

INFLUENCIA DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE LA MOTILIDAD, VIABILIDAD Y FERTILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE LLAMA (*LAMA GLAMA*)

INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION ON THE MOTILITY, VIABILITY AND FERTILITY OF LLAMA (*LAMA GLAMA*) SPERMATOZOA

Aller, J.F.¹, G.E. Rebuffi², A.K. Cancino² y R.H. Alberio^{1,3}

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - EEA Balcarce. C.C. 276 (7620) Balcarce. Argentina.

²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria - CEA Abra Pampa. C.C. 9 (4640) Jujuy. Argentina.

³Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Camélidos sudamericanos. Criopreservación de semen. Inseminación artificial.

ADDITIONAL KEYWORDS

South American camelids. Cryopreservation of semen. Artificial insemination.

RESUMEN

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar el efecto de la criopreservación sobre la motilidad y viabilidad de espermatozoides de llama y obtener gestaciones por medio de la inseminación artificial (IA) con semen congelado en hembras nacidas y adaptadas a la región de la Puna argentina. El trabajo se llevó a cabo en el Campo Experimental de Altura (CEA) del INTA de Abra Pampa (Provincia de Jujuy, Argentina) ubicado a una altitud de 3484 metros sobre el nivel del mar. Los parámetros espermáticos evaluados en el semen fresco y congelado/descongelado fueron la motilidad, viabilidad y fertilidad mediante un test de IA a campo. El porcentaje promedio (\pm d.e.) de espermatozoides móviles y viables disminuyó significativamente ($p < 0,05$) de 54, $3 \pm 10,5$ y $68,5 \pm 12,3$ p.100 en muestras de semen fresco a $20,4 \pm 7,5$ y $32,4 \pm 10,5$ p.100, respectivamente, en muestras congeladas/descongeladas. Un total de 38 hembras fueron tratadas con GnRH para inducir ovulación, sin previa observación ecográfica de la presencia

de un folículo ovárico. La IA con semen congelado se realizó 24 horas después de la inducción de la ovulación. Las hembras de un grupo control ($n=23$) fueron inseminadas con semen fresco diluido. La tasa de gestación obtenida por IA con semen fresco (21,7 p.100) fue significativamente más alta ($p < 0,14$) que la obtenida con semen congelado (7,9 p.100). Tres hembras resultaron preñadas por IA con semen congelado y esta es la primera comunicación en la Argentina. Se concluye que la criopreservación disminuye la calidad seminal llevando a una baja tasa de preñez.

SUMMARY

The objectives of the present work were to evaluate the effect of cryopreservation on the motility and viability llama spermatozoa and to obtain gestations by means of artificial insemination (AI) with frozen semen in females

Arch. Zootec. 52: 15-23. 2003.

born and adapted at the argentinean Puna. This work was carried out at the Experimental Field of Altitude (INTA Abra Pampa, Argentina), which is located at 3484 m above sea level. Motility, viability and fertility by means of AI field test were evaluated on fresh and frozen/thawed semen. The average percentage (\pm s.d.) of motile and viable spermatozoa declined significantly ($p < 0.05$) from 54.3 ± 10.5 y 68.5 ± 12.3 p.100 in fresh samples to 20.4 ± 7.5 y 32.4 ± 10.5 p.100, respectively, in frozen-thawed samples. A total of 38 females were treated with GnRH to induce ovulation, without previous ovarian ultrasonography. The AI with frozen semen was carried out 24 h after ovulation induction. Twenty three females (control group) were artificially inseminated with diluted fresh semen. The pregnancy rate obtained by means AI with fresh semen (21.7 p.100) was significantly higher ($p < 0.14$) than the pregnancy rate with frozen semen (7.9 p.100). Three females inseminated with frozen semen became pregnant and this is the first communication in Argentina. It is concluded that the cryopreservation decrease the seminal quality and therefore decrease the pregnancy rate.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva ampliamente utilizada en diversas especies domésticas, por la cual el semen previamente procesado es depositado por el hombre en el aparato reproductor de la hembra en el momento oportuno. Escasos trabajos de IA han sido publicados hasta el presente en camélidos sudamericanos, debido quizás a la falta de una metodología fiable de recolección de semen y a las características seminales de alta viscosidad, baja motilidad y baja concentración espermática (Fowler, 1989). Diversos métodos han

sido utilizados para la recolección de semen en camélidos sudamericanos, tales como fundas vaginales (Mogrovejo, 1952), electroeyaculación (Fernández-Baca y Calderón, 1966) y vagina artificial con un maniquí (Sumar, 1991). De todas las metodologías, la vagina artificial es la técnica más utilizada en el presente (Garnica *et al.*, 1993) favorecida por la utilización de hembras naturalmente receptivas (Aller *et al.*, 1997a). A pesar que los primeros informes de IA provienen de la década del 60 (Fernández-Baca y Novoa, 1968), la técnica no ha sido suficientemente desarrollada hasta el presente como para ser utilizada a mayor escala, pero algunos ensayos con semen fresco han demostrado obtener una aceptable tasa de gestación (De la Vega y Pérez, 1996; Aller *et al.*, 1997b; Bravo *et al.*, 1997; 1999).

Trabajos previos demostraron que la motilidad espermática varió de 10 a 30 p.100 después de la descongelación (McEvoy *et al.*, 1992; Valdivia *et al.*, 1999; Burgel *et al.*, 1999). En cambio, muy poca información se encuentra disponible sobre inseminación artificial a campo con semen congelado (Bravo *et al.*, 1996). En este ensayo se obtuvo un 26,3 p.100 de gestación.

Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron evaluar los efectos de la congelación sobre la motilidad y viabilidad espermática y obtener gestaciones por medio de la inseminación artificial con semen congelado en llamas nacidas y adaptadas a las condiciones climáticas y nutricionales del altiplano argentino, zona donde tradicionalmente se cría esta especie que representa una de las fuentes de carne, cuero y fibra para la industria local.

MATERIAL Y MÉTODOS

LUGAR DE TRABAJO

El ensayo se realizó en febrero y marzo de 2001 en el Campo Experimental de Altura (CEA) del INTA de Abra Pampa (Provincia de Jujuy, Argentina) ubicado en el departamento de Cochino (22° 49' latitud sur y 65° 47' longitud oeste) a una altitud de 3484 metros sobre el nivel del mar. Esta región presenta un régimen de lluvia de 300-350 mm anuales en la temporada estival y el resto del año no se registran precipitaciones. Las temperaturas varían entre -20°C y 14°C en invierno y entre 5°C y 30°C en verano. El pasto natural está representado principalmente por la chillahua (*Festuca scirpifolia*), totorilla (*Juncus balticus*), pasto vicuña (*Deyeuxia nardifolia*), grama puneña (*Distichlis humilis*) y achicoria (*Hipochoeris sp.*), entre otras.

SELECCIÓN DE MACHOS (PERÍODO PRE-EXPERIMENTAL)

Diez machos adultos (5 a 8 años de edad) fueron adiestrados para la recolección de semen durante 15 días. De estos, seis animales demostraron alta libido y aceptaron la vagina artificial. Durante otro período de 15 días, a estos seis machos se les realizó recolección de semen con una frecuencia de 3 veces/semana hasta seleccionar los machos que presentaron características seminales mínimas (75 millones de espermatozoides/ml y 50 p.100 de motilidad individual) en dos eyaculados consecutivos. Se seleccionaron un total de cuatro machos donantes de semen. Para la recolección de semen se utilizó una vagina artificial

con bolsa de polietileno en su interior (Aller *et al.*, 1997a) a una temperatura interna de 38°C y una hembra naturalmente receptiva para la estimulación del macho.

RECOLECCIÓN Y EVALUACIÓN MICROSCÓPICA DEL SEMEN (PERÍODO EXPERIMENTAL)

La recolección de semen se llevó a cabo con una frecuencia de 2 veces/semana, en cada uno de los cuatro machos, durante los dos meses del período experimental. De cada eyaculado se determinó el volumen, pH, motilidad individual y concentración espermática, dentro de los 15 minutos posteriores a la recolección. El volumen fue directamente medido al pasar el eyaculado a un tubo graduado y la motilidad individual fue estimada subjetivamente (p.100) al colocar 10 microlitros de semen sin diluir entre porta y cubreobjeto sobre una platina térmica precalentada a 37°C. La muestra fue observada a 400x. El pH fue determinado utilizando tiras de papel con un rango de $\pm 0,5$. La concentración espermática fue evaluada utilizando el hemocitómetro de Neubauer. La viabilidad espermática (vivos/totales) fue medida por la técnica de coloración de eosina-nigrosina (coloración vital). Una gota de 30 microlitros de semen fue mezclada con 30 microlitros del colorante sobre un portaobjetos precalentado a 37°C y luego de 45 segundos se realizó el frotis y se secó rápidamente por calor. La muestra fue fijada, etiquetada y almacenada hasta su posterior lectura. Entre 100 y 200 espermatozoides fueron contados en cada preparación. Los espermatozoides que absorbieron el colorante fueron considerados muertos al mo-

mento de la coloración y el resultado fue expresado como porcentaje.

CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

Sólo los eyaculados conteniendo una concentración mínima de 75 millones de espermatozoides/ml con al menos 50 p.100 de motilidad individual fueron utilizados para la criopreservación. El diluyente utilizado fue yema de huevo-citrato-glucosa-glicerol-DMSO y antibióticos (**tabla I**). La porción tamponada contenía 2,92 g de citrato de sodio en 100 ml de agua bidestilada estéril. El buffer y la yema de huevo fresco fueron combinados para obtener una relación 85:15. El diluyente básico fue dividido en dos fracciones. La fracción A sin glicerol ni DMSO y la fracción B contenía dos veces la concentración final deseada de glicerol (6 p.100) y DMSO (8 p.100).

La dilución apropiada para cada muestra de semen fue calculada para producir una concentración de 50 millones de espermatozoides/ml. Cada muestra de semen fue diluída con la fracción A (sin crioprotectores) a 35°C hasta la mitad del volumen final calculado y enfriada hasta 5°C a una tasa de 0,25-0,50°C/minuto y luego la fracción B fue adicionada en dos pasos con 15 minutos de intervalo. El semen diluído fue equilibrado durante 45 minutos a 5°C en un refrigerador y posteriormente fue aspirado en pajuelas francesas de 0,50 ml, conteniendo aproximadamente 25 millones de espermatozoides totales por pajuela. Las pajuelas fueron selladas con polvo PVC y congeladas en vapores de nitrógeno líquido, a una tasa de 11°C/min (desde 5°C hasta -50°C), 6 °C/min (desde -50°C hasta -80°C) y 8°C/min (desde -80°C hasta -

Tabla I. Composición del diluyente utilizado para criopreservación de semen de llama. (Composition of diluter used to cryopreservation of llama semen).

Fracción	A	B
Citrato sódico (2,92 p.100), ml	8,50	5,70
Yema de huevo, ml (p.100)	1,50 (15)	1,50 (15)
Glucosa mg	75	75
Penicilina G sódica, UI	10000	10000
Sulfato de estreptomina, mg	10	10
Glicerol (99 p.100), ml (p.100)	- (-)	1,20 (12)
DMSO (dimetilsulfóxido), ml (p.100)	-	1,60 (16)

120°C). Para el registro de la temperatura se utilizó un termómetro-termocupla (Barnant 600) con sonda para aire colocada a la misma altura que las pajuelas. Posteriormente las pajuelas fueron inmersas en nitrógeno líquido y almacenadas hasta su utilización. La descongelación se realizó a 35°C durante 30 segundos y la motilidad y viabilidad espermática fueron evaluadas como se describió anteriormente, previamente a la IA.

TEST DE FERTILIDAD A CAMPO (IA)

Treinta y ocho hembras fueron utilizadas para la IA con semen congelado/descongelado. A cada una se inyectó (im) 8 µg de un análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas (Buserelina, *Receptal- Hoechst*) para inducir la ovulación. No se realizó ecografía previa para detectar la presencia de un folículo preovulatorio y todas las hembras fueron inseminadas 24 horas después de la inyección de

CRIOPRESERVACIÓN Y ESPERMATOZOIDES DE LLAMA (*LAMA GLAMA*)

GnRH con el contenido de semen de una pajueta (25 millones de espermatozoides totales), con aproximadamente 20-25 p.100 de espermatozoides móviles estimado después de la descongelación. Las hembras de un grupo control (n= 23) fueron inseminadas con semen fresco, diluído con la fracción A, con una dosis de 25 millones de espermatozoides totales. La técnica de IA utilizada fue la recto-vaginal con deposición seminal intrauterina profunda, con jeringa y vaina de Cassou. El diagnóstico de gestación se realizó por medio de la palpación transrectal 60 días después de la IA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para la comparación de medias se utilizó el test *t* (Student). La transformación \sqrt{x} (x = porcentaje) fue aplicada a las variables que no presentaron distribución normal y luego se realizó un ANOVA (análisis de varianza). Para determinar si la diferencia obtenida entre las tasas de gestación fue estadísticamente diferente de lo que se obtendría por azar, se utilizó el test exacto de Fischer.

RESULTADOS

El tiempo promedio de recolección de semen fue de $18,5 \pm 5,2$ minutos. El aspecto físico del eyaculado fue siempre espumoso. Se intentó la recolección de semen de los cuatro machos en un total de 90 ocasiones. En 14 ocasiones (15,5 p.100) los machos fallaron en demostrar interés sexual en la hembra. En 9 intentos (10 p.100) se obtuvo semen contaminado con orina y en 5 ocasiones (5,5 p.100) se obtuvieron

eyaculados parciales. Ambos tipos de muestras fueron eliminadas.

Los parámetros seminales medidos en el semen fresco y después de la descongelación se muestran en la **Tabla II**. El proceso de congelación/descongelación redujo significativamente ($p < 0,05$) los porcentajes de viabilidad y motilidad espermática comparados con el semen fresco y por lo tanto el número de espermatozoides viables y móviles contenidos en una pajueta. La tasa de supervivencia espermática posdescongelación fue estimada subjetivamente en un 20-25 p.100, por lo tanto, el número de espermatozoides móviles por dosis de IA varió de 4 a 7 millones.

En el test de fertilidad, cinco hembras (5/23= 21,7 p.100) del grupo control se diagnosticaron preñadas por

Tabla II. Evaluación microscópica de semen fresco y criopreservado descongelado a 35°C. (Microscopic evaluation of fresh sperm samples and cryopreserved samples thawed at 35°C).

Variables	Semen	
	fresco	congelado
pH	7,4±0,3	-
volumen (ml)	2,2±1,3	-
motilidad individual*	54, 3±10,5 ^a	20,4±7,5 ^b
viabilidad*	68,5±12,3 ^a	32,4±10,5 ^b
espermatozoides		
- millones/ml	75,2±20,4	-
- móviles/pajueta**	12,5±5,4 ^a	6,5±1,1 ^b
- viables/pajueta**	16,5±3,4 ^a	8,4±3,2 ^b

*p.100; ** millones.

^{ab}Valores con letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($p < 0,05$).

palpación rectal 60 días después de la IA. En cambio, 3 hembras (3/38= 7,9 p.100) inseminadas con semen congelado resultaron preñadas ($p < 0,14$).

DISCUSIÓN

La importancia de criopreservar gametas (ovocitos y espermatozoides) de las especies animales es ampliamente reconocida, pero en particular, la criopreservación del semen presenta una mayor contribución potencial, como, favorecer el comercio internacional de razas o líneas genéticas, formación de bancos de germoplasma, reserva genética, conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción, etc.

Uno de los objetivos de este ensayo fue obtener gestaciones por medio de la IA con semen congelado, sin tener en cuenta la magnitud del resultado. Las mediciones de las características seminales antes y después de la congelación presentaron gran diferencia en sus resultados.

La motilidad es quizás el parámetro más cercano para medir la viabilidad de los espermatozoides. Basados en este supuesto, la observación visual de la motilidad es el criterio más comúnmente utilizado para estimar la viabilidad espermática, pero es un método inexacto, puesto que es subjetivo y depende del observador. Coulter y Foote (1973) informaron en bovinos que la motilidad fue reducida desde 41,5 p.100 previo a la congelación en pajuelas al 28,2 p.100 después de la descongelación y el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales intactos fue también significati-

vamente disminuído por todo el proceso de congelación/descongelación. Valdivia *et al.* (1999) obtuvieron semen fresco de llama con motilidad progresiva de 60 a 90 p.100 y 15 a 20 p.100 posdescongelación. Otros autores, utilizando dos diluyentes diferentes, uno con proteína animal y otro con proteína de soja, obtuvieron un mayor porcentaje de mótiles posdescongelación (25 p.100) con el primer diluyente (Burgel *et al.*, 1999). En el informe de McEvoy *et al.* (1992), el semen recogido por electroeyaculación fue congelado en pajuelas después de una dilución en *un paso* (1:2) con diluyente a base de TRIS-yema de huevo-glicerol y sólo el 10 p.100 de los espermatozoides mostraron motilidad posdescongelación. Por otro lado, Graham *et al.* (1978) observaron un 50, 45 y 30 p.100 de espermatozoides mótiles en semen fresco, descongelado inmediatamente y después de 8 días de almacenamiento, respectivamente.

En general, los resultados anteriores son similares a los obtenidos en nuestro trabajo, donde la motilidad espermática fue reducida de 54,3 p.100 en semen fresco a 20,4 p.100 en semen descongelado. Por lo tanto, podría establecerse que son requeridos más espermatozoides por dosis de inseminación para asegurar una óptima fertilidad si el semen ha sido congelado.

Otro problema adicional para el semen congelado/descongelado es la reducida viabilidad espermática en el tracto reproductivo de la hembra, caracterizado por la mitad de la vida media que los espermatozoides no congelados (Lopyrin, 1971; citado por Salamon and Maxwell, 1995; Maxwell and Watson, 1996). Esto coincide con

lo informado por Mattner *et al.* (1969) quienes observaron en ovejas, que los espermatozoides congelados/descongelados sobrevivieron menor tiempo en el tracto reproductivo de la hembra que los espermatozoides no congelados.

Muy poca información se encuentra disponible sobre IA en camélidos sudamericanos. Fernández-Baca y Novoa (1968) realizaron uno de los primeros trabajos en alpaca utilizando semen de vicuña y pacovicuña obteniendo un 2,4 p.100 de gestaciones. En un segundo ensayo de IA interespecífica, se obtuvo 30,8 p.100 de natalidad en alpacas y llamas (Leyva *et al.*, 1977). Recientes investigaciones en alpacas han llevado a obtener un 45 p.100 de gestación después de la IA con semen fresco no diluído (Bravo *et al.*, 1997). Estos autores no informaron ni el volumen ni la concentración espermática utilizada para la IA y el diagnóstico de gestación fue realizado por medio de ultrasonografía 15 días después de la IA. Por lo tanto, este debería ser considerado un trabajo de baja repetibilidad experimental.

En el trabajo de IA realizado por Bravo *et al.* (1996), el semen fue recogido por vagina artificial y se le agregó colagenasa para favorecer su procesamiento. Estos autores utilizaron un criodiluyente a base de citrato de sodio-yema de huevo (10 p.100)-glicerol (7 p.100) en *dos pasos* y observaron que la motilidad oscilatoria de las células espermáticas disminuyó de 80 p.100 en semen recién obtenido a 30-40 p.100 posdescongelación. El porcentaje de gestación obtenido en alpacas inseminadas con este semen fue de 26,3 p.100 (5 preñadas de 19 inseminadas). Pérez (1996) inseminó 18 hembras

alpaca con semen congelado y 6 (33 p.100) resultaron preñadas. La tasa de fertilidad en nuestro trabajo fue menor para las hembras inseminadas con semen congelado (7,9 p.100) con respecto a semen fresco (21,7 p.100). Además, hay que tener en cuenta que no se utilizó ultrasonografía para determinar las hembras que presentaban un folículo preovulatorio al momento de la inyección de GnRH. Por lo tanto, la tasa de gestación sobre hembras fisiológicamente aptas para ovular, seguramente fue bastante más alta. Pero uno de los objetivos secundarios de este ensayo fue realizar la IA a tiempo fijo de todas las hembras disponibles, que seguramente será la forma de aplicación futura en esta especie.

Parte de la explicación para la menor fertilidad del semen congelado con respecto al semen fresco, es que la proporción de células espermáticas con motilidad progresiva es reducida por todo el proceso de enfriamiento, congelación y descongelación. La criopreservación selecciona los espermatozoides viables y destruye al resto, llevando a una menor pero fértil población. Sin embargo, esta no es toda la explicación, ya que a pesar que un gran número de espermatozoides móviles fueron ubicados en el cervix de oveja, la fertilidad fue menor para congelados que para frescos (Maxwell and Hewitt, 1986).

Debido a que el momento de la ovulación es muy variable en relación al momento de aplicación de la GnRH, este factor se transforma en un inconveniente en condiciones extensivas de IA a campo, cuando la ultrasonografía no puede ser utilizada. Aller *et al.* (1997b) obtuvieron un 40 p.100 de

preñez con semen fresco cuando la IA se realizó 24 horas después de la inyección de GnRH. En cambio, De la Vega y Pérez (1996) obtuvieron la mayor tasa de preñez cuando inseminaron a las 30 horas posinducción, pero en este caso, utilizaron un macho vasectomizado para inducir la ovulación. Teóricamente, una forma de salvar esta situación es incluir un mayor número de espermatozoides en la dosis de semen congelado, sobre el supuesto de que esto aumentará el número de espermatozoides que sobrevivirán en el tracto reproductivo de la hembra para producir una alta tasa de concepción. Además, el mejoramiento de los diluyentes y procedimientos de congelación posiblemente disminuirá el daño espermático, de manera tal que una mayor proporción de espermatozoides mantenga por más tiempo su capacidad fertilizante después de la descongelación.

En resumen, el efecto de la criopreservación sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides es un factor que debe ser considerado en protocolos de tecnologías de reproducción asistida. La fertilidad del semen es el factor más importante a tener en cuenta al implementar nuevas

técnicas o procedimientos en programas de IA. Además, factores ambientales y fisiológicos, como estación del año, edad de los animales, raza, nivel nutricional, pueden también alterar las características seminales, como se ha observado en otras especies (Söderquist *et al.*, 1996).

El semen congelado parece ofrecer distintas posibilidades para el avance tecnológico en la explotación de los camélidos sudamericanos, como ha ocurrido con otras especies domésticas. Esta es la primera comunicación de gestaciones obtenidas por medio de la IA con semen congelado en llamas en Argentina, y por lo tanto, una mayor cantidad de ensayos serán necesarios para ajustar los procedimientos y mejorar los índices de eficiencia de la técnica en esta especie.

AGRADECIMIENTOS

Al Agr. René H. Cabrera (CEA INTA Abra Pampa) por su asistencia en los trabajos de campo.

Este trabajo se realizó gracias al subsidio B/2514-2F otorgado por la International Foundation for Science (IFS-Suecia).

BIBLIOGRAFÍA

- Aller, J.F., L. Ferré, G. Rebuffi y R.H. Alberio. 1997a. Recolección de semen de llama (*Lama glama*) en la Puna argentina. *Vet. Arg.*, XIV: 104-107.
- Aller, J.F., L. Ferré, G. Rebuffi y R.H. Alberio. 1997b. Inseminación artificial en llamas (*Lama glama*). *Vet. Arg.*, XIV: 394-400.
- Bravo, P.W., C. Ordoñez and V. Alarcón. 1996. Processing and freezing of semen of alpacas and llamas. 13th Int. Cong. Anim. Reprod., Sydney, vol 2, pp 2-3 (Abstract).
- Bravo, P.W., U. Flores, J. Garnica and C. Ordoñez. 1997. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, 47: 619-626.
- Bravo, P.W., C. Pacheco, G. Quispe, L. Vilcapaza

CRIOPRESERVACIÓN Y ESPERMATOZOIDES DE LLAMA (*LAMA GLAMA*)

- and C. Ordoñez. 1999. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Arch. Androl.*, 43: 239-246.
- Burgel, H., G. Erhardt and M. Gaulty. 1999. Cryopreservation of llama (*Lama glama*) semen. II Congreso Mundial sobre Camélidos, Cusco, Perú, 4-7 Noviembre, pp. 82.
- Coulter, G.H. and R.H. Foote. 1973. Sperm changes during processing in straws. *J. Anim. Sci.*, 37: 306 (abs).
- De la Vega, D. y G. Pérez. 1996. Efecto de la concentración espermática y la hora de inseminación artificial con semen fresco sobre el porcentaje de gestación en alpacas. I Congreso Mundial sobre Camélidos, Cajamarca, Perú, 6-10 octubre, pp. 28.
- Fernández-Baca, S. y W. Calderón. 1966. Métodos de colección de semen de la alpaca. *Rev. Fac. Med. Vet. U.N.M.S. Marcos.*, 18-20: 13-16.
- Fernández-Baca, S. y C. Novoa. 1968. Primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña (*Vicugna vicugna*). *Rev. Fac. Med. Vet. Lima*, Perú, 22: 9-18.
- Fowler, M. 1989. Reproduction. In: Medicine and Surgery of South American Camelids. Fowler M.E. (Ed), Iowa State University Press/Ames. pp. 276-312.
- Garnica, J., R. Achata and P.W. Bravo. 1993. Physical and biochemical characteristic of alpaca semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 32: 85-90.
- Graham, E.F., M.K.L. Schmell, B.K. Eversen and D.S. Nelson. 1978. Semen preservation in nondomestic mammals. *Symp. Zool. Soc.*, London, 43: 153-182.
- Leyva, V., E. Franco y J. Sumar. 1977. Inseminación artificial en camélidos sudamericanos. Mem. I Reunión Científ. Anual de la Asoc. Peruana de Prod. Anim., Lima, Perú.
- Lopyrin, A. 1971. Biology of Reproduction in Sheep (in Russian), *Kolos*, Moscow, 320 pp.
- Mattner, P.E., K.W. Entwistle and C.A. Martin. 1969. Passage survival and fertility of deep-frozen ram semen in the genital tract of the ewe. *Aust. J. Biol. Sci.*, 22: 181-187.
- Maxwell, W.M.C. and L.J. Hewitt. 1986. A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *J. Agric. Sci.*, 106: 191-193.
- Maxwell, W.M.C. and P.F. Watson. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 55-65.
- McEvoy, T.G., C.E. Kyle, P. Young, C.L. Adam and D.A. Bourke. 1992. Aspects of artificial breeding and establishment of pregnancy in South American camelids. Proc. 12th Int. Cong. Anim. Reprod. The Hague, vol 4, 1963-1965.
- Mogrovejo, D. 1952. Estudios del semen de la alpaca. Tesis Bachiller, Fac. Med. Vet. U.N.M.S. Marcos, Lima, Perú.
- Pérez, G. 1996. Avances de la congelación de semen de alpacas y tasas de gestación. I Congreso Mundial sobre Camélidos, Cajamarca, Perú, 6-10 octubre, pp. 29.
- Salamon, S. and W.M.C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.*, 38: 1-36.
- Söderquist, L., L. Janson, M. Haard and S. Einarsson. 1996. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A.I. bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 44: 91-98.
- Sumar, J. 1991. Fisiología de la reproducción del macho y manejo reproductivo. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los Camélidos Sudamericanos. Capítulo IV. S. Fernández-Baca (Ed). FAO, Santiago, Chile, pp. 111-148.
- Valdivia, M., M. Ruiz, L. Bermúdez, S. Quinteros, A. González, I. Manosalva, C. Ponce, J. Olazabal y R. Davalos. 1999. Criopreservación de semen de alpacas. II Congreso Mundial sobre Camélidos, Cusco, Perú, 4-7 noviembre, pp. 81.

Recibido: 19-8-01. Aceptado: 28-6-02.