

EFFECTO DE DILUTORES EN BASE A TRIS, TES Y LECHE DESCREMADA EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DEL EPIDÍDIMO DE ALPACA

EFFECT OF EXTENDERS BASED ON TRIS, TES AND SKIM MILK ON CRYOPRESERVATION OF EPIDIDYMAL ALPACA SPERM

Jorge Banda R.¹, Shirley Evangelista V.², Luis Ruiz G.¹, Rocío Sandoval
M.¹, Claudia Rodríguez Ll.², Martha Valdivia C.², Alexei Santiani A.^{1,3}

RESUMEN

El estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto de tres dilutores (Tris, Tes y leche descremada) en la criopreservación de espermatozoides obtenidos del epidídimo de alpaca. Previamente se determinó el efecto del tiempo entre el beneficio/castración y la recuperación de los espermatozoides del epidídimo. Se utilizaron 24 testículos de alpacas para la obtención de los espermatozoides directamente del epidídimo en una solución fisiológica buferada (PBS). La recuperación de espermatozoides se realizó a las 0, 35, 48 y 72 horas (6 testículos por grupo) y se evaluó la motilidad, concentración espermática e integridad funcional de membrana. Los espermatozoides recuperados a partir de 35 horas post beneficio/castración no fueron aptos para ser congelados. Las muestras recuperadas a las 0 horas fueron diluidas con Tris, Tes y leche descremada, enfriadas desde 35 a 5 °C en 90 minutos, envasadas en pajillas de 0.25 ml y congeladas en nitrógeno líquido. Se evaluó la motilidad, integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal en las muestras descongeladas. La motilidad fue de 14.0, 8.6 y 17.0% en los grupos Tris, Tes y leche descremada, respectivamente, donde el grupo leche descremada fue significativamente mejor que el grupo Tes ($p < 0.05$). Los porcentajes de integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal fueron similares entre los tres grupos. Se concluye que los tres dilutores brindan efectos similares para la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca.

Palabras clave: espermatozoides epididimarios, dilutores, criopreservación de semen, alpaca

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of three semen extenders (skim milk, Tris, and Tes) on cryopreservation of epididymal alpaca sperm. Previously,

¹ Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM, Lima

² Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

³ E-mail: asantiania@unmsm.edu.pe

the effect of timespan since slaughtering or castration to the recovery of epididymal sperm was evaluated. Twenty-four alpaca testicles were used to obtain sperm from the epididymis in a buffered saline solution (PBS). The recovery of spermatozoa was performed at 0, 35, 48, and 72 hours (6 testes per group) after slaughtering or castration. Sperm motility, concentration, and sperm membrane functional integrity were analyzed. Sperm recovered after 35 hours was not usable for cryopreservation. Sperm samples recovered at 0 hours were subjected to the process of freezing. Samples were diluted with skim milk, Tris, and Tes, cooled from 35 to 5 °C in 90 minutes, packed into 0.25 ml straws and frozen in liquid nitrogen. After thawing, straws were evaluated by motility, sperm membrane functional integrity and vitality/acrosome integrity. Motility was 17.0, 14.0, and 8.6% on skim milk, Tris and Tes groups respectively, where the skim milk group was significantly better than the Tes ($p < 0.05$). Percentages of sperm membrane functional integrity and vitality/acrosomal integrity were similar among the three extenders. It was concluded that all three extenders provided similar effects for the cryopreservation of epididymal alpaca spermatozoa.

Key words: epididymal sperm, extender, sperm cryopreservation, alpaca

INTRODUCCIÓN

La congelación de semen es una biotecnología reproductiva muy poco empleada en camélidos sudamericanos (CSA). Las dificultades en la colección de semen y en el manejo de las muestras seminales, debido a su alta viscosidad, y el escaso conocimiento sobre dilutores apropiados para el semen de CSA se constituyen en los principales factores que imposibilitan el desarrollo de protocolos de criopreservación con resultados óptimos de calidad espermática post-descongelamiento. Esto determina que la inseminación artificial quede restringida al uso de semen fresco. Asimismo, se tiene que considerar la baja concentración de espermatozoides y el alto porcentaje de anormales que, como características usuales del semen de alpaca, incrementan la dificultad de obtener parámetros espermáticos post-descongelamiento adecuados que permitan la fecundación (Fernández-Baca y Calderón, 1966; Sumar y Leyva, 1981; Bravo *et al.*, 1997).

Los trabajos referidos a la congelación de semen de CSA muestran resultados desalentadores en función a la calidad seminal post-descongelamiento. En llamas, McEvoy *et al.* (1992) obtuvieron solo un 10% de motilidad al descongelamiento de semen co-

lectado por electroeyaculación; Von Baer y Hellemann (1999) describen motilidades entre 16 y 28% en semen descongelado de llama, probando la adición de un surfactante al 0.5% (Equex); mientras que Aller *et al.* (2003) reportan 20% de espermatozoides móviles.

En la alpaca se ha reportado un descenso considerable de la motilidad progresiva, donde valores de 60-98% en muestras seminales frescas descienden hasta 15-20% luego del descongelamiento (Valdivia *et al.*, 1999). Posteriormente, Santiani *et al.* (2005) congelaron semen en dos pasos obteniendo una motilidad de 20% de espermatozoides viables con acrosoma íntegro al descongelamiento de las muestras obtenidas con vagina artificial; no obstante, Bravo *et al.* (2000) obtuvieron resultados superiores de motilidad (30-40%) en muestras obtenidas y congeladas por el mismo método.

Se han reportado diversos métodos que eliminan la viscosidad del plasma seminal con el fin de favorecer el manejo de muestras seminales. Mediante el uso de enzimas (fibrinolisisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina) y la acción mecánica del paso repetido a través de una jeringa de tuberculina (aspirado y eyectado múltiple), se ha logrado licuar las muestras de semen; sin embar-

go, aún es incierto el efecto de estos métodos sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides (Callo *et al.*, 1999; Valdivia *et al.*, 1999). En este sentido, la recuperación de espermatozoides epididimarios se constituye en una alternativa para la obtención de muestras sin el inconveniente antes mencionado; no obstante, se debe considerar la influencia que pueda tener la ausencia del plasma seminal sobre los parámetros espermáticos en el post-descongelamiento (England y Allen, 1992; Way *et al.*, 2000).

Morton *et al.* (2007) fueron los primeros en reportar el congelamiento de espermatozoides epididimarios de alpaca, obteniendo 18% de motilidad y 80% de integridad acrosomal al descongelamiento; en tanto que Gonzales (2008) reporta una tasa de supervivencia de solo 5% con espermatozoides epididimarios de alpaca. El presente estudio evaluó el efecto de tres dilutores utilizados usualmente para criopreservación de semen de alpacas, sobre la motilidad, integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal de espermatozoides epididimarios de alpaca sometidos a un proceso de criopreservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se utilizaron 24 testículos de alpaca, 18 provenientes del Camal Municipal de Huancavelica y seis pertenecientes a tres alpacas Huacaya de 4 años de edad, con un peso de 35 a 40 kg, de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV-UNMSM), Lima. El estudio se realizó durante los meses de enero a marzo de 2008.

Los 18 testículos de Huancavelica fueron recuperados en un mismo día. Luego del beneficio, se recuperaron los testículos, se retiró la túnica vaginal visceral, se lavaron con suero fisiológico y se colocaron en fras-

cos plásticos individuales con suero fisiológico a 5 °C y se trasladaron a Lima en cajas refrigeradas. Por otro lado, los testículos de las alpacas en Lima se obtuvieron por orquiectomía, utilizando Ket-A-xyl® (Ketamina-Xilazina-Atropina) como anestésico (0.8 ml/10 kg), vía intramuscular profunda.

Espermatozoides Epididimarios

Los testículos se lavaron con solución fisiológica tampón (PBS) a 37 °C, y se separaron los epidídimos. Se lavaron cuatro veces con PBS a 37 °C y se aislaron las colas epididimarias mediante un corte con tijera mayo recta. Se colocaron en placas petri estériles, se dividieron en secciones pequeñas y se suspendieron en 1 ml de PBS a 37 °C por epidídimo. Se prensaron suavemente con pinzas para lograr la salida de los espermatozoides de los conductos epididimarios. Se recuperó los espermatozoides en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, de acuerdo a lo descrito por Morton *et al.* (2007), evaluándose la motilidad, concentración espermática y morfología en base a métodos estándares.

Preparación de Dilutores

Dilutor en base a Tris

Descrito para congelación de espermatozoides ovinos (Aisen *et al.*, 2002). La fracción A fue en base a 2.71 g de Tris, 1.40 g de ácido cítrico, 1 g de fructosa y 10 ml de yema de huevo, y se completó hasta 100 ml con agua bidestilada. La fracción B se preparó con 6 ml de glicerol, 0.15 g de EDTA, 7.6 g de trehalosa, completados hasta 100 ml con la fracción A.

Dilutor en base a Tes

Descrito para congelación de espermatozoides de alpaca (Rodríguez, 2009). Para la fracción A se mezcló 3.03 g de Tes, 0.763 g de Tris, 0.445 g de citrato de sodio, y 17.3 ml de yema de huevo, y se completó hasta 100 ml con agua bidestilada. La fracción B se preparó en base a la solución anterior, adi-

cionándole dimetilacetamida (DMA) para obtener una concentración de 0.375 M.

Dilutor en base a leche descremada

Descrito para congelación de espermatozoides de alpaca (Santiani *et al.*, 2005). Para la fracción A se mezcló 95 ml de leche descremada, 5 ml de yema de huevo y 4.85 g de fructosa. La fracción B del dilutor se preparó en base a la solución anterior, adicionándole etilenglicol para obtener una concentración de 0.2 M.

Fase Pre-Experimental

Experimento 1: Efecto del tiempo entre el beneficio/castración y la recuperación de espermatozoides epididimarios sobre parámetros de calidad seminal

Tuvo por finalidad determinar el momento óptimo para recuperar espermatozoides del epidídimo de alpaca después del beneficio o castración. Los testículos se distribuyeron en grupos de seis y la recuperación de los espermatozoides se hizo a las 0 horas de la castración (testículos de alpacas en Lima), y las 35, 48 y 72 horas del sacrificio (testículos de alpacas de Huancavelica). Los testículos de los últimos tres grupos fueron lavados y mantenidos en suero fisiológico a 5 °C hasta el momento de su evaluación.

Fase Experimental

Experimento 2: Evaluación de los dilutores Tris, Tes y leche descremada en la criopreservación de espermatozoides epididimarios

Solamente los espermatozoides del Grupo 0 horas mostraron parámetros de calidad seminal adecuados para criopreservación, y por lo tanto, las seis muestras de este grupo fueron usadas en el experimento.

Cada una de las muestras (1 ml/muestra) se dividió en tres partes de 250 µl c/u y se diluyeron con igual volumen de los tres

dilutores (fracciones A) a 37 °C. Seguidamente, las muestras fueron enfriadas hasta 5 °C en un tiempo aproximado de 90 minutos, descendiendo 3 grados por minuto. Se les añadió 500 µl de la fracción B del dilutor correspondiente, y se dejó estabilizar por 30 minutos para seguidamente envasar las muestras en pajillas de 0.25 ml. Se envasaron cuatro pajillas por dilutor de cada epidídimo.

Las pajillas se congelaron utilizando un sistema de enfriamiento controlado con el software Cryogenesis 4.0. Luego, se almacenaron en un tanque de nitrógeno líquido. El descongelamiento de las pajillas se realizó 15 días después de la criopreservación, poniéndolas en baño maría a 42 °C durante 45 segundos.

Se evaluó la motilidad, integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal. La motilidad espermática se evaluó en 10 campos y se expresó en porcentaje de espermatozoides móviles.

La integridad funcional de membrana (HOS) se evaluó en 200 espermatozoides por lámina mediante el test hipoosmótico (HOS: hypo osmotic swelling test) descrito por Jeyendran *et al.* (1984) y Santiani *et al.* (2004) para espermatozoides humanos y ovinos, respectivamente. Se consideraron espermatozoides con membrana funcional (HOS+) los que reaccionaron al estrés hipoosmótico mediante la hinchazón de la parte distal de la cola espermática, mientras que aquellos espermatozoides sin cambios en la cola se consideraron funcionalmente dañados (HOS-). Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides con membrana funcional (HOS+).

La vitalidad o integridad acrosomal se evaluó mediante la técnica de doble tinción (DT), descrita por Didion *et al.* (1989) y modificada por Santiani *et al.* (2005) para espermatozoides de alpaca. Esta técnica emplea el colorante Azul tripan como indicador de vitalidad y Giemsa que se adhiere a la matriz acrosomal. Se observaron 200

espermatozoides bajo el objetivo de inmersión (100x). Se consideraron espermatozoides vivos con acrosoma intacto a los que presentaron coloración transparente en la parte posterior a la línea ecuatorial de la cabeza y al mismo tiempo el acrosoma teñido de color fucsia. Otros patrones de espermatozoides fueron espermatozoides vivos sin acrosoma (región pos ecuatorial transparente y región acrosomal transparente); espermatozoides muertos con acrosoma (región pos ecuatorial azul oscuro y región acrosomal fucsia), y espermatozoides muertos sin acrosoma (región pos ecuatorial azul oscuro y región acrosomal transparente). Los resultados se expresaron en porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma íntegro.

Análisis de Datos

Se utilizó el programa estadístico Prism® v. 3.0. Los porcentajes de motilidad, espermatozoides HOS(+) y espermatozoides vivos con acrosoma intacto se transformaron a valores angulares ($\text{ángulo} = \arcseno \sqrt{x}$) para acercar los datos a la distribución normal. Para determinar si existen diferencias estadísticas se utilizó la prueba de análisis de varianza, y para determinar diferencias entre grupos se utilizó el test de Tukey.

RESULTADOS

Los valores de motilidad, concentración espermática e integridad funcional de membrana de espermatozoides epididimarios disminuyeron conforme se incrementó el intervalo de tiempo entre el beneficio o castración y la evaluación (Cuadro 1). En ese sentido, los mejores valores de motilidad, concentración e integridad funcional de membrana se obtuvieron a las 0 horas, en tanto que no se logró observar espermatozoides a las 72 horas, y por lo tanto no se hicieron las pruebas de motilidad e integridad funcional de membrana.

Si bien la motilidad a las 0 horas fue alrededor del 30%, a las 35 horas se había reducido considerablemente (3.8%), y a las 48 horas fue nula. La concentración espermática fue similar a las 0 y 35 horas, pero se observó un descenso considerable a las 48 horas, no observándose ningún espermatozoide luego del lavado del epidídimo a las 72 horas. En forma similar, la integridad funcional de membrana fue mayor en espermatozoides de los grupos 0 y 35 horas en comparación con los espermatozoides del grupo 48 horas (Cuadro 1).

En el segundo experimento solo se utilizaron los espermatozoides del Grupo 0 horas dado que los parámetros espermáticos de los otros grupos no fueron adecuados para someterlos al proceso de criopreservación. Los valores de motilidad, integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal post-descongelamiento se presentan en el Cuadro 2. La motilidad espermática en el grupo de leche descremada (17%) fue superior ($p < 0.05$) al del grupo Tes (8.6%), pero similar al grupo Tris. No se encontró diferencias entre grupos en el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional (HOS+) ni de espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

No existe información precisa sobre la supervivencia de espermatozoides de camélidos sudamericanos mantenidos dentro del epidídimo desde el momento en que se beneficia o castra al animal hasta que la muestra pueda ser procesada en un laboratorio. En este estudio, el tiempo transcurrido entre el beneficio/castración de la alpaca hasta el momento de recuperación de los espermatozoides epididimarios afectó significativamente la motilidad espermática, siendo menos de 35 horas el tiempo idóneo para obtener una motilidad aceptable. Otros reportes señalan la posibilidad de recuperar y congelar espermatozoides de alpaca a las 8 horas (Morton *et al.*, 2007), 14 horas (Rodríguez, 2009) y 20 a 30 horas del beneficio (González *et al.*, 2008). Además, en llamas se reporta recuperación y congelación de esperma-

Cuadro 1. Efecto del tiempo (horas) entre el beneficio o castración de la alpaca y la recuperación de espermatozoides epididimarios sobre parámetros de calidad seminal

Parámetros espermáticos	0 h	35 h	48 h	72 h
Motilidad (%)	31.3 ± 3.5 ^a	3.8 ± 4.8 ^b	0	-----
Concentración espermática (millones/ml)	39.0 ± 17.0 ^a	37.8 ± 37.7 ^a	4.8 ± 11.0 ^b	0
Espermatozoides con membrana funcional (%)	34.5 ± 3.0 ^a	35.5 ± 4.4 ^a	22.0 ± 5.7 ^b	-----

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

Cuadro 2. Parámetros espermáticos obtenidos con el uso de los dilutores Tris, Tes y leche descremada en criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpaca

Parámetros espermáticos	Tris	Tes	Leche descremada
Motilidad	14.0 ± 7.5 ^{ab}	8.6 ± 3.8 ^b	17.0 ± 4.3 ^a
HOS	24.3 ± 9.6	19.1 ± 5.6	17.9 ± 5.5
Vitalidad/Integridad acrosomal	32.6 ± 15.6	26.3 ± 17.3	27.2 ± 13.5

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

tozoides de llama a las 8 horas del beneficio (Ratto *et al.*, 1999).

Los resultados indican una rápida pérdida de motilidad de los espermatozoides luego del beneficio de los machos, y este resultado puede, además, apoyarse con resultados de otros estudios. Así, la motilidad encontrada a las 0 horas fue de 31.3%, y según otros autores fue de 22% a las 14 horas (Rodríguez, 2009), y de 20% a las 20-30 horas (González *et al.*, 2008). Asimismo, la motilidad en el presente estudio a las 35 y 48 horas fue de 3 y 0%, respectivamente. No obstante, otros autores reportan porcentajes de motilidad entre 40 a 50% a las 8 horas post beneficio, tanto en espermatozoides de alpaca (Morton *et al.*, 2007) como de llama (Ratto *et al.*, 1999). Esto podría explicarse

porque en el primer caso se realizó un lavado por centrifugación de los espermatozoides epididimarios con lo que, posiblemente, se eliminaron los factores inmovilizantes de espermatozoides presentes en el fluido epididimario (Albers y Barrios, 2006). En ese sentido, Rodríguez (2009) refiere que si bien la motilidad inicial fue alrededor del 22%, la motilidad aumentó hasta cerca del 50% a los 60 minutos de la recuperación de los espermatozoides.

Este estudio es el primero en reportar concentración espermática e integridad funcional de membrana en espermatozoides epididimarios de alpaca. Ambos parámetros muestran resultados similares entre las 0 y 35 horas post beneficio/castración, y una considerable disminución a las 48 horas, mien-

tras que no fue posible recuperar espermatozoides del epidídimo a las 72 horas. Si bien, estos dos parámetros no variaron significativamente entre las 0 y 35 horas, la reducida motilidad a las 35 horas indica que los gametos deberán recuperarse antes de las 35 horas post castración/beneficio para poder criopreservarlos con cierto nivel de éxito.

El deterioro de los parámetros espermáticos coincide con observaciones en otras especies (Garde *et al.*, 1994; Anel *et al.*, 2002; Tittarelli *et al.*, 2006), donde se demuestra que la motilidad espermática disminuye significativamente entre las 24 y 48 horas *post mortem*, siendo bajas todas las medidas de calidad espermática luego de las 48 horas.

Existen escasos reportes sobre congelación de espermatozoides epididimarios en alpacas. Los resultados indicaron que hubo mejor motilidad post descongelamiento con los dilutores a base de leche descremada y Tris (17 y 14%, respectivamente) en comparación con uso de Tes (8%). Morton *et al.* (2007) reportan similares motilidades con el uso de los dilutores en base a lactosa y Tris (18 y 11%, respectivamente). Por otro lado, Santiani *et al.* (2005) encontraron mejores valores de motilidad (20%) al congelar semen de alpaca con el dilutor a base de leche descremada frente a otro en base a Tris (<5%) y sugieren que la caseína y la lactosa, presentes en la leche, protegerían mejor a los espermatozoides que el Tris y ácido cítrico, presentes en el dilutor en base a Tris. Esto también concuerda otros reportes (Ratto *et al.*, 1999; Morton *et al.*, 2007). Se puede inferir que el uso de dilutores cuyos componentes incluyen lactosa o leche descremada favorecerían la conservación espermática en alpacas y llamas frente a dilutores en base a Tris.

La mayoría de trabajos sobre criopreservación espermática en camélidos sudamericanos utilizaron muestras de semen completo (McEvoy *et al.*, 1992; von Baer *et al.*, 1999; Valdivia *et al.*, 2000; Aller *et al.*, 2003; Santiani *et al.*, 2005), es decir, los

espermatozoides fueron congelados junto con el plasma seminal. En este trabajo, los espermatozoides procedieron del epidídimo y, por lo tanto, no estuvieron expuestos al plasma seminal. En ese sentido, el efecto del plasma seminal sobre la viabilidad espermática durante el proceso de criopreservación es controversial. Por un lado, se indica que el plasma seminal protegería a los espermatozoides durante el congelamiento (Barrios *et al.*, 2000; Parrilla *et al.*, 2004), mientras otros estudios señalan que la adición de plasma seminal afecta negativamente la calidad seminal durante la criopreservación (England y Allen, 1992; Way *et al.*, 2000).

En un trabajo reciente, Rodríguez (2009) no encontró diferencias en diversos parámetros espermáticos al congelar espermatozoides epididimarios de alpaca con y sin plasma seminal, concluyendo que no existe un efecto protector por parte del plasma seminal en la criopreservación de espermatozoides de alpaca. Esto explicaría que los valores espermáticos, luego de la criopreservación de semen de alpacas (Valdivia *et al.*, 2000; Santiani *et al.*, 2005), sean similares a los obtenidos durante la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas (Morton *et al.*, 2007; Gonzáles *et al.*, 2008). En consecuencia, los trabajos de criopreservación de espermatozoides epididimarios se constituyen en buenos modelos para el estudio de la criopreservación de semen de alpaca.

CONCLUSIONES

- La recuperación de espermatozoides del epidídimo de alpacas realizada luego de 35 horas post beneficio afecta negativamente la motilidad y concentración espermática.
- La criopreservación de espermatozoides de alpaca utilizando un dilutor en base a leche descremada brinda mejores resultados en relación a motilidad espermática en comparación con el dilutor Tes.

- El uso de los dilutores leche descremada, Tris y Tes no afecta los porcentajes de integridad funcional de membrana y vitalidad/integridad acrosomal durante el proceso de congelamiento/descongelamiento de espermatozoides de alpaca.

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por el financiamiento del presente trabajo a través del Proyecto PROCYT N.º157-2006 «Desarrollo de un protocolo de criopreservación de semen de alpacas mediante el estudio de diferentes dilutores y agentes crioprotectores sobre la funcionalidad espermática».

LITERATURA CITADA

1. **Aisen E, Medina V, Venturino A. 2002.** Cryopreservation and post-thawed fertility of ram frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
2. **Albers M, Barrios D. 2006.** Movilidad individual de los espermatozoides epididimarios de toros *post mortem* obtenidos mediante lavado retrógrado. *Zootecnia Trop* 24: 267-280.
3. **Aller J, Rebuffi G, Kancino A, Alberio R. 2003.** Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama. *Arch Zootec* 52: 15-23.
4. **Anel L, Gerra C, Alvarez M, Anel E, Martínez A, Boixo C, Kaabi M, Herraes P, Paz P. 2002.** Effect of *postmortem* interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology* 57: 577 (Abstr).
5. **Barrios B, Perez-Pe R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J. 2000.** Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod* 63: 1531-1537.
6. **Bravo P, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997.** Collection of semen and insemination of alpacas. *Theriogenology* 47: 619-626.
7. **Bravo PW, Skidmore JA, Zhao XX. 2000.** Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Anim Reprod Sci* 62: 173-193.
8. **Callo M, Garnica J, Bravo W. 1999.** Efecto de la fibrinolisisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina sobre la viscosidad del semen en alpacas. En: II Congreso Mundial sobre camélidos. Cusco, Perú.
9. **Didion B, Dobrinsky J, Giles J, Graves C. 1989.** Staining procedure to defect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res* 22: 51-57.
10. **England G, Allen W. 1992.** Factors affecting the viability of canine spermatozoa. Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology* 37: 373-381.
11. **Fernández-Baca S, Calderón W. 1966.** Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev Fac Med Vet UNMSM* 18-20: 13-26.
12. **Garde J, Aguado M, Montoro V, Pérez M, García O, Perz S. 1994.** Estudio post-mortem de la viabilidad y del poder fecundante del semen del morueco. Resultados preliminares. En: XVIII Jornadas de la SEOC. España.
13. **Gonzales H. 2008.** Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia* 10: 223-234.
14. **Jeyendran R, Van Der Ven H, Perez-Pelaes M, Crabo B, Zaneveld L. 1984.** Development of an assay to asses the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fert* 70: 219-228.
15. **McEvoy T, Kyle C, Slater D, Adam C, Bourke D. 1992.** Collection, evaluation and cryopreservation of llama semen. *J Reprod Fert* 9: 48 (Abstr).
16. **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 Fert Dev* 19: 792-796.
17. **Parrilla I, Vazquez JM, Cuello C, Gil MA, Roca J, Di Berardino D, Martínez EA. 2004.** Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction* 128: 615-621.
 18. **Ratto M, Wolter M, Gómez C, Berland M. 1999.** Refrigeration of epididymal sperm from lama with three different extenders. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.
 19. **Rodríguez C. 2009.** Efecto del plasma seminal sobre la supervivencia de espermatozoides criopreservados de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis Mag. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ Nacional Mayor de San Marcos. 72 p.
 20. **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.
 21. **Santiani A, Sandoval R, Ruiz L, Coronado L. 2004.** Estudio de la integridad de membrana en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hipoosmótico. En: XXVII Reunión APPA. Piura: Asociación Peruana de Producción Animal.
 22. **Sumar J, Leyva C. 1981.** Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*Lama pacos*). En: IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Punta Arenas-Chile.
 23. **Tittarelli C, Savignone C, Arnaudín E, Stornelli M, Stornelli M, de la Sota R. 2006.** Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology* 66: 1637-1640.
 24. **Valdivia M, Ruíz M, Bermudez L, Quinteros S, González A, Manosalva I, Ponce C, Olazabal J, Dávalos R. 1999.** Criopreservación de semen de alpacas. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.
 25. **Valdivia M, Suyo M, Manosalva I, Ruiz M, Romero S, Olazabal J. 2000.** Cryopreservation and immunoreactivity of proacrosin/acrosin system in alpaca spermatozoa. *Biol Reprod* 62 (Suppl 1): 146-157.
 26. **Von Baer L, Hellemann C. 1999.** Cryopreservation of llamas (*Lama glama*) semen. *Reprod Domest Anim* 34: 95-96.
 27. **Way A, Griel L, Killiam G. 2000.** Effects of accessory sex gland fluid on viability, capacitation, and the acrosome reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J Androl* 21: 213-219.