagramas de dispersión para SYBR-14 y PI, e histogramas para MitoTracker Deep Red FM. Se consideraron espermatozoides vivos con membrana plasmática intacta a los que presentaron fluorescencia verde marcado por el SYBR-14 (Figura 1A) y espermatozoides no viables (muertos) con membrana plasmática dañada a los que mostraron fluorescencia roja marcado por el PI (Figura 1B). Asimismo, se

Cuadro 1. Efecto de los crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en tres concentraciones (1, 3.5 y 7%) sobre la motilidad (%) pos-descongelación en espermatozoides epididimarios de alpacas¹

Concentración (%)	DMA	DMF	Promedio
1	17.45 ± 5.60 ^{ya}	10.19 ± 4.10 ^{za}	13.82 ± 3.55 ^a
3.5	16.00 ± 5.50 ^a	14.17 ± 6.46 ^a	15.08 ± 4.22 ^a
7	8.60 ± 5.79 ^{yb}	4.58 ± 4.61 ^{zb}	6.59 ± 3.70 ^b
Promedio	14.02 ± 3.31 ^y	9.64 ± 3.05 ^z	

¹ Los datos son presentados como promedios ± intervalo de confianza

^{a,b} Letras diferentes dentro de una columna indican diferencia significativa (p<0.05)

^{y,z} Letras diferentes dentro de una fila indican diferencia significativa (p<0.05)

Cuadro 2. Efecto de los crioprotectores dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en tres concentraciones (1, 3.5 y 7%) sobre la viabilidad espermática (%) en espermatozoides epididimarios de alpacas¹

Concentración (%)	DMA	DMF	Promedio
1	18.65 ± 3.41 ^a	18.55 ± 3.31 ^a	18.60 ± 2.36 ^a
3.5	15.49 ± 3.29 ^b	17.29 ± 3.48 ^{ab}	16.39 ± 2.39 ^b
7	13.54 ± 3.36 ^b	14.23 ± 3.76 ^b	13.88 ± 2.50 ^c
Promedio	15.86 ± 1.96	16.70 ± 2.04	

¹ Los datos son presentados como promedios ± intervalo de confianza

^{a,b,c} Letras diferentes dentro de una columna indican diferencia significativa (p<0.05)

consideraron espermatozoides vivos con alto potencial de membrana mitocondrial (PMM) a los que mostraron fluorescencia roja en la pieza media.

Análisis Estadístico

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre los porcentajes de motilidad, viabilidad espermática y actividad mitocondrial, se utilizó un análisis de varianza para el diseño factorial 2x3 (dos crioprotectores x tres concentraciones), considerando como factores

independientes el crioprotector, la concentración y la interacción crioprotector-concentración. Además, se utilizó la prueba de Tukey para determinar diferencias estadísticas entre medias de los tratamientos. Se empleó el paquete estadístico SPSS Statistics 22.0.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de motilidad pos-descongelamiento se encuentran en el Cuadro 1. El crioprotector DMA tuvo un

Cuadro 3. Efecto de dimetilacetamida (DMA) y dimetilformamida (DMF) en tres concentraciones (1, 3.5 y 7%) sobre el potencial de membrana mitocondrial (%) en espermatozoides epididimarios de alpacas¹

Concentración (%)	DMA	DMF	Promedio
1	19.36 ± 3.46 ^a	19.04 ± 3.27 ^a	19.20 ± 2.36 ^a
3.5	16.55 ± 3.29 ^{ab}	17.94 ± 3.62 ^{ab}	17.24 ± 2.43 ^a
7	13.04 ± 3.11 ^b	14.81 ± 3.60 ^b	13.91 ± 2.37 ^b
Promedio	16.28 ± 1.94	17.27 ± 2.03	

¹ Los datos son presentados como promedios ± intervalo de confianza

^{a,b} Letras diferentes dentro de una columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

mejor efecto que el DMF (14% vs 10%). Los mejores porcentajes de motilidad pos-descongelamiento (14 y 15%) se obtuvieron a concentraciones de 1 y 3.5%, respectivamente, mientras que solo se obtuvo 7% de motilidad con la concentración de 7%. Por otro lado, no hubo efecto significativo por efecto de la interacción crioprotector-concentración ($p=0.619$).

Los resultados de viabilidad e integridad de la membrana plasmática pos-descongelación se encuentran en el Cuadro 2. El mayor porcentaje de viabilidad espermática (19%) se obtuvo con la concentración de 1%, siendo de 16 y 14% con las concentraciones de 3.5 y 7%, respectivamente. Por otro lado, no se encontró diferencia significativa entre crioprotectores ($p=0.323$) ni en la interacción crioprotector-concentración ($p=0.347$).

Los resultados obtenidos del PMM pos-descongelación se presentan en el Cuadro 3. Las concentraciones de 1 y 3.5% de los crioprotectores presentaron los mejores resultados (19 y 17%, respectivamente) en comparación al 7% (14%). Por otro lado, no hubo efecto significativo por efecto del crioprotector utilizado ($p=0.247$) ni por efecto de la interacción crioprotector-concentración ($p=0.355$).

DISCUSIÓN

Este es el primer reporte que compara el efecto de dos amidas (DMA y DMF) en distintas concentraciones (1, 3.5 y 7%) en el proceso de criopreservación de espermatozoides de alpaca. Son escasos los estudios que emplean crioprotectores alternativos comparando concentraciones para esta especie, siendo más reciente el reporte de Canorio *et al.* (2015), quienes compararon DMA al 1.7, 3.5 y 7%, y el estudio de Flores *et al.* (2015) utilizando DMF al 4 y 7%. Sin embargo, en otras especies, principalmente aves, se dispone de más reportes empleando alguna de estas amidas, tales como el descrito por Rakha *et al.* (2017), quienes compararon DMA al 4, 6, 8 y 10% en la criopreservación de semen de gallo (*Gallus gallus murghi*), obteniendo buenos resultados al 6%.

En el presente estudio, DMA presentó un mejor efecto que DMF en términos de motilidad pos-descongelación; resultados que coinciden con Santiani *et al.* (2016), quienes demostraron que DMA mostró mejores resultados de motilidad pos-descongelamiento sobre otros agentes crioprotectores durante el proceso de criopreservación de espermatozoides del Caballo Peruano de Paso. De

manera similar, Seifi-Jamadi *et al.* (2017) resaltaron la eficacia de la DMA sobre el glicerol en la supervivencia de espermatozoides de caprinos. Esto basado en que DMA posee una capacidad de penetración a través del reordenamiento de lípidos y proteínas, así como el aumento de la fluidez de la membrana plasmática, que permiten una disminución en la formación de hielo dentro de la célula, previniendo su daño (Holt, 2000).

Concentraciones elevadas de DMA o DMF podrían resultar siendo tóxicas para el espermatozoide (Blanco *et al.*, 2000), de allí que se requiere evaluar varias concentraciones bajo los mismos parámetros. Se determinó que las concentraciones de 1 y 3.5% permiten obtener mejores rangos de motilidad, viabilidad espermática y potencial de membrana mitocondrial que la concentración de 7% en la criopreservación de espermatozoides de alpaca, independientemente del tipo de crioprotector. Es decir, altas concentraciones no son toleradas en esta especie, como sucede en cerdos y ratones con concentraciones superiores al 3 y 1.75%, respectivamente. Estos resultados podrían explicar el uso de DMA al 3.5% en casi todos los reportes que se han realizado en alpacas con esta amida. Otros autores (Canorio, 2008; Rodríguez, 2009; Banda, 2010; Mancisidor, 2013) obtuvieron resultados similares (9-33%) al presente estudio respecto a motilidad pos-descongelación.

En otros estudios, no obstante, los mejores porcentajes de motilidad, viabilidad e integridad de la membrana plasmática se obtuvieron con concentraciones de 3.5 y 7% de DMA en comparación con 1.7% en la congelación de espermatozoides de alpaca (Canorio *et al.*, 2015). Por su lado, Flores *et al.* (2015) empleando DMF al 4 y 7% no hallaron diferencia significativa entre ambas concentraciones respecto a la motilidad pos-descongelamiento. Las diferencias encontradas con estos estudios podrían explicarse por las pruebas utilizadas para evaluar espermatozoides, tales como la citometría de flujo o el sistema de análisis ISAS utilizado

por Flores *et al.* (2015), que poseen mayor sensibilidad y especificidad que el método convencional empleado por Canorio *et al.* (2015) (colorante eosina para determinar la viabilidad y la prueba hipoosmótica para determinar la integridad de la membrana plasmática). Además, se debe considerar los diluyentes empleados, así como la intensidad de los cambios inducidos por la criopreservación, lo cual es altamente específico de la especie (Massip *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2011; Roushdy *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES

- La dimetilacetamida (DMA) fue más efectiva en conservar la motilidad pos-descongelación que la dimetilformamida (DMF).
- Las concentraciones de 1 y 3.5% del crioprotector conservaron mejor la motilidad, viabilidad y potencial de membrana mitocondrial que la concentración de 7%, independientemente del tipo de crioprotector.

LITERATURA CITADA

1. **Banda J, Evangelista S, Ruiz L, Sandoval R, Rodríguez C, Valdivia M, 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.
2. **Blanco JM, Gee G, Wildt DE, Donoghue AM. 2000.** Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biol Reprod* 63: 1164-1171. doi: 10.1095/biolreprod63.4.1164
3. **Blanco JM, Long JA, Gee G, Wildt DE, Donoghue AM. 2011.** Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and

- crane sperm cryosurvival. *Anim Reprod Sci* 123: 242-248. doi: 10.1016/j.anireprosci.2010.12.005
4. **Canorio N. 2008.** Criocapacitación del espermatozoide de alpaca (*Lama pacos*). Tesis de Magister. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 102 p.
 5. **Canorio N, Paredes F, Valdivia M. 2015.** Agentes crioprotectores alternativos para el congelamiento lento de espermatozoides epididimarios de alpaca (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 26: 434-443. doi: 10.15381/rivep.v26i3.-11185
 6. **Carretero MI, Santa Cruz R, Neild D, Arraztoa C, Fumuso F, Giuliano S. 2014.** Uso de la dimetilformamida en la criopreservación de semen en llama (*Lama glama*). *Spermova* 3: 174-176.
 7. **Choez K, Ruiz L, Sandoval R, Evangelista S, Santiani A. 2017.** Determinación de la concentración óptima de tres crioprotectores para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 28: 619-628. doi: 10.15381/rivep.v28i3.13367
 8. **Flores NH, Cucho H, Carretero MI, Ciprián R, Quispe H, Calderón N, Miragaya M, et al. 2015.** Efecto del crioprotector dimetilformamida sobre la movilidad de espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS. *Spermova* 5: 47-50.
 9. **Holt WV. 2000.** Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62: 3-22. doi: 10.1016/s0378-4320(00)00152-4
 10. **Mancisidor SI. 2013.** Efecto del α -tocoferol durante el proceso de criopreservación en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Biólogo. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 75 p.
 11. **Massip A, Leibo S, Blesbois E. 2004.** Criobiología and the breeding of domestic animals. In: *Life in the frozen state*. Benson E, Fuller B, Lane N (eds). London: Francis Group. p 371-393.
 12. **Morton K, Bathgate R, Evans G, Maxwell W. 2007.** Cryopreservation of epididymal alpaca sperm: a comparison of citrate- Tris- and lactose- based diluents and pellets and straws. *Reprod Fert Develop* 19: 792-796. doi: 10.1071/rd07049
 13. **Morton K, Evans G, Maxwell W. 2010.** Effect of glycerol concentration, Equex STM® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca sperm. *Theriogenology* 74: 311-316. doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.02.015
 14. **Pacheco JI, Perez GM, Calle L, García W. 2009.** Efecto del lugar y la hora de inseminación artificial sobre la fertilidad en alpacas. *REDVET* 20(8). [Internet]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n080809/080905.pdf>
 15. **Portal Agrario. 2017.** Lima: Ministerio de Agricultura. [Internet]. Disponible en: <http://minagri.gob.pe/portal/objetivos/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/298-camelidos-sudamericanos?start=2>
 16. **Rakha B, Ansari M, Akhter S, Zafar Z, Naseer A, Hussain I, Santiago-Moreno J, et al. 2017.** Dimethylacetamide improves the cryosurvivability of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) sperm. *Theriogenology* 78: 27-33. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.07.018
 17. **Rodríguez C. 2009.** Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis de Magister. Lima: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 72 p.
 18. **Roushdy K, El-Sherbieny M, El-Gany F, El-Sayed M. 2014.** Semen cryopreservation for two local chicken strains as a tool for conservation of Egyptian local genetic resources. *J Egyptian Poult Sci* 34: 607-618.

19. **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
20. **Santiani A, Evangelista-Vargas S, Vargas S, Gallo s, Ruiz L, Orozco V, Rosemberg M. 2016.** Cryopreservation of Peruvian Paso horse spermatozoa: dimethylacetamide preserved an optimal sperm function compared to dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and glycerol. *J Androl* 49: 6-9. doi: 10.1111/and.12672
21. **Seifi-Jamadi A, Ahmad E, Ansari M, Kohram H. 2017.** Effect of addition of quercetin in an extender containing DMA or glycerol on freezability of Mahabadi goat semen. *Cryobiology* 75: 15-20. doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.03.002
22. **Terreros M, Huanca W, Arriaga I, Ampuero A. 2015.** Efecto de tres crioprotectores en la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 26: 420-426. doi: 10.15381/rivep.v26i3.11182
23. **Watson P. 2000.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 60: 481-92. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00099-3