

Viabilidad *in vitro* e *in vivo* de los espermatozoides congelados/descongelados del conducto deferente de alpacas (*Vicugna pacos*)

Viability *in vitro* and *in vivo* of sperm frozen/thawed from alpaca (*Vicugna pacos*) vas deferens

¹ Manuel Guido Pérez Durand, ² Juan Pompeyo Zevallos Aragón, ³ Uri Harold Perez Guerra

Laboratorio de Reproducción Animal¹, Centro de Investigación y Producción de Chuquibambilla², Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción³, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.
Correspondencia: guidpe@yahoo.es.

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Artículo recibido 01-02-2016
Artículo aceptado 30-05-2016
Online: 25-06-2016

PALABRAS CLAVES:

Alpaca, conducto
deferente
espermatozoide
congelación
inseminación
gestación

ARTICLE INFO

Article received 01-02-2016
Article accepted 30-05-2016
Online: 25-06-2016

KEY WORDS:

Alpaca
vas deferens
sperm, freezing
insemination
gestation

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la viabilidad *in-vitro* e *in-vivo* de los espermatozoides procedente de los conductos deferentes de alpacas. Se utilizaron 2 reproductores como donadores de espermatozoides con desviación del conducto deferente. Los espermatozoides colectados se sometieron a la congelación y descongelación con el dilutor Triladyl®. Durante el procesamiento de los espermatozoides se evaluaron la motilidad y la prueba hipo-osmótica. En la inseminación se evaluó la proporción de gestaciones producidas. Los resultados fueron los siguientes: La motilidad de los espermatozoides para los reproductores 1 y 2 fueron: a los 37°C 65.16 y 63.37% sin diferencia ($P > 0.05$), al enfriamiento (5°C) 52.63 y 48.31% similares ($P > 0.05$) ya la descongelación 24.51 y 33.18% mostraron diferencia ($P < 0.05$). A la prueba hipo-osmótica fueron; a los 37°C 51.55 y 52.98% similares ($P > 0.05$), Al enfriamiento (5°C) 46.67 y 55.93% mostraron diferencia ($P < 0.05$) y a la descongelación 20.06 y 32.18% con diferencia ($P < 0.05$). Las gestaciones fueron: Con espermatozoides frescos diluidos 36.36% (4/11), con espermatozoides descongelados 25.00% (5/20) y con monta 54.54% (6/11), siendo similares ($P > 0.05$). En conclusión los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes soportan el congelamiento y a la inseminación artificial producen gestaciones.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in-vitro* and *in-vivo* viability of sperm from the vas deferens alpacas. 2 males as sperm donors were used to offset the vas deferens. The collected sperm cells were subjected to freezing and thawing with dilutor Triladyl®. During processing of sperm motility and hypo-osmotic test they were evaluated. Insemination in the proportion of pregnancies produced was evaluated. The results were as follows: The sperm motility of males 1 and 2 were: at 37 ° C 65.16 and 63.37% with no difference ($P > 0.05$), cooling (5 ° C) 52.63 and 48.31% similar ($P > 0.05$) and thawing 24.51 and 33.18% showed no difference ($P < 0.05$). The hypo-osmotic test were; at 37 ° C 51.55 and 52.98 similar percentage ($P > 0.05$), and cooling 55.93% 46.67 showed no difference ($P < 0.05$) and thawing 20.06 and 32.18% with difference ($P < 0.05$). Pregnancies were diluted with fresh sperm 36.36% (4/11), with defrosted sperm 25.00% (5/20) and 54.54% mounts (6/11), being similar ($P > 0.05$). In conclusion sperm from the vas deferens withstand freezing and insemination are able to produce pregnancies.

INTRODUCCIÓN

El macho en los camélidos viene a ser el 70% responsable de la reproducción de un rebaño. Hay necesidad de desarrollar un método de colección de semen que pueda ser utilizado en forma fácil y rutinariamente aplicado en las hembras del rebaño a través de la inseminación artificial (IA), evaluar a los futuros reproductores (Brown, 2000). Hasta la actualidad no se logrado generar una técnica adecuada para coleccionar semen de los machos (Gaully y Leidnger, 1996). Finalmente existe una pequeña información sobre la conservación de los espermatozoides, técnicas de congelamiento para espermatozoides en esta especie (Brown, 2000). Como alternativa de generar la tecnología de IA, se tiene la colección de los espermatozoides por plastia de los conductos deferentes en forma temporal y en machos reproductores que se eliminan por vejez en los rebaños. Esta técnica vendría a cubrir parte de las expectativas que se pretende desarrollar la técnica de inseminación artificial en esta especie (Pérez y col., 2014). El objetivo del presente trabajo de investigación fue congelar/descongelar los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes y evaluar la viabilidad *in vitro* e *in vivo*, con la finalidad de establecer la técnica de inseminación artificial en esta especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

El presente trabajo de investigación se llevo a cabo en el Laboratorio de reproducción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano Puno-Perú.

Procesamiento de los espermatozoides

La colección de espermatozoides se realizo de acuerdo a la técnica recomendada por Pérez y col. (2014), ligeras modificaciones, describe en forma breve, se utilizaron 2 machos reproductores como donadores de espermatozoides y solo se utilizaron las muestras que tenían una motilidad 60% o más y una concentración más de 9×10^4 espermatozoides/mm³. Para la dilución se utilizó el dilutor Triladyl®, las muestras de espermatozoides se coleccionaron de la fistula del conducto deferente realizando ligeros masajes, las microgotas de espermatozoides se recogieron con un tips de 5 uL de capacidad adosados a una jeringa de tuberculina y se colocaron dentro los 0.5 mL de dilutor que estaba dentro un tubo graduado y que a la vez estaba protegido en baño de agua a una temperatura de 37°C. Para su evaluación y enfriamiento el tubo con los espermatozoides diluidos se traspasaron a otro recipiente de 200 ml de

capacidad y fueron colocados dentro una refrigeradora a 5°C por espacio de 3 h. Para la congelación se adiciono 0.5 mL de volumen de dilutor que contenía el 14% de glicerol y cada dosis se ajustaron a 20×10^6 de espermatozoides motiles en pajillas de 0.25 mL, se sellaron con polivinilo de cloruro, se mantuvieron a 5°C por espacio de 45 min para su equilibrio. Para la congelación se utilizó el protocolo descrito por Soler *et al.* (2003). La descongelación de las pajillas se realizó a una temperatura de 37°C por espacio de 30 s.

Prueba hipo-osmótica y motilidad

La solución para la prueba hipo-osmótica se preparo de acuerdo a lo descrito por Jeyendran *et al.* (1992). La evaluación de la reacción hipo-osmótica y motilidad de los espermatozoides se realizó a las 0 h (37°C), 5°C y descongelación con ayuda de un microscopio óptico Marca Leica a una magnificación de 400X, se contaron 200 espermatozoides por muestra.

Hembras

Las alpacas hembras para la inseminación fueron en número de 42, con crías en pie y un descanso post-parto de 20 días, las cuales fueron distribuidas 11 para inseminar con espermatozoides diluidos, 20 para semen descongelado y 11 para monta natural.

Inseminación artificial y diagnóstico de gestación

A las hembras se les indujo la ovulación de la siguiente manera: a) el celo de las hembras fueron ratificadas por la presencia del macho vasectomizado b) en estas hembras se les examino el ovario por ecografía para determinar la presencia del folículo pre-ovulatorio (> de 7 mm), c) seguidamente a las hembras se les sometió a copula con el macho vasectomizado, para inducir la ovulación.

La inseminación con espermatozoides descongelados y diluidos frescos se realizo 30 h post inducción de ovulación. La inseminación se realizó por el método de fijación de la cervix por palpación rectal, introduciendo aplicador de vacunos armado con la pajilla que contenía los espermatozoides, depositando en el cuerno ipsilateral del ovario funcional. Para la inseminación los espermatozoides descongelados fueron evaluados teniendo en cuenta que solo las pajillas que tenían una motilidad progresiva subjetiva alrededor del 30% o más se utilizaron para la inseminación (Matsouka *et al.* 2006). Para inseminación con espermatozoides diluidos se calculo en un volumen de 0.25 mL con 10×10^6 de espermatozoides motiles. El grupo control recibió la monta de machos enteros. El diagnostico de gestación, se realizo por ultrasonografía transrectal a

los 28 días post inseminación, utilizando un scanner marca ALOKA con una frecuencia de a 5.0 Mhz.

Estadística

Para evaluar la viabilidad *in vitro* en los espermatozoides, las variables cualitativas como motilidad y prueba hipo osmótica se sometieron a la prueba de student "T" (P<0.05). Para la evaluar la viabilidad *in vivo* a la proporción de gestaciones se aplicó la prueba de Ji-cuadrado de comparación (P<0.05). Los datos cualitativos se transformaron a valores angulares para luego ser sometidos a la prueba de homogeneidad de variancias. Finalmente fueron procesados con el programa SAS 9.12,

utilizando el procedimiento GLM (General linear model) (2002).

RESULTADOS

Prueba de fertilidad *in-vitro* de los espermatozoides del conducto deferente

La Tabla1. Muestra los resultados de las pruebas de fertilidad *in-vitro* en proporción de acuerdo a la motilidad de los espermatozoides recolectados del conducto deferente y la reacción a la prueba hipo-osmótica de los espermatozoides de los reproductores 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Evaluación de la motilidad y prueba hipo-osmótica de los espermatozoides del conducto Deferente (%)

DONADOR	37 ° C		5 ° C		DESCONGELACIÓN	
	Motilidad	Prueba hiposmotica	Motilidad	Prueba hiposmotica	Motilidad	Prueba hiposmotica
Reprod 1 n=10	65.16±5.66	51.55±9.91	52.63±7.62	46.67±6.54 ^b	24.51±5.10 ^b	20.06±4.56 ^b
Reprod 2 n=10	63.37±3.95	52.98±7.63	48.31±3.18	55.93±5.77 ^a	33.18±7.50 ^a	32.18±5.95 ^a

A las 0 h cuando los espermatozoides recién fueron recuperados del conducto deferente en el dilutor a una temperatura de 37°C, la motilidad promedio de los espermatozoides para el reproductor 1 fue de 65.16% y para el reproductor 2 de 63.37%, que estas medias sometidos a la prueba de "T" no difirieron (P>0.05).

Mientras que para la prueba hipo-osmótica el promedio de reacción de los espermatozoides para el reproductor 1 fue de 51.55% y para el reproductor 2 fue 52.98% que estadísticamente no difieren estos promedios a la prueba de "T" (P>0.05).

Posterior al enfriamiento gradual por 3 horas, hasta 5°C el porcentaje de motilidad de los espermatozoides en el reproductor 1 fue de 52.63% y el reproductor 48.31% de motilidad de los espermatozoides, que ambos promedios no muestran diferencia a la prueba de "T" (P>0.05). En cuanto la reacción de los espermatozoides a la prueba hipo-osmótica en el reproductor 1 fue de 46.67% y el promedio de reacción de los espermatozoides para reproductor 2 fue de 55.93% siendo esta reacción superior frente a los espermatozoides del reproductor 1 a la prueba de "T" (P<0.05).

Cuando los espermatozoides del conducto deferente fueron sometidos a un protocolo de congelación/descongelación, la sobrevivencia de los espermatozoides medidos en motilidad total, se observo que en el reproductor 1 fue de 24.51% y en el reproductor 2 de 33.18%, que estadísticamente el promedio de la motilidad del reproductor 2 fue superior a la motilidad del reproductor 1 (P<0.05). Al realizar la prueba hipo-osmótica a la descongelación de los espermatozoides existe diferencia entre los espermatozoides que reaccionaron, siendo el promedio de los espermatozoides del reproductor 2 con el 32.18% y superior a la reacción de los espermatozoides del reproductor 1 que fue del 20.06% a la prueba de "T" (P<0.05).

La evaluación de la motilidad total de los espermatozoides desde los 37°C, pasando por el enfriamiento a los 5°C, hasta la descongelación, describió una curva decreciente para la mortandad de los espermatozoides y la reacción a la prueba hipo-osmótica hasta la descongelación como muestran los gráficos 1 y 2 para los reproductores 1 y 2 respectivamente.

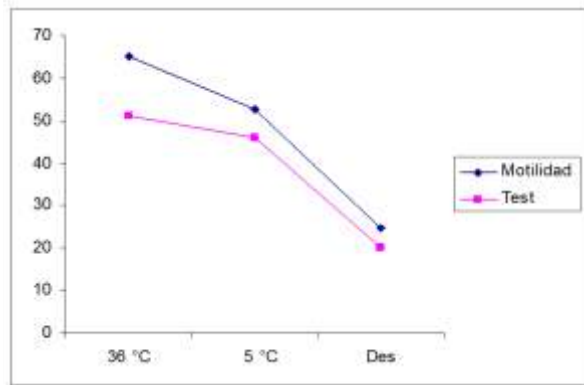


Grafico 1. Porcentaje de motilidad y prueba hipo-osmótica a los 36 °C, 5 °C y Descongelación del reproductor 1.

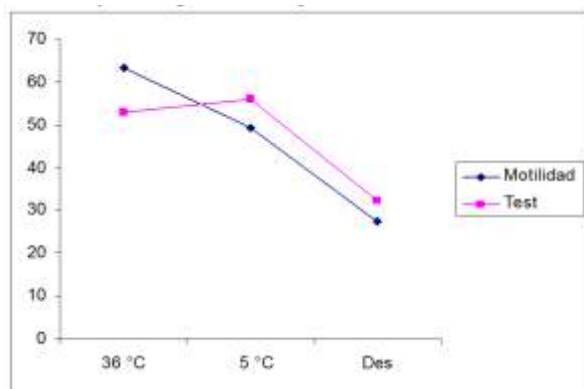


Grafico 2. Porcentaje de motilidad y prueba hipo-osmótica a los 36 °C, 5 °C y Descongelación del reproductor 2.

Tabla 2. Hembras gestantes en los diferentes grupos.

Prueba de fertilidad *in-vivo* de los espermatozoides del conducto deferente

En la **Tabla 2**, se muestran los resultados de gestación en los diferentes grupos: Grupo 1 de monta natural (grupo testigo), resultaron 6 hembras gestantes de 11 copuladas con macho entero. En el grupo 2 de inseminación con espermatozoides frescos diluidos resultaron 4 hembras gestantes de 11 inseminadas. Mientras que en grupo 3 de inseminación con semen congelado resultaron 5 gestantes de 20 hembras, resultados comprobados a la ultrasonografía.

(% de gestación)	
Monta natural	54.54 (6/11)
I.A. con espermatozoides diluido fresco	36.36 (4/11)
I.A. con espermatozoides descongelados	25.00 (5/20)

I.A.= Inseminación artificial

El porcentaje de gestación del 54.45% para el grupo de monta natural, 36.36% para el grupo inseminación con espermatozoides diluidos y el 25.0% para el grupo de inseminación con espermatozoides congelados, fueron sometidos a la prueba de Ji-cuadrado de comparación, en donde no mostraron diferencia de gestación entre los grupos ($P>0.05$).

DISCUSIÓN

Prueba de fertilidad *in-vitro* de los espermatozoides del conducto deferente

Los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de las alpacas, en su totalidad proceden del epidídimo. Las funciones del epidídimo son transporte, almacenaje y maduración de espermatozoides, a través de proteínas de bajo peso molecular y enzimas que protegen a los espermatozoides de efectos tóxicos, químicos y stress oxidativo, pero también solutos orgánicos e iones que se encuentran dentro el fluido que tienen el rol de proteger a los espermatozoides (Acott *et al.* 1983). Durante el procesamiento de semen los espermatozoides necesitan protección contra los estreses de la congelación, shock frio, shock caliente, formación de núcleos de hielo, acción de los crioprotectores, stress osmótico, toxicidad de los solutos, para evitar el daño en su integridad del espermatozoide y posterior función (Holt and North 1994; Watson 1995).

En el presente estudio los espermatozoides procedente de los conductos deferentes soportaron el estrés de la congelación/descongelación y posterior a la descongelación se obtuvo un índice de recuperación de espermatozoides en el reproductor 1 el 24.51% y en el reproductor 2 el 33.18% (Tabla 1) de espermatozoides motiles, esta prueba de recuperación de la motilidad posterior a la descongelación es utilizada para predecir la fertilidad futura del semen congelado/descongelado en otros rumiantes como el vacuno, ovino, caprino entre otras especies donde la tecnología de inseminación artificial se utiliza como indican Foote (1970a), Foote (1970b), Foote (1972), Chen *et al.* (1993), Rodríguez *y col.* (1993) y recomiendan que motilidad a la descongelación en vacunos y ovinos deben ser del 45 al 60% para lograr gestaciones satisfactorias y estos resultados comparados con el 24.51% y el 33.18% de motilidad para el reproductor 1 y 2 son menores esto debido a que los espermatozoides del conducto deferente están libres del plasma seminal, que juega un rol importante como lo aseveran (Holt and North 1994; Watson 1995).

De la misma forma comparando con material

espermático colectado de los epidídimos de animales post mortem, como es del ovino, vacuno y ciervo ibérico, los investigadores reportan motilidades a la descongelación del 35 al 70% (Kaabi *et al.* 2003; Ehling *et al.* 2006; Herold *et al.* 2004; Martins *et al.* 2007; Garde y col. 1998; Soler *et al.* 2003; Soler *et al.* 2005; Fernandez-Santos *et al.* 2006), estas motilidades totales son superiores, comparados con las motilidades del reproductor 1 de 24.68% y para el reproductor 2 de 27.31%, encontrados en el presente estudio.

Los espermatozoides del conducto deferente al proceso de congelación/descongelación resisten y este hallazgo esta de acorde con los reportes que indican que los espermatozoides del epidídimo soportan el stress de congelación (Holt and North 1994; Watson 1995), debido a que también estos espermatozoides están protegidos por las proteínas y demás componentes que se secretan en el epidídimo y conducto deferente de las alpacas.

La integridad de la membrana de los espermatozoides descongelados rutinariamente es medida para expresar la calidad del semen a través de la motilidad y la morfología. Una prueba para detectar la funcionalidad de membrana es realizar la prueba hipo osmótica, que consiste en exponer al espermatozoide a una solución hipo-osmótica, si la membrana plasmática es funcional y activa esto puede modular la permeabilidad del agua y como equilibrio osmótico produce una hinchazón y retorcimiento de la cola (Montovani *et al.* 2002). Al comparar la reacción hipo-osmótica de espermatozoides de caballos antes de la congelación, es superior los promedios en esta especie de 84.3%, para eyaculaciones de dos reproductores (Montovani *et al.* 2002), comparado a los obtenidos en el presente estudio el 51.55 y 52.98% (Tabla 1) para los reproductores 1 y 2 respectivamente esta diferencia inferior de porcentaje de espermatozoides que reaccionaron a la prueba hipo osmótica es debido probablemente a diferencia entre especies y a la estandarización de procedimientos que se realizan en los laboratorios especializados de reproducción animal.

Además muchos factores como de los crioprotectores afectan la sobrevivencia de los espermatozoides a la descongelación, entre estos se tiene las tasas de enfriamiento y calentamiento, diferentes técnicas de empacamiento, concentración de espermatozoides en las dosis congeladas, donde los parámetros de motilidad individual y motilidad progresiva decrecen a la descongelación (Heitland *et al.* 1996). La integridad de la membrana del espermatozoide puede ser evaluado por diferentes pruebas, tal como

tinciones supravitales o marcadores fluorescentes, pero la prueba hipo-osmótica es una prueba simple y de fácil ejecución (Watson 1995; Neild *et al.* 1999). Jeyendran *et al.* (1992) indica en los espermatozoides del hombre la prueba hipo-osmótica se usa rutinariamente, porque esta prueba detecta exactamente la funcionalidad y la integridad de la membrana del espermatozoide.

En el presente estudio al ejecutarse esta prueba hipo-osmótica en los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes en los diferentes momentos como es a los 36°C, a 5°C y a la descongelación, se observo reacción de los espermatozoides de 51.55 y 52.98% para el reproductor 1 y 2 respectivamente (Tabla 1), estos resultados comparado con los reportados por Montovani *et al.* (2002) 92.5% en caballos a la reciente dilución y a la descongelación 52.8% son superiores. Mientras que a la descongelación el 20.06 y 32.18% para el reproductor 1 y 2 respectivamente (Tabla 1), comparados con el porcentaje del 44.8% espermatozoides descongelados de ovinos (Fukui *et al.* 2004), evaluados en diferentes tiempos de incubación viene siendo superior comparado con los resultados obtenidos en el presente estudio. Esta diferencia superior en estas especies se debe al método de la colección del semen es completo (con plasma), a diferencia que en el presente estudio la colección de espermatozoides del conducto deferente es incompleta, sin la secreción de las glándulas anexas. Como indica Maxwell *et al.* (1997) los beneficios de la adición del plasma seminal preparado a espermatozoides lavados de toros, cerdos y ovinos, mejoran su viabilidad, motilidad e integridad de membrana.

Comparando los resultados obtenidos a la prueba hipo-osmótica a la descongelación de los espermatozoides en el presente trabajo de 32.18% para el reproductor 2 y 20.06% para el reproductor 1, resulta ser inferior frente a los resultados obtenidos en espermatozoides del epidídimo de ciervos cazados y posterior congelación en el mismo tipo de dilutor (Triladyl), los autores a la descongelación y a la prueba hipo-osmótica reportaron porcentajes del 44.1 al 62.7% (Garde y col. 1998; Soler *et al.* 2003), esta superioridad se debe a que estos autores señalan que las muestras iniciales de motilidad estuvieron por encima del 90%, coincidiendo que en todo el protocolo de congelación/descongelación adecuado el 50% de espermatozoides mueren producto del stress de la congelación/descongelación. Mientras que en el presente estudio la proporción de espermatozoides que murieron durante el presente protocolo de congelación fue del 45%, porcentaje

aceptado cuando se evalúa muestras de espermatozoides congelados en laboratorio.

Prueba de fertilidad *in-vivo* de los espermatozoides del conducto deferente

La **Tabla 2**, muestra el porcentaje de gestación de las hembras en los diferentes grupos, a los 28 días post inseminación: Con espermatozoides congelados/descongelados el porcentaje de gestación fue de 25.0%, en el grupo con espermatozoides diluidos frescos fue el 36.36% y en el grupo control de monta natural fue el 54.54% de gestaciones respectivamente, donde al examen de ecografía se observó la vesícula embrionaria en casos de gestación como indica Bourke *et al.* (1992), que en una gestación temprana en camélidos, deben existir cambios de eco textura con áreas no eco génicas que se encuentran en las cavidades llenos de líquido, detectable en gestaciones de 19 a 28 días en llamas.

Un reporte de inseminación artificial con semen congelado, donde las muestras de semen fueron obtenido por vagina lograron el 66.11% al diagnóstico de gestación por ultrasonografía a los 21 días post inseminación (Pérez 1996). Comparado los porcentajes de gestación logrados en el presente estudio fueron inferiores. Este resultado inferior de gestación indicaría que los espermatozoides procedentes del conducto deferente es exento de las secreciones de las glándulas anexas, que sometidos a un manejo con la adición de dilutores y conservación sufren mayor daño que cuando están protegidos con el plasma completo.

Mientras que comparado los porcentajes de gestación obtenidos en el presente estudio, con otros trabajos de inseminación artificial con semen congelado, procedente de colecciones de muestras por vagina artificial, en dosis de 0.25 o 0.5 mL con un cantidad variable de 3 a 7 millones de espermatozoides motiles a la descongelación, reportaron gestaciones en los primeros 30 y 60 días pos inseminación del 7 al 37% (Pérez 1996; Apaza *et al.* 1999; Bravo *et al.* 2000; Aller *y col.* 2003), estos resultados fueron similares a los encontrados en el presente estudio, esta similitud estaría dado porque los diferentes autores indican haber inducido la ovulación farmacológicamente aplicando hormonas de liberación fijando así el tiempo de ovulación para la inseminación artificial a tiempo fijo a las 30 h post aplicación. En forma similar en el presente estudio la inseminación artificial se realizó 30 h post inducción de ovulación con macho vasectomizado.

En el presente estudio se afirma que los espermatozoides procesados del conducto deferente tienen la capacidad de fecundar como se demuestra en

los porcentajes de gestación de 36.36 y 25.0 % (Tabla 2) para los espermatozoides diluidos frescos y descongelados, sumándose a la literatura que los espermatozoides de alpacas exento del plasma seminal tiene la capacidad de fecundar y estos resultados del presente estudio están soportado por estudios de Garde *y col.* (1998) en trabajos de espermatozoides del epidídimo congelado/descongelado de ciervos, donde evaluaron su capacidad fecundante inseminando 17 hembras de ciervo ibérico a las que indujeron y sincronizaron la ovulación mediante la aplicación de dispositivos intravaginales simultáneamente 2 CIDR e inyectando 300 UI de eCG al momento de la retirada de los dispositivos, las hembras sincronizadas fueron inseminadas con muestras de espermatozoides de alta calidad y procesado con el dilutor comercial Triladyl y en horarios a las 44 y 66 horas de la retirada de los dispositivos, los resultados de la capacidad fecundante de los espermatozoides congelados de los epidídimos, evaluaron al momento de la parición del 23.5 % de hembras inseminadas.

En conclusión los espermatozoides del conducto deferente sobreviven al proceso de congelación/descongelación y utilizados a través de la inseminación artificial tienen la capacidad de fertilizar produciendo gestaciones. Se recomienda estudiar sobre los dilutores específicos para preservación de los espermatozoides en esta especie.

Agradecimiento

Los autores agradecen al apoyo de los estudiantes que realizan sus prácticas pre-profesionales en el Laboratorio de reproducción de la FMVZ. El trabajo fue financiado parcialmente por la Universidad Nacional del Altiplano en la compra de algunos reactivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acott T.S, Katz D.F., Hoskins D.D. 1983. Movement characteristics of bovine epididymal: Effects of forward motility protein and epididymal maturation. *Biol Reprod* 29, 389-399.
- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la multilidad, viabilidad y Fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). *ArchZootec* 52, 15-23.
- Apaza N., Alarcón V., Huanca T., Cardenas O. 1999. Avances sobre la inseminación artificial con semen congelado en alpacas. II Congreso Mundial sobre camélidos, Cusco, Perú, p 73-76.
- Bravo P.W., Skidmore J.A., Zhao X.X. 2000. Reproductive aspects and storage of semen in

- camelidae. *Anim Reprod Sci* 62, 173-193.
- Bourke D.A., Adam C.L., Kyle C.E. 1992. Ultrasonography as an aid to controlled breeding in the llama (*Lama glama*). *Veterinary Record* 130,424-428.
- Brown, B.W. 2000. A review on reproduction in south american camelids. *Anim. Reprod. Sci.*, 58: 169-195.
- Chen, Y., R.H. Foote, C. Tobback, L. Zhang, S.Hough. 1993. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates en egg yolk-Tris and whole milk extenders. *J. Dairy Sci.*, 76: 1028-1034.
- Ehling C., Rath D., Struckmann C., Frenzel A., Schindler L., Niemann H. 2006. Utilization of frozen-tawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scarpie susceptible breeders. *Theriogenology* 66, 2160-2164.
- Fernandez-Santos M.R., Estes M.C., Montoro V., Soler A.J., Garde J.J. 2006. Cryopreservation of Iberian (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology* 66, 1931-1942.
- Foote R.H. 1970a. Fertility of bull semen at high extension rates in tris-buffered extenders. *J Dairy Sci* 10, 1475-1477.
- Foote R.H. 1970b. Influence of extender, extension rate, and glycerolation technique on fertility of frozen bull semen. *J Dairy Sci* 10, 1478-1482.
- Foote R.H. 1972. Tris and organic buffers for the conservation of semen of various species. *Animal Reproduction and Artificial insemination*. Edizioni Agricole, Bologna pp 99-105.
- Fukui Y., Togawa M., Abe N., Takano Y., Asada M., Okada A., Iida K., Ishikawa H., Ohsumi S. 2004. Validation of the sperm quality analyzer and the hypo-osmotic swelling test for frozen-thawed ram and monkey whale (*Balaenoptera bonarensis*) spermatozoa. *J Reprod Dev* 50, 147-154.
- Gauly, M., Leidinger H. 1996. Semen quality, characteristic volume distribution and hypo-osmotic sensitive of spermatozoa of Lama glama and Lama guanicoe. *Proc 2nd European Symposium on South American camelids* (Gerken M, Renieri C, eds). *Publ Universita Degli Studi Di Camerino*. p 235-244.
- Garde, J.J., N. Ortiz, A.J. Garcia, A. Lopez, L. Gallego. 1998. Criopreservación postmortem de material espermático e inseminación artificial en el ciervo Iberico. *Arch. Zootec.* 47, 351-356.
- Herold F.C., Aurich J.E., Gerber D. 2004. Epididymal sperm from the African buffalo (*Syncertus caffer*) can be frozen successfully with AndroMed and Triladyl but the addition of bovine seminal plasma is detrimental. *Theriogenology* 61, 715-724.
- Heitland A.V., JAsko D.J., Squires E.L., Gram. J.K., Pickett B.W., Hamilton C. 1996. Factors affecting motion characteristic of frozen-tawed stallion spermatozoa. *Equine Vet J* 28, 47-53.
- Holt, W.V., R.D. North. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 51, 414-424.
- Jeyendran R.S., Van der Venn H.H., Zaneveled L.J.D. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. *Ach Androl* 29, 105-116.
- Kaabi M., Paz P., Alvarez M., Anel E., Boixio J.C., Roussi H., Herrez P., Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60, 1249-1259.
- Martins C.F., Rumpf R., Pereira D.C., Dode M.N. 2007. Criopreservación de epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Anim Reprod Sci* 101, 326-331.
- Matsuoka, T., H. Imai, H. Kohno, Y. Fukui. 2006. Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-tawed ram semen. *J. Reprod. Dev.*, 52: 675-683.
- Maxwell, W.M.C, G.R. Welch, L.A. Johnson. 1997. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertl. Dev.*, 8: 1165-78.
- Montovani R., Rota A., Falomo M.E., Bailoni L., Vincenti L. 2002. Comparison between glycerol and ethylene glycol for cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with hypoosmotic swelling test. *Reprod Nutr Dev* 42, 217-226.
- Neild D., Chaves G., Flores M., Mora N., Beconi M., Aguero A. 1999. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51, 721-727.
- Pérez M.G. 1996. Avances de la congelación de semen de alpacas y tasa de gestación. I Congreso Mundial sobre Camélidos, Cajamarca-Perú, p 29-32.
- Perez, M.G., J. Zevallos, U.H. Perez. 2014. Recuperación de los espermatozoides de alpacas del conducto deferente durante la época reproductiva. *Spermova*, 4(2): 139-144.

- Rodríguez, F., J.N. Stellflug, J.A. Fitzgerald. 1993. Inseminación artificial intrauterina por laparoscopia de semen ovino congelado en un diluyente a base del gel de la planta aloe vera. *Latinoam. Prod. Anim.*, 1(1), 9-15.
- Soler, A.J., A.J. Garcia, M.R. Fernandez-Santos, M.C. Estes, J.J. Garde. 2003. Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of Red Deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *J. Androl.*, 24: 5, 746-756.
- Soler A.J., Estes M.C., Fernandez-Santos M.R., Garde J.J. 2005. Characteristics of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa cryopreserved after storage at 5°C in the epididymes for several days. *Theriogenology* 64, 1503-1517.
- SAS/STAT(2002) "User's Guide". SAS institute Inc., Cary, NC., USA. Version 9.12. Fourth Edition. Volume 2.
- Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, 7: 871-891.