

Artículo original:

PRESERVACIÓN DE SEMEN Y AVANCES RECIENTES EN LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE LLAMAS Y ALPACAS

Semen preservation and recent advances in artificial insemination of llamas and alpacas

P. W. Bravo (1); y V. Alarcon (2)

(1) Carrera Profesional de Medicina Veterinaria, UNSAAC.

(2) Centro Experimental La Raya, Universidad Nacional San Antonio Abad, Cusco, Perú.

Email:

pwbravo@gmail.com

Palabras Clave:

Camelidos, inseminación, semen

RESUMEN

La preservación de espermatozoides de llamas y alpacas tiene progreso tangible. El dilutor más apropiado parece ser Tris-yema de codorniz. El semen se puede refrigerar una hora antes del proceso de equilibrado con glicerol. El congelamiento se hizo en forma lenta y al descongelamiento 50% de los espermatozoides se observan mótiles. La inseminación artificial (IA) de llamas y alpacas es una tecnología reproductiva emergente. El uso de semen colectado de la vecindad de la os externa de la cervix y después de la cópula ha sido usada en condiciones de campo sin ningún problema. El semen de color rosado o rojizo y mezclado con dilutor Tris con yema de codorniz sin el uso de enzimas ha sido positivo. El semen es diluido y luego de 10 a 15 minutos de reposo y en contacto con el antibiótico es cargado en una pipeta de inseminación, y luego depositado en el cuerpo del útero. Las hembras son inducidas a ovular 24 a 26 horas antes de la inseminación ya sea con macho vasectomizado o con una inyección de LH o con GnRH. Las hembras son inseminadas con 1 mL de semen diluido y que contiene 10 – 12 millones de espermatozoides. El uso de plasma seminal exógeno al tiempo de la IA, ya sea por vía uterina o por vía sistémica mejoró ligeramente la tasa de fertilidad. La IA a tiempo fijo usando previamente progesterona exógena por 5 a 7 días y para sincronizar la presencia de folículos ovulatorios es útil ya que más del 85% de las hembras tratadas presentaron un folículo pre-ovulatorio. La fertilidad a los 21 a 30 días, por la presencia de una vesicular embrionaria y detectada por ecografía, después de una sola siembra de semen arroja un 50% de hembras preñadas. La natalidad es 42 a 50% de hembras inseminadas. El semen colectado por aspiración vaginal luego de la cópula puede ser usado en condiciones de campo sin la presencia de material de laboratorio sofisticado y donde el criador alpaquero quiere usar el macho de su elección.

INTRODUCCION

La preservación de semen es un reto para el desarrollo de la crianza de camélidos sudamericanos. La colección de semen ha progresado del uso de un maniquí (Sumar y Leyva, 1981) a una técnica de colección de la vecindad de la os externa de la cervix (Neely y Bravo 1998). La disponibilidad de semen colectado con un maniquí ha sido instrumental en el conocimiento de la fisiología espermática. Se conoce las principales características seminales, como la motilidad, proporción de espermatozoides vivos y muertos, concentración espermática, morfología de los espermatozoides (Garnica *et al.*, 1993; Bravo *et al.*, 1997a; 1997b). La manipulación de semen es factible usando muchos dilutores, sin embargo el mejor dilutor es en base a Tris combinado con yema de gallina (Bravo *et al.*, 1996). Las características seminales durante el proceso de congelación de semen ha sido reportado recientemente (Bravo *et al.*, 2013), y esta publicación contiene un resumen de las partes importantes de la congelación y el resultado

a la descongelación.

El uso de la IA ha sido instrumental en el gran desarrollo genético de vacas lecheras. La producción de leche aumentó tremendamente por el uso de semen de toros con buenas características lecheras. De igual manera el uso de semen diluido y luego de semen descongelado ha duplicado la producción de leche en países donde las condiciones sanitarias se cumplen y son estrictas. En camélidos sudamericanos, la primera cría obtenida por IA fue el resultado del uso de semen de vicuña en una alpaca hembra. Una cría nació de 42 hembras inseminadas y fue reportado hace más de 40 años. Uno de los problemas serios en llamas y alpacas es la presencia de semen gelatinoso debido a la presencia de una plasma seminal mucoide y producto de las glándulas bulbo-uretrales. Este plasma seminal retiene a los espermatozoides porque la ovulación en la hembra es inducida y ocurre 24 a 26 horas después de la cópula por el macho.

PRESERVACIÓN DE SEMEN

El proceso de congelamiento de semen posee sus etapas inherentes y es semejante al proceso que existe en otros animales de granja. Resumiendo, el proceso de enfriamiento se puede alcanzar en una hora, luego la inclusión de glicerol en una proporción de 7% parece apropiada para llamas y alpacas. La adición del glicerol se hace en forma seriada y usando una tercera parte del dilutor con glicerol cada 15 minutos, luego se deja por una hora para el proceso de equilibramiento. El proceso de empajillamiento ha sido posible en pajillas de 0.25 y 0.5 mL. La congelación de semen que es satisfactoria es en forma lenta y bajando 1 cm por minuto en vapores de nitrógeno líquido hasta que las pajillas se sumergen en nitrógeno líquido. Al descongelamiento existe aproximadamente un 50% de espermatozoides que pierden su motilidad y constituye un reto en el proceso de descongelamiento que se viene investigando.

NUEVO MÉTODO DE COLECCIÓN DE SEMEN.

La colección de semen en llamas y alpacas ha pasado por varios métodos conforme han avanzado los años. Primeramente se reportó el uso de condones, luego la electroeyaculación, la fistula uretral, vagina artificial, y ahora último la aspiración de semen del fondo vaginal. Todos estos métodos tienen sus ventajas y desventajas, sin embargo el deseo del criador por conocer la calidad de semen de los machos que cría ha motivado el desarrollo de esta última técnica. Observación cuidadosa de la presencia de un líquido sanguinolento que sale por la vulva de la hembra y después de la cópula, y su posterior examinación con el microscopio arrojó la presencia de espermatozoides. Una observación más detallada acerca de los movimientos que el macho realiza durante la cópula y el reposicionamiento del pene en los dos cuernos uterinos de la hembra acompañado de la eyaculación continua han sido invalorable en este nuevo método de colección de semen. Además la observación de semen de carácter gelatinoso, comúnmente llamado viscoso y en la vecindad de la os externa de la cervix ha acelerado el uso de este tipo de colección en condiciones de campo, y sin la necesidad de material de laboratorio sofisticado.

Las características seminales usando el nuevo método de aspiración vaginal y semen colectado con vagina artificial de los mismos machos se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características de semen de alpacas (n = 5 machos) de eyaculados colectados por aspiración vaginal (n=41), y con vagina artificial (n = 38)

Características	Aspiración vaginal	Vagina artificial
Volumen (mL.)	3.6 ± 1.3 ^a	1.5 ± 0.9 ^b
Motilidad (%)	73.5 ± 7.9 ^a	69.0 ± 14.4 ^b
Concentración espermática (10 ⁶ /mL.)	75.20 ± 20.34 ^a	80.34 ± 25.56 ^b
Espermatozoides vivos (%)	75.3 ± 7.2 ^a	70.8 ± 12.7 ^b
Consistencia (%)		
- Viscoso	10	90
- Ligeramente viscoso	90	10
Color (%)		
- Rojizo	80	0
- Rojo oscuro	10	0
- Lechoso	5	60
- Blanco	5	40

a,b Diferencia entre métodos de colección (p<0.05)

Dilución de semen: Existen muchos dilutores de semen que han sido usados en llamas y alpacas; sin embargo, solamente algunos han tenido éxito. Los dilutores basados en Tris parecen ser los mejores. Tris con 20% de yema de gallina mantuvo 73% de espermatozoides móviles en la alpaca y 45% en la llama a las 2 horas de incubación a 37 °C. Uno de las mejoras en el uso de dilutores ha sido el reemplazo de yema de huevo de gallina por yema de huevo de codorniz. La ventaja es que los glóbulos de grasa son mas pequeños, además que la mezcla con el semen es más rápida que con yema de huevo de gallina. No existe necesidad del uso de enzimas como colagenasa para eliminar la matriz del plasma seminal ya que el semen está mezclado con plasma sanguíneo de la hembra. En la experiencia del autor el uso de yema de huevo de codorniz no representa daño alguno a los espermatozoides.

Inseminación artificial: Uno de los primeros pasos en la IA de camélidos es la inducción de la ovulación de las hembras a inseminarse. Dos métodos de inducción de ovulación han sido examinados, primero, la administración de una hormona con acción luteinizante y segundo la monta son macho vasectomizado. En el primer caso, las hembras con chequeadas con macho y las hembras que adoptan la posición copulatoria son administradas con la hormona. Los autores han usado gonadotropina coriónica humana (hCG, Chorulon®, Intervet, 750 IU, IM), y gonadotropina del hipotálamo (Gonadorelina, 80 µg, IM). Los resultados de inducción de ovulación por el uso de estas dos hormonas aparecen en el Cuadro 2.

El segundo método es la inducción de ovulación con macho vasectomizado utilizado en lugares donde no existe presupuesto para comprar las hormonas exógenas. Se debe tener en cuenta que la vasectomización de los machos se debe realizar con 6 meses de anticipación de su uso. Ambos métodos son buenos y eficientes, los autores lo han usado en lugares donde bastante hembras tienen que inseminarse.

Cuadro 2. Proporción de hembras que ovularon después de la inducción de ovulación con macho vasectomizado y con gonadotropina del hipotálamo (GnRH).

Especie	Macho vasectomizado	GnRH	Total
Alpaca	24/33	16/16	40/49
Alpaca	7/8	7/8	14/16
Alpaca	12/19	9/18	21/37
Alpaca	14/29	--	14/29
Llama	10/11	6/6	16/17

El efecto de plasma seminal esterilizado en la preñez, administrado inmediatamente después de la siembra de semen, ha sido también evaluado en 3 dosis, 0.5, 1.0 y 2.0 mL. Los resultados de este estudio aparecen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Efecto del plasma seminal en la ovulación y preñez de alpacas inseminadas con semen diluido y fresco.

Grupo	Número de hembras	Hembras que ovularon (Porcentaje)	Hembras preñadas (Porcentaje)
Control, no plasma seminal	19	15 (78.9)	8 (42.1)
0.5 mL plasma seminal	20	18 (90.0)	16 (80.0)
1.0 mL plasma seminal	18	13 (72.2)	8 (44.4)
2.0 mL plasma seminal	19	13 (71.5)	9 (47.4)
Total	76	59 (77.6)	33 (43.4)

El tiempo de IA es 24 a 26 horas después de la inducción de la ovulación. La inseminación a tiempo fijo también ha sido evaluado. Para este propósito, un grupo de 30 hembras fueron administradas con progesterona exógena, 5 mg, IM. Siete días después, todas las hembras aceptaron al macho, presentaron un folículo preovulatorio e inducidas a ovular y fueron inseminadas 24 horas después de la inducción de ovulación.

La colección de semen fue realizada por aspiración vaginal después de la cópula y dejado en la vecindad de la os externa de la cervix. El uso de este método ha eliminado el uso del maniquí y la vagina artificial. Lo que se necesita es un espéculo vaginal, un tubo colector de 15 mL y un macho con bastante libido que empadre por lo menos por 20 minutos. Una vez que el semen es colectado se evalúa con el microscopio para determinar motilidad, y concentración espermática, y esta listo para su dilución. La muestra de semen se deja en reposo por aproximadamente 10 minutos. Se evalúa nuevamente por motilidad y la concentración se ajusta a 10-12 millones/mL y es usado inmediatamente en la inseminación.

La deposición de semen es en el cuerpo del útero. La hembra es sujeta por 3 personas, uno sostiene la cabeza, y las otras personas sujetan las patas traseras ligeramente levantadas de tal manera que la vulva este a la altura del inseminador. El área vulvar es limpiado con una toalla húmeda y el espéculo es insertado siguiendo la anatomía de la hembra. La os externa de la cérvix es localizada y la pipeta de inseminación es insertada en el cuerpo uterino. El semen es cargado en la pipeta de inseminación y es mantenido caliente por otra persona dentro de una toalla caliente.

Los resultados de preñez después de inseminación a 26, 28 y 36 horas luego de la inducción de la ovulación y en condiciones rurales aparece en el Cuadro 4. Es necesario mencionar que este método de inseminación ha sido realizado en lugares alejados, donde la gran mayoría de las alpacas viven, y donde no existe un laboratorio con equipo especial. El macho usado para la colección de semen es de preferencia y elección del criador. Ultimamente, los autores has usado semen diluido y mantenido frío, 4 °C, por 12 a 24 horas, los resultados son promisorios. En este aspecto el semen de cualquier macho puede ser trasladado a lugares distantes y donde las hembras viven.

Cuadro 4. Hembras preñadas a los 30 días después de la inseminación artificial a tres tiempos de la inducción de la ovulación.

Especies	Método de inducción de ovulación	26 horas	28 horas	36 horas
Alpaca	Vasectomizado	18/33	12/24	5/10
	GnRH	4/16	11/16	13/15
Llama	Vasectomizado	8/8	7/19	5/29
	GnRH	4/8	1/18	5/6

Otro de los avances en IA es con el uso de semen refrigerado. Los últimos resultados con semen fresco diluido en Tris y semen refrigerado por 12 horas en Tris aparecen en el Cuadro 5. No existe diferencia significativa ($P \geq 0.05$) en la proporción de hembras preñadas con semen refrigerado (58.3%) y con semen fresco (57.7%).

Cuadro 5. Porcentaje de hembras que ovulan y quedan preñadas, a los 30 días luego de su inseminación artificial con semen fresco diluido y semen diluido refrigerado por 12 horas.

Tipo de semen	N	Ovulan	Preñadas
Fresco	26	69.2	57.7
Refrigerado	24	62.5	58.3

Otro avance también significativo es la inseminación de hembras a tiempo fijo. En este sentido, la sincronización de la onda folicular con progesterona exógena ha sido satisfactoria y todas las hembras (22) presentaron folículos ovulatorios a los 5 días de la inyección de progesterona. Un 63% de hembras inseminadas con semen diluido y refrigerado resultaron preñadas (Bravo y Alarcón, 2012).

En conclusión, la preservación de semen tiene progresos tangibles. La IA de llamas y alpacas bajo condiciones de campo con equipo de laboratorio limitado es una buena herramienta para el mejoramiento genético. El semen colectado después de la copula es un método atractivo y de uso fácil. La presencia de componentes sanguíneos en el eyaculado es normal en llamas y alpacas debido al daño en el endometrio uterino. La dilución de semen con dilutor basado en Tris y con yema de huevo de codorniz es otra alternativa favorable. El numero de alpacas preñadas varia de 40 a 60% lo que es aceptable después de una sola siembra.

REFERENCIAS

- Alarcón V, García W, Bravo PW. 2012. Inseminación artificial de alpacas con semen colectado por aspiración vaginal y vagina artificial. *RIVEP, Perú* 23: 58-64
- Bravo PW, Ordoñez C, Alarcón V. 1996. Processing and freezing semen of alpacas and llamas. *13th ICAR, Sydney, Australia*. 2:P2-3.
- Bravo PW, Flores D, Ordoñez C. 1997a Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biol Reprod* 57:520.
- Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997b Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 47:619.
- Bravo PW, Alarcón V. 2012. Fixed-time Artificial Insemination in Alpacas. *ICAR 2012. Vancouver, Canada*.
- Bravo PW, Alarcón V, Baca L, Cuba Y, Ordoñez C, Salinas J, Tito F. 2013. Semen preservation and artificial insemination in domesticated South American camelids. *Anim Reprod Sci* 136: 157-163.
- Garnica J, Achata R, Bravo PW. 1993. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci* 32:85.
- Neely DP, Bravo PW. 1998. Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. *En: Current therapy in large animal theriogenology*. RS Youngquist, Editor. WB Saunders Co. pp 787-792.
- Sumar J, Leyva V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca. *Resúmenes IV Conv Int sobre Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas, Chile*. Pp 12.