

Efecto de la papaína en la cinética de los espermatozoides de llama (*Lama glama*)

Effect of papain on the kinetics of llama sperm (*Lama glama*)

Hernán Cucho^{1,3}, Rufina Ccoiso¹, Mitzi Gallegos¹, Ruth Ccalta¹, Aydee Meza¹, Enrique Ampuero¹, César Ordóñez¹, Carles Soler²

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar el efecto del tratamiento con papaína en la cinética de los espermatozoides de llama. Se seleccionaron 4 llamas machos Ch'aku de 5-8 años de edad. El semen fue colectado mediante vagina artificial y maniquí. Se hicieron cuatro colectas de semen por animal con intervalos de una semana. Las muestras de semen fueron separadas en dos alícuotas. Una para su análisis en fresco y la otra para ser tratada con papaína (20 minutos). Se evaluó el volumen, filancia, concentración de espermatozoides, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de funcionalidad de la membrana espermática, y porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal. La movilidad de los espermatozoides y su cinética se evaluó utilizando un sistema CASA-Mot (ISAS®), determinándose la movilidad total (MT) y la movilidad progresiva (MP), así como los parámetros de cinética espermática: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad promedio (VAP), y los índices de rectitud (STR), linealidad (LIN) y oscilación (WOB), la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la frecuencia de batido de la cola (BCF). El efecto de la papaína se analizó con un modelo factorial en bloques al azar. La MT no presentó diferencias significativas entre semen fresco y degelificado con papaína, pero la MP fue superior con papaína ($p < 0.05$). Se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) a favor del semen degelificado con papaína con relación al semen fresco para la VCL, VSL, VAP, LIN, STR y BCF, lo que sugiere que el tratamiento con papaína mejora la movilidad progresiva, así como la mayoría de los parámetros de cinética del espermatozoide de llama.

Palabras clave: llama, CASA-Mot, papaína, cinética espermática, movilidad espermática

¹ Escuela Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú

² Departamento de Biología Funcional y Antropología Física, Universidad de Valencia, España

³ E-mail: hernan.cucho@unsaac.edu.pe

Estudio financiado por la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco a través del Proyecto de Investigación "Fisiología del espermatozoide de llama y su aplicación en la inseminación artificial con semen criopreservado"

Recibido: 7 de febrero de 2020

Aceptado para publicación: 24 de agosto de 2020

Publicado: 25 de noviembre de 2020

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the effect of papain treatment on the kinetics of llama sperm. Four 5-8-year-old Ch'aku male llamas were selected and semen was collected using an artificial vagina and a dummy. Four semen collections were made per animal with intervals of one week. The semen samples were separated into two aliquots. One for fresh analysis and the other to be treated with papain (20 minutes). The volume, filancia, concentration of sperm, percentage of live sperm, percentage of functionality of the sperm membrane, and percentage of sperm with acrosomal reaction were evaluated. Sperm mobility and its kinetics were evaluated using a CASA-Mot system (ISAS®), determining the total motility (MT) and progressive motility (MP), as well as the sperm kinetic parameters: curvilinear velocity (VCL), straight-line velocity (VSL), average path velocity (VAP), and the indices of straightness (STR), linearity (LIN) and wobble (WOB), the amplitude of lateral head movement (ALH) and beat cross frequency (BCF). The effect of papain was analysed with a random block factorial model. MT did not show significant differences between fresh and degelified semen with papain, but MP was higher with papain ($p < 0.05$). Greater values ($p < 0.05$) were found in papain-degelled semen in relation to fresh semen for VCL, VSL, VAP, LIN, STR and BCF, which suggests that treatment with papain improves progressive motility, as well as most of the kinetic parameters of llama sperm.

Key words: llama, CASA-Mot, papain, sperm kinematics, sperm motility

INTRODUCCIÓN

Bolivia y Perú concentran la mayor población de llamas a nivel mundial, parte del cual ofrece seguridad alimentaria a las poblaciones altoandinas de ambos países. Sin embargo, una de las limitantes de su crianza son los bajos índices de fertilidad (Díaz *et al.*, 2011). Entre los factores que afectan a la reproducción en los camélidos sudamericanos se encuentra la baja calidad del semen, especialmente la reducida concentración de espermatozoides (Giuliano *et al.*, 2008). En este sentido, la introducción de la tecnología CASA (Computer Assisted Semen Analysis) en el estudio de la evaluación seminal de camélidos viene permitiendo una valoración más precisa de la calidad seminal (Soler *et al.*, 2014a,b; Cucho *et al.*, 2019).

Un factor relativo a la baja movilidad espermática se refiere a la presencia de una elevada viscosidad (Casaretto *et al.*, 2012),

consecuencia de la presencia de glicosaminoglicanos y mucina 5B (Kershaw-Young y Maxwell, 2012). Esta viscosidad dificulta la separación de los espermatozoides del plasma seminal, la dilución del eyaculado, la homogenización de las muestras, la separación en alícuotas y el envasado en pajuelas (Tibary y Vaughan, 2006). Para solventar estos problemas se suele acudir al empleo de enzimas como la papaína, presente en la papaya (*Carica papaya*), la cual mostró resultados promisorios en semen de alpaca (Morton *et al.*, 2008). Posteriormente Kershaw-Young *et al.* (2013) reportaron que la papaína reducía la viscosidad del semen, sin afectar el porcentaje de espermatozoides vivos, la integridad del ADN y del acrosoma de los espermatozoides de alpaca.

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la incubación en papaína sobre la cinética de los espermatozoides de llama utilizando los parámetros de evaluación espermática del sistema CASA-Mot (ISAS®).

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar del Estudio y Animales

El estudio fue realizado en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos CICAS - La Raya, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco. El Centro se encuentra ubicado en el distrito de Maranganí, provincia de Canchis, departamento del Cusco, Perú, a una altitud de 4130 msnm. El área pertenece a la zona de vida de páramo húmedo-subalpino subtropical (Holdridge, 1967).

El estudio se efectuó entre febrero y junio de 2018. Se seleccionaron cuatro llamas Ch'aku, de 5-8 años de edad, peso 118.13 ± 10.62 kg, sin problemas reproductivos y pertenecientes al plantel de reproductores del CICAS La Raya. El tamaño del testículo izquierdo fue de $4.37 \pm 0.33 \times 3.50 \pm 0.16$ cm, y el derecho fue de $4.78 \pm 0.71 \times 3.80 \pm 0.64$ cm. Los animales eran alimentados en pradera natural, compuesto de cuatro especies predominantes: *Stipa obtusa*, *Festuca* sp, *Calamagrostis amoena* y *Scirpus rigidus*.

Colección de Semen

La colección de semen fue realizada por el método de vagina artificial y maniquí. Las llamas fueron entrenadas durante dos semanas para que aceptaran al maniquí, al cual se le rociaba con secreciones vaginales en la zona de la grupa. Se empleó una vagina artificial de ovinos (Minitube®, Alemania), que se cubrió con una frazadilla eléctrica para mantener la temperatura a 37 °C, según técnica descrita por Bravo *et al.* (1997). El intervalo entre las colectas de semen fue de una semana, hasta obtener cuatro colectas adecuadas por animal. El semen fue colectado en tubos Falcon graduados de 15 ml.

Tratamiento del Semen

El semen colectado fue separado en dos alícuotas. Una se empleó para el análisis en fresco y a la otra se le añadió papaína (Sigma

Aldrich®) disuelta en Tris (0.1 mg/ml de Tris) en una proporción de 1:1, manteniéndose durante 20 minutos a 37°C en un baño seco. A continuación, se agregó 20 µl del inhibidor de papaína (E-64, Sigma Aldrich®) por mililitro de dilución de semen con papaína durante 5 min y conservando la misma temperatura (Crichton *et al.*, 2015).

Análisis del Semen

Se evaluó el volumen (ml) y la filancia (cm) definida como la capacidad de formar filamentos (Giuliano, 2012). La concentración de espermatozoides (millones de espermatozoides por mililitro) se determinó con un Spertrack® (Proiser R+D, España), empleando 3 µl de semen.

El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó empleando 5 µl tanto de semen. eosina y nigrosina (Minitube®, Alemania). La funcionalidad de la membrana espermática (HOS) se realizó usando una solución de 50 mOsm/kg, donde los espermatozoides con las colas hinchadas y dobladas indicaron una reacción positiva al HOS (Quispe *et al.*, 2015). El porcentaje de espermatozoides con acrosoma reaccionado se evaluó con azul de Coomassie (Sigma-Aldrich®), según lo descrito por Fumuso *et al.*, 2014) donde los espermatozoides con el acrosoma intacto mostraban una coloración azul. Todos los análisis se realizaron en un microscopio de contraste de fases (Proiser-UOP-UB200i) 400x y con no menos de 200 espermatozoides por muestra.

Análisis de la Cinética de los Espermatozoides

La movilidad de los espermatozoides se evaluó utilizando un sistema CASA-Mot (ISAS®v1, Proiser), que incluía un microscopio de contraste de fase (Proiser-UOP-UB200i) con un objetivo de contraste de fase negativo de 10x y una videocámara (Ximea MQ003MG-CM, Alemania). Se determinaron las siguientes variables:

- Movilidad total (MT; %). Porcentaje de células móviles dentro de la muestra.
- Movilidad progresiva (MP; %). Espermatozoides con un valor del STR superior al 75%.
- Velocidad curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$). Velocidad de la cabeza del espermatozoide a lo largo de la trayectoria curvilínea.
- Velocidad rectilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$). Velocidad a lo largo de la trayectoria entre el punto inicial y final de la trayectoria del espermatozoide.
- Velocidad promedio (VAP; $\mu\text{m/s}$). Velocidad de la cabeza de un espermatozoide a lo largo de su trayectoria media (Amann y Waberski, 2014; Valverde y Madrigal-Valverde, 2018).
- Índices de rectitud (STR = VSL/VAP; %), linealidad (LIN = VSL/VCL; %) y oscilación (WOB = VAP/VCL; %). Caracterizan la calidad del movimiento espermático (Mortimer, 2000; Meza *et al.*, 2018).
- Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μm). Desviación de la trayectoria curvilínea respecto de la media
- Frecuencia de batido de la cola (BCF, Hz). Número de las intersecciones de la trayectoria curvilínea y la trayectoria promedio (Amann y Waberski, 2014).

Las áreas de las partículas capturadas estuvieron comprendidas entre 5 y 60 μm^2 , y se analizó según una conectividad de 10.

Diseño Estadístico

Se usó estadística descriptiva para el volumen, filancia, concentración, espermatozoides vivos, funcionalidad de la membrana espermática y reacción acrosomal. Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre el volumen y filancia.

La normalidad de la distribución de los datos de cinética espermática (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH y BCF) y las movilidades (MT y MP) se analizaron con el test de

Shapiro-Wilk. La homogeneidad de varianzas se determinó con el test de Levene. La ALH y la MP no presentaban distribución normal y fueron transformadas por su raíz cuadrada para los cálculos subsiguientes. El efecto de la papaína en la MT, MP y los parámetros de cinética espermática fueron evaluados con un arreglo factorial en bloques completamente al azar, donde la comparación de medias se realizó con la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$). Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el programa R v.3.6.0.

RESULTADOS

Semen

Las colectas tuvieron una duración promedio de 27.0 ± 6.3 minutos. El 80% de las colecciones de semen fueron aceptables. El restante 20% presentó concentraciones de espermatozoides menores a $25 \times 10^6/\text{ml}$, contaminación con orina o eyaculación parcial, lo que motivó su exclusión del estudio. En total, se analizaron 16 muestras de semen, cuatro de cada animal.

Las características seminales se muestran en el Cuadro 1. El volumen y la filancia se mostraron moderadamente correlacionados ($r=0.51$).

Cinética Espermática

La MT (%) en semen fresco y degelificado con papaína fue similar entre tratamientos, aunque con una tendencia a mejores valores en el semen degelificado (Cuadro 2). Asimismo, se pudo observar valores heterogéneos. La MP (%) fue significativamente superior en el semen tratado con papaína, tanto en el promedio general como individual (con excepción de un animal) (Cuadro 2).

La mayoría de las variables (MT, MP, VCL, VSL, VAP, LIN, STR y BCF) mostraron un incremento significativo ($p<0.05$) tras la incubación con papaína y solamente el WOB y ALH presentaron valores similares entre tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 1. Características seminales de cuatro llamas reproductores colectadas por vagina artificial (n= 16 colectas de semen)

Variable	Promedio	D.E.	C.V.
Volumen (ml)	7.99	1.95	24.5
Filancia (cm)	3.88	1.31	33.8
Concentración (10 ⁶ /ml)	146.18	64.83	44.4
Espermatozoides vivos (%)	70.23	13.57	19.3
Funcionalidad de la membrana espermática (%)	54.31	9.29	17.1
Reacción acrosomal (%)	67.36	11.01	16.3

D.E.: desviación estándar; C.V.: coeficiente de variabilidad

Cuadro 2. Movilidad total y progresiva (promedio ± DE) en semen de llama fresco y degelificado con papaína (4 muestras por macho)

Movilidad	Animal	Fresco (%)	Degelificado con papaína (%)
Total	1	57.28 ± 19.79	68.50 ± 8.52
	2	52.58 ± 10.06	51.90 ± 3.19
	3	31.85 ± 12.43	46.28 ± 10.87
	4	24.60 ± 6.68	40.85 ± 17.31
	Total	41.58 ± 18.40	51.88 ± 14.65
Progresiva ¹	1	2.40 ± 0.85 ^a	4.95 ± 1.67 ^b
	2	2.40 ± 0.97 ^a	2.43 ± 0.66 ^a
	3	0.98 ± 0.39 ^a	3.60 ± 1.09 ^b
	4	0.93 ± 0.78 ^a	2.03 ± 0.71 ^b
	Total	1.68 ± 1.02 ^a	3.25 ± 1.54 ^b

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

¹ Los espermatozoides progresivos muestran un índice de rectitud (STR) >75%

Cuadro 3. Movilidad total y progresiva, y parámetros de cinética espermática (promedio \pm DE) en semen de llama fresco y degelificado con papaína (16 muestras por tratamiento)

Variable	Fresco	Degelificado con papaína
MT (%)	41.58 \pm 18.40 ^a	51.88 \pm 14.65 ^b
MP (%)	1.68 \pm 1.02 ^a	3.25 \pm 1.54 ^b
VCL (μ m/s)	56.06 \pm 13.87 ^a	66.93 \pm 13.07 ^b
VSL (μ m/s)	14.07 \pm 2.77 ^a	19.44 \pm 4.49 ^b
VAP (μ m/s)	28.57 \pm 5.87 ^a	34.96 \pm 8.07 ^b
LIN (%)	25.52 \pm 2.69 ^a	28.95 \pm 2.94 ^b
STR (%)	49.00 \pm 3.00 ^a	56.00 \pm 3.40 ^b
WOB (%)	51.60 \pm 3.81 ^a	51.96 \pm 4.42 ^a
ALH (μ m)	3.22 \pm 0.41 ^a	3.47 \pm 0.56 ^a
BCF (Hz)	3.95 \pm 1.19 ^a	6.54 \pm 1.17 ^b

MT: movilidad total; MP: Movilidad progresiva; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea; VAP: velocidad promedio; LIN: índice de linealidad; STR: índice de rectitud; WOB: índice de oscilación; ALH: amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de batido de la cola

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

DISCUSIÓN

Semen

La colección de semen por vagina artificial requiere que los machos tengan una libido adecuada. En este estudio se tuvo una eficiencia de 80% en las colecciones de semen, lo cual estuvo dentro de los rangos reportados (Aller *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2008). El tiempo de colecta (27.0 ± 6.3 minutos) fue mayor a los reportados por Aller *et al.* (2003), de 18.5 minutos, Godoy (2014) de 20 minutos y Giuliano *et al.* (2008) de 15 a 20 minutos, bajo las condiciones de crianza de Chile y Argentina, respectivamente, por lo que las diferencias observadas podrían deberse a las diferentes condiciones ambientales, sin poderse descartar el efecto del animal, en

especial en lo referente a su libido. Asimismo, el volumen colectado (7.99 ± 1.95 ml), fue muy superior a otros reportes (Giuliano *et al.*, 2008; Quispe y Delgado, 2012; Valle, 2013; Godoy, 2014), quienes reportan valores entre 1.6 a 5.5 ml. Cabe señalar que esta variable también es muy dependiente de la libido del macho, y de la estación reproductiva (Giuliano *et al.*, 2008).

Quispe y Delgado (2012), reportaron una filancia de 5.2 cm, superior a la observada en el presente trabajo (3.88), mientras que Ccalta *et al.* (2017) y Ríos (2014), hallaron valores inferiores, de 2.38 y 3.62 cm, respectivamente, en alpacas y colectadas por el método de poscópula. Se observó una correlación positiva y moderada ($r=0.51$) entre el volumen y la filancia, lo que sugiere que un incremento del volumen también incrementaría la filancia.

La concentración espermática observada ($146.18 \pm 64.83 \times 10^6/\text{ml}$), es mayor a las halladas por Quispe y Delgado (2012) de $99 \times 10^6/\text{ml}$, por Giuliano *et al.* (2008) de 69.07 a $82.24 \times 10^6/\text{ml}$, y por Godoy (2014) de $33.3 \times 10^6/\text{ml}$. Estas diferencias, si bien podrían deberse a la libido de los animales, podrían también deberse al instrumento de medición utilizado, ya que todos ellos emplearon una cámara hemocitométrica, mientras que en el presente estudio se utilizó un Spermtrack®, que ha mostrado mejores resultados que las cámaras de Neubauer para estas evaluaciones (Soler *et al.*, 2012; Crespilho *et al.*, 2017). Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides vivos (70.23%) estuvo dentro de los rangos reportados en la literatura (Aller *et al.*, 2003; Giuliano *et al.*, 2008; Quispe y Delgado, 2012; Valle, 2013; Godoy, 2014).

La funcionalidad de la membrana espermática del estudio (54.31%) fue superior a las reportadas por Giuliano *et al.* (2008) de 29.5-30.4%, utilizando el mismo método de colección y con una solución hipoósmotica también ajustada a 50 mOsm/kg, o las halladas por Santa Cruz *et al.*, (2016) de 31.3-49.1% de muestras de semen colectadas por electroeyaculación. Es posible que estas diferencias se deban a la mejor calidad de semen de este estudio, el cual se refleja en el volumen, concentración y porcentaje de espermatozoides vivos encontrados.

La reacción acrosomal de 67.36% fue inferior a los valores reportados por Fumuso *et al.* (2014) y Carretero *et al.* (2015) en semen de llama colectado por electroeyaculación. Esta variable es de gran importancia pues permite evaluar los efectos de varias biotecnologías reproductivas (Giuliano *et al.*, 2012).

Cinética Espermática

La MT en semen fresco no mostró diferencias significativas entre animales, en contraposición a lo reportado por Meza *et al.* (2018) en espermatozoides de alpacas recu-

perados de los conductos deferentes. En dicha publicación, los valores de MT fueron similares a los encontrados en el presente estudio (41.7%), utilizando el mismo sistema CASA. Por su parte, Quispe y Delgado (2012) y Valle (2013), reportaron valores superiores en semen de llamas, aunque con evaluaciones subjetivas.

Kershaw *et al.* (2017) hallaron un descenso de la movilidad espermática a los 30 minutos del tratamiento con papaína en semen de alpaca, descenso que fue más lento al ser tratado con 0.1 mg/ml de dicha enzima, concentración empleada en este estudio al incubar el semen de llama. Por su parte, Flores *et al.* (2015) mostraron que la MT de los espermatozoides de alpaca se veía incrementada al emplear colagenasa.

Monaco *et al.* (2016) evaluaron el efecto del tratamiento con papaína en la viscosidad y la MP del semen de dromedario, reportando una disminución lineal de la viscosidad hasta los 120 minutos, así como un incremento de la MP a los 20 minutos para luego descender igualmente en forma lineal, sin encontrar una explicación plausible para tal fenómeno. En el presente estudio se observó un comportamiento similar de la viscosidad, dado que hubo un mayor MP tras el degelificado con papaína. Este efecto fue también observado por El-Bahrawy *et al.* (2017) en semen de dromedario incubado con α -amilasa, bromelina y papaína.

En su mayoría, los valores de movilidad espermática reportados y que provienen de evaluaciones subjetivas (Valle, 2013; Quispe y Delgado, 2014) son mayores a los encontrados en este estudio, lo que puede ser explicado por el tipo de análisis de movilidad. Los sistemas CASA-Mot (Soler *et al.*, 2016; Holt *et al.*, 2018) generalmente ignoran como móviles a los espermatozoides que no muestran desplazamiento, mientras que en los análisis subjetivos el movimiento de la cola de los espermatozoides se incluye dentro de la movilidad.

Los parámetros de la cinética espermática observados en el presente estudio fueron menores a los reportados por Rodríguez (2013) y Flores *et al.* (2015) en semen de llamas y alpacas, respectivamente, ambos colectados por electroeyaculación, así como en semen de dromedario (El-Bahrawy *et al.*, 2017; Malo *et al.*, 2019). En forma similar, en semen de alpaca recuperados de los conductos deferentes (Meza *et al.*, 2018). En el presente estudio se ha puesto de manifiesto que el tratamiento con papaína indujo un incremento de los parámetros de la cinética espermática considerados (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF), lo que también fue observado por El-Bahrawy *et al.* (2017), en las variables de VCL, VSL y VAP en semen de dromedario incubado con α -amilasa, bromelina y papaína.

La VAP se ha mostrado como el parámetro predictor más importante de la fertilidad en semen de toros (Nagy *et al.*, 2015) y de burros (Dorado *et al.*, 2013). Otro de los indicadores de fertilidad empleados en toros es la habilidad del espermatozoide de hiperactivarse (Shojaei *et al.*, 2012), siendo los parámetros comúnmente usados para identificar este estado, los valores elevados de la VCL y de ALH y los valores bajos de LIN. En este trabajo no se encontró alteraciones en la ALH, lo que indicaría que, con el proceso de incubación en papaína, no se ha inducido dicho estado de hiperactivación en los espermatozoides de las llamas.

CONCLUSIONES

- Se encontró un incremento significativo ($p < 0.05$) de las variables cinemáticas analizadas [movilidad total (MP), movilidad progresiva (MP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad promedio (VAP), índice de linealidad (LIN), índice de rectitud

(STR), índice de oscilación (WOB), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batido de la cola (BCF)] en el semen de llama incubado con papaína en relación al semen fresco

- Los resultados sugieren que el tratamiento con papaína mejora la movilidad total y progresiva, y la mayoría de los parámetros de cinética espermática del espermatozoide de llama, sin llegar a inducir su hiperactivación.

LITERATURA CITADA

1. **Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. 2003.** Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch Zootec 52: 15-23.
2. **Amann RP, Waberski D. 2014.** Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. Theriogenology 81: 5-17. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.004
3. **Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas. Theriogenology 47: 619- 626. doi: 10.1016/s0093-691x(97)00020-4
4. **Casaretto C, Martínez Sarrasague M, Giuliano S, Rubin de Celis E, Gambarotta M, Carretero I, Miragaya M. 2012.** Evaluation of *Lama glama* semen viscosity with a cone-plate rotational viscometer. Andrologia 44: 335-341.
5. **Carretero MI, Fumuso FG, Neild DM, Giuliano SM, Cetica P, Miragaya MH. 2015.** Evaluation of the acrosomal status in *Lama glama* sperm incubated with acrosome reaction inducers. Anim Reprod Sci 160: 1-11. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.06.014

6. **Ccalta R, Ordóñez C, Ampuero E, Cucho H. 2017.** Efecto de la criopreservación en la morfometría del espermatozoide de alpaca. *Spermova* 7: 100-105
7. **Crespilho AM, Chiaradia L, Cortez A, Dinelli M, Papa FO, Gomes GM, Peixoto KC. 2017.** Sensitivity evaluation of the computer-assisted sperm analysis (CASA) in the determination of frozen-thawed bull semen concentration. *Braz J Vet Res Anim Sci* 54: 247-252.
8. **Crichton E, Pukazhenti BS, Billah M, Skidmore J. 2015.** Cholesterol addition aids the cryopreservation of dromedary camel (*Camelus dromedaries*) spermatozoa. *Theriogenology* 83: 168-174. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.09.005
9. **Cucho H, López Y, Caldeira C, Valverde A, Ordóñez C, Soler C. 2019** Comparison of three different staining methods for the morphometric characterization of alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using ISAS® CASA-Morph system. *Nova Biol Reperta* 6: 284-291. doi: 10.29252/nbr.6.3.284
10. **Díaz A, Huamán H, Camacho J, Ampuero A, Quispe D, Huanca W. 2011.** Serum oestradiol level during mating and its effect on conception rate in the alpaca. *Rev Inv Vet Perú* 22: 312-317.
11. **Dorado J, Acha D, Ortiz I, Gálvez MJ, Carrasco JJ, Díaz B, Gómez-Arrones V, et al. 2013.** Relationship between conventional semen characteristics, sperm motility patterns and fertility of Andalusian donkeys. *Anim Reprod Sci* 143: 64-71. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2013.10.003
12. **El-Bahrawy, Rateb S, Khalifa M, Monaco D, Lacalandra G. 2017.** Physical and kinematic properties of cryopreserved camel sperm after elimination of semen viscosity by different techniques. *Anim Reprod Sci* 187: 100-108. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2017.10.011
13. **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 los espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) criopreservados evaluados mediante el sistema de análisis ISAS®. *Spermova* 5: 47-50.
14. **Fumuso FG, Giménez ML, Neild DM, Giuliano SM, Chavez MG, Carretero MI. 2014.** Comparación de métodos de lavado y tiempos de conservación de los frotis para evaluar el acrosoma en espermatozoides de llama mediante la tinción de Coomassie Blue. *Spermova* 4: 50-53. doi: 10.18548/asp/0002.10
15. **Giuliano SM. 2012.** Extracción y evaluación del semen de camélidos sudamericanos. *Spermova* 2: 6-9.
16. **Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. 2008.** Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci* 104: 359-369. doi: 10.1016/j.anireprosci.-2007.02.016
17. **Giuliano SM, Bisiau C, Carretero MI, Arraztoa CC, Neild D. 2012.** Use of comassie blue to evaluate acrosomal status in llama spermatozoa. Preliminary results. *InVet* 14: 279.
18. **Godoy DI. 2014.** Caracterización fisicoquímica y parámetros de calidad seminal del semen de llama colectado mediante vagina artificial. Tesis de Médico Veterinario. Valdivia, Chile: Univ. Austral de Chile. 29 p.
19. **Holdridge LR. 1967.** Life zone ecology. San José, Costa Rica. Tropical Science Center. 149 p.
20. **Holt WV, Cummins JM, Soler C. 2018.** Computer-assisted sperm analysis and reproductive science; a gift for understanding gamete biology from multidisciplinary perspectives. *Reprod Fert Develop* 30: 3-5. doi: 10.1071/RDv30n6-FO
21. **Kershaw-Young CM, Maxwell WMC. 2012.** Seminal plasma components in camelids and comparisons with other species. *Reprod Domest Anim* 47: 369-375. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.-02100.x

22. **Kershaw-Young CM, Stuart C, Evans G, Maxwell WMC. 2013.** The effect of glycosaminoglycan enzymes and proteases on the viscosity of alpaca seminal plasma and sperm function. *Anim Reprod Sci* 138: 261-267. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.02.005
23. **Kershaw CM, Evans G, Rodney R, Maxwell WMC. 2017.** Papain and its inhibitor E-64 reduce camelid semen viscosity without impairing sperm function and improve post-thaw motility rates. *Reprod Fert Develop* 29: 1107-1114. doi: 10.1071/RD15261
24. **Malo C, Elwing B, Soederstroem L, Lundeheim N, Morrell JM, Skidmore JA. 2019.** Effect of different freezing rates and thawing temperatures on cryosurvival of dromedary camel spermatozoa. *Theriogenology* 125: 43-48. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.07.037
25. **Meza A, Caldeira C, Valverde A, Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H, Soler C. 2018.** Sperm kinematic characterization of alpaca (*Vicugna pacos*) during the reproductive season. *Reprod Domest Anim* 53: 1415-1423. doi: 10.1111/rda.13284
26. **Monaco D, Fatnassi M, Padalino B, Hammadi M, Khorchani T, Lacalandra GM. 2016.** Effect of α -amylase, papain, and Spermfluid® treatment on viscosity and semen parameters of dromedary camel ejaculates. *Res Vet Sci* 105: 5-9. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.01.003
27. **Mortimer S. 2000.** CASA-Practical aspects. *J Androl* 21: 515-524. doi: 10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x
28. **Morton KM, Vaughan J, Maxwell WM. 2008.** Continued development of artificial insemination technology in alpacas. Kingston. Rural Industries Research and Development Corporation. 187 p.
29. **Nagy Á, Polichronopoulos T, Gáspárdy A, Solti L, Cseh S. 2015.** Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. *Acta Vet Hung* 63: 370-381. doi: 10.1556/004.2015.035
30. **Quispe HA, Ciprián R, Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H. 2015.** Test hipoosmótico en espermatozoides de alpaca (*Vicugna pacos*) recuperados del conducto deferente. *Spermova* 5: 15-19.
31. **Quispe CH, Delgado PA. 2012.** Desarrollo de tres protocolos de colección de semen de llamas (*Lama glama*). En: VI Congreso Mundial de Camélidos Sudamericanos. Arica, Chile.
32. **Ríos CA. 2014.** Categorización de alpacas machos reproductores Huacaya blancos del CICAS-La Raya de acuerdo a las características fenotípicas, la calidad de fibra y semen. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Cusco, Perú: Univ. San Antonio Abad del Cusco. 160 p.
33. **Rodríguez M. 2013.** Índice de fragmentación del ADN espermático y test de HOS en semen de llamas (*Lama glama*) utilizando el Integrated Semen Analysis System (ISAS). Tesis de Ingeniero Zootecnista. Cusco, Perú: Univ. San Antonio Abad del Cusco. 121 p.
34. **Santa Cruz R, Giuliano SM, Gambarotta MC, Morrell JM, Abraham MC, Miragaya MH, Carretero MI. 2016.** Comparison of different methods of semen selection of llama raw semen. *Anim Reprod Sci* 173: 8-12. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.08.001
35. **Shojaei H, Kroetsch T, Wilde R, Blondin P, Kastelic JP, Thundathil JC. 2012.** Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology* 77: 940-951. doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.09.026
36. **Soler C, Fuentes MC, Sancho M, García A, Núñez de Murga M, Núñez de Murga J. 2012.** Effect of counting chamber on seminal parameters, analyzing with ISASv1®. *Rev Int Androl* 10: 132-138.

37. **Soler C, Sancho M, García-Molina A, Núñez J, Parráquez VH, Contell J, Bustos-Obregón E. 2014a.** Llama and alpaca comparative sperm head morphometric analysis. *J Camelid Sci* 7: 48-58.
38. **Soler C, Sancho M, García A, Fuentes MC, Nuñez J, Cucho H. 2014b.** Ejaculate fractioning effect on llama sperm head morphometry as assessed by the ISAS® CASA system. *Reprod Domest Anim* 49: 71-78. doi: 10.1111/rda.12226
39. **Soler C, Cooper TG, Valverde A, Yániz JL. 2016.** Afterword to sperm morphometrics today and tomorrow special issue in *Asian Journal of Andrology*. *Asian J Androl* 18: 895-897. doi: 10.4103/1008-682X.188451
40. **Tibary A, Vaughan J. 2006.** Reproductive physiology and infertility in male South American Camelids: a review and clinical observations. *Small Ruminant Res* 61: 283-298. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.018
41. **Valle EM. 2013.** Evaluación de dos técnicas de colección de semen en llamas (*Lama glama*) en la Estación Experimental de Choquenaira. Tesis de Ingeniería Agronómica. La Paz, Bolivia: Univ. Mayor de San Andrés. 162 p.
42. **Valverde A, Madrigal-Valverde M. 2018.** Sistemas de análisis computarizado de semen en la reproducción animal. *Agron Mesoam* 29: 469-484. doi: 10.15517/ma.v29i2.30613