

Comunicación corta

SOBREVIVENCIA ESPERMÁTICA EN REFRIGERACIÓN A 5 °C RECUPERADOS DEL CONDUCTO DEFERENTE DE ALPACA EN TRES DILUTORES CON DOS PROTECTORES DE MEMBRANA

**Sperm survival in cooling a 5 °C recovered the vas deferens of alpaca in three
extenders with two membrane protector**

M. Guido Perez¹, J. Quintano¹, U. Harold Perez².

*¹Laboratorio de Reproducción Animal, ²Cirugía Animal, ³Laboratorio de Biotecnología de la Reproducción. Facultad de
Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano-Puno-Perú.*

E-mail: guidpe@yahoo.es

RESUMEN

Incrementar el conocimiento de las propiedades de los dilutores para la conservación de semen es muy importante, para entender la baja fertilidad en los camélidos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el tiempo de sobrevivencia espermática en refrigeración a 5 °C espermatozoides de alpaca obtenidos del conducto deferente en tres tipos de dilutores y tres niveles de suplementación de protectores de membrana espermática. El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de La Universidad Nacional del Altiplano Puno, Perú. Las muestras espermáticas (n=12) obtenidas de los conductos deferentes desviados quirúrgicamente de 03 alpacas machos adultos en cuatro sesiones (2 sesiones/semana) fueron distribuidos cada muestra a 3 tratamientos agrupados por tipo de dilutor (citrato, tris, PBS) y suplementado con tres niveles de protector de membrana espermática (sin suplemento, 20% yema

de huevo y 20% de yema + 5% de suero de recién nacido) durante la refrigeración a 5 °C por 48 h. Se determinó la motilidad espermática total en 4 tiempos diferentes (0, 6, 24 y 48 h) de refrigeración a 5 °C. Los resultados de motilidad espermática total (%) de muestras diluidos en tres dilutores y tres niveles de protector espermático, indican que la adición de 20% de yema de huevo y 5% de suero de cría recién nacida de alpaca, es muy importante en la preservación de la calidad espermática (motilidad total) durante la conservación en refrigeración a 5 °C. Asimismo, el dilutor a base de PBS y tris, son los que muestran mejores tasas de motilidad y mayor tiempo de sobrevivencia en refrigeración.

Palabras claves: *Alpaca, buffer, espermatozoide, motilidad.*

INTRODUCCIÓN

En los camélidos sudamericanos para la colección de semen, comúnmente, se utiliza la vagina artificial acondicionada a un maniquí en posición de copula. Sin embargo, hay reportes que indican que algunas características del semen obtenido por esta técnica como espumoso y altamente viscoso en diferentes grados, dificultan el trabajo de evaluación de calidad y cantidad (Pérez, 1997; Bravo *et al.*, 1997a).

Investigaciones realizadas por Pérez *et al.* (2006) y Morton *et al.* (2007) en la última década utilizan técnicas alternativas para obtener espermatozoides sin presencia de líquido de glándulas accesorias y reducir así la viscosidad, que es uno de los principales factores que afecta en manejo de espermatozoides de alpaca

Muchos investigadores han utilizado diversos dilutores tales como; Yema de huevo + citrato + glucosa, Tris + yema de huevo y PBS + yema de huevo + suero fetal, obteniendo sobrevivencia espermática variable (Pérez, 1997; Bravo *et al.*, 1997; Rivera y Pérez, 2000).

El plasma seminal secretado por las glándulas accesorias juega un rol muy importante para proveerle movilidad a los espermatozoides que vienen del epidídimo y conducto deferente proveerle de componentes que permiten los componentes del plasma seminal ayudar en la sobreviven espermática en tiempo prolongado Además, varios estudios han demostrado el efecto favorable de la yema de huevo y suero fetal de alpaca sobre la protección de los espermatozoides durante su conservación.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el tiempo de sobrevivencia espermática en refrigeración a 5 °C obtenidos del conducto deferente de alpacas en tres tipos de dilutores y tres niveles de suplementación de protectores de membrana espermática.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó el 2012, en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno, localizada en el Departamento de Puno (Perú), a una altitud de 3 820 m.s.n.m. y geográficamente: Latitud sur 15° 49' 34,5" y una longitud oeste de 70° 00'43,5" en la Meseta del Collao. Se utilizaron tres alpacas machos adultos de fertilidad probada. La desviación quirúrgica de los conductos deferentes se realizó bajo la técnica descrita por Pérez *et al.* (2006) y consiste de 05 pasos:

- a) Los machos estuvieron en ayuno de 24 h y se tranquilizó con 0,1 mg/kpv de acepromazina maleato.
- b) Se colocó al macho en posición decúbito dorsal y se preparó el campo quirúrgico en la región inguinal para realizar la anestesia local.
- c) Se realizó un pequeño corte (4 cm) en la piel encima del pene.
- d) Los conductos deferentes del lado derecho e izquierdo se localizaron y se diseccionaron en una longitud de 7 cm
- e) Los conductos deferentes diseccionados, fueron redirigidos por debajo del tejido subcutáneo y se fijaron a la piel de la cara interna de la región femoral, siendo protegida con un parche temporal.

Previo a cada recuperación, la fístula o parte de la piel en la cual estaba fijada el conducto deferente fue lavada con agua destilada estéril. El proceso de recuperación se da inicio con fricción lineal del conducto deferente con la yema de los dedos, ayudando a desplazar a los espermatozoides hacia la salida de la fístula. A medida, que aparecen las gotas (porción espermática) en el borde la fístula, esta es aspirada con una jeringa de tuberculina humedecida con 0,4 mL de dilutor (Tris, Citrato, PBS y sus combinaciones). Las muestras espermáticas fueron diluidas en proporción 1:5 (muestra : dilutor) y trasladadas a tubos de ensayo siendo mantenidas en baño maría a 37 °C, previo a la primera evaluación (0, h)

La preparación de los dilutores Citrato, Tris y PBS, se realizaron de acuerdo a las formulas recomendadas recomendadas por Hafez (2002).

La concentración de espermatozoides fue determinado por el método de hemocitómetro y la motilidad total de los espermatozoides fue determinada por observación subjetiva de muestras calentadas a 37°C en microscopio a 400X. Se determinó la motilidad total en 4 tiempos diferentes (0, 6, 24 y 48 h) de muestras conservadas a 5 °C en refrigeración.

Para el análisis de motilidad y concentración, espermática se realizó con un microscopio Leica modelo ICC50 con sistema de captura de imagen a computadora con aplicación LAZ suite (Leica Microsystems GmbH, Alemania)

Diseño experimental

Las muestras espermáticas (n=12) obtenidas de los conductos deferentes desviados quirúrgicamente de 03 alpacas machos adultos y cuatro sesiones (2 sesiones/semana) fueron distribuidos cada muestra a 3 tratamientos agrupados por tipo de dilutor y niveles de protector de membrana espermática durante la refrigeración a 5 °C.

Dilutor: Citrato de sodio

C (T1) = Citrato de sodio
CY (T2) = Citrato + 20% de yema de huevo
CYSF (T3) = Citrato + 20% de yema de huevo + 5% de suero fetal

Dilutor: Tris

T (T4) = Tris
TY (T5) = Tris + 20% de yema de huevo
TYSF (T6) = Tris + 20% de yema de huevo + 5% de suero fetal

Dilutor: Fosfato buffer salino

PBS (T7) = Fosfato Buffer Salino (PBS)
PBSY (T8) = PBS + 20% de yema de huevo
PBSYSF (T9) = PBS + 20% de yema de huevo + 5% de suero fetal.

Para determinar el efecto de los dilutores y niveles y tipos de protector de membrana espermática en la motilidad espermática muestras espermáticas

conservadas a 5 °C hasta 48h y evaluadas en 4 tiempos diferentes (0, 6, 24 y 48 h) se realizó un análisis ANVA dentro un diseño completamente al azar para cada hora de evaluación, donde los valores porcentuales fueron transformados a valores angulares y para contrastar los promedios de los tratamientos se realizó la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

Las características macroscópicas y microscópicas de las muestras espermáticas obtenidas de los conductos deferentes desviados quirúrgicamente de 03 alpacas machos adultos y cuatro sesiones, se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Características microscópicas y microscópicas promedio de los espermatozoides recuperados del conducto deferente

Animal	Rep.	Volumen (mL)	Concentración ($\times 10^4/\text{mm}^3$)
1	4	0,095 \pm 0,01	25,83 \pm 4,67
2	4	0,100 \pm 0,02	24,41 \pm 1,15
3	4	0,079 \pm 0,03	21,37 \pm 6,29
Prom.		0,091 \pm 0,02	23,87 \pm 4,43

Motilidad espermática total en tres tipos de dilutores

En las tablas 2, 3 y 4, se muestran los resultados de motilidad espermática total (%) de espermatozoides diluidos en tres dilutores y tres niveles de protector espermático. Los resultados, indican que la adición de 20% de yema de huevo y 5% de suero de cría nacida de alpaca, es muy importante en la preservación de la calidad espermática (motilidad total) durante la conservación en refrigeración a 5 °C.

Tabla 2. Motilidad espermática total (%), en muestras obtenidas de conductos deferentes, diluidas en medio citrato de sodio y diferentes niveles de protectores de membrana en conservación hasta por 48 h, a 5 °C.

Tiempo	n	C(T1)	CY(T2)	CYSF(T3)
0 h	4	24,83 ^b	45,53 ^{ab}	50,65 ^a
6 h	4	8,62 ^b	35,95 ^a	42,54 ^a
24 h	4	9,34 ^b	26,24 ^a	28,14 ^a
48 h	4	0	12,00	14,61

a, b, letras diferentes indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$)

C (T1) = Citrato de sodio
CY (T2) = Citrato + 20% de yema de huevo
CYSF (T3) = Citrato + 20% de yema de huevo + 5% de suero fetal

Tabla 3. Motilidad espermática total (%), en muestras obtenidas de conductos deferentes, diluidas en medio tris y diferentes niveles de protectores de membrana en conservación hasta por 48 h, a 5 °C.

Tiempo	n	T(T4)	TY(T5)	TYSF(T6)
0 h	4	65,60	67,37	64,81
6 h	4	10,24 ^b	56,29 ^a	58,34 ^a
24 h	4	0	34,71	35,20
48 h	4	0	7,78 ^b	14,01 ^a

a, b, letras diferentes indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$)

T (T4) = Tris
TY (T5) = Tris + 20% de yema de huevo
TYSF (T6) = Tris + 20% de yema de huevo + 5% de suero fetal

Tabla 4. Motilidad espermática total (%), en muestras obtenidas de conductos deferentes, diluidas en medio fosfato buffer salino y diferentes niveles de protectores de membrana en conservación hasta por 48 h, a 5 °C.

Tiempo	n	PBS (T7)	PBSY (T8)	PBSYSF (T9)
0 h	4	40,33 ^b	72,46 ^a	73,28 ^a
6 h	4	0	54,32 ^b	62,15 ^a
24 h	4	0	33,62	41,06
48 h	4	0	14,93	29,65

a, b, letras diferentes indica que existen diferencias significativas ($p < 0,05$)

PBS (T7) = Fosfato Buffer Salino (PBS)
PBSY (T8) = PBS + 20% de yema de huevo
PBSYSF (T9) = PBS + 20% de yema de huevo + 5% de suero fetal.

DISCUSION

Los dilutores de semen tienen varias propiedades que permiten la conservar la viabilidad espermática. Así, muchos medios buffers mantienen la osmolaridad y amplio rango de pH, que permiten la sobrevivencia de los espermatozoides (Foote, 1970a; Foote, 1970b; Foote, 1972; Lapwood and Martin, 1972).

De una amplia gama de dilutores, los medios Citrato, Tris y PBS tienen una presión osmótica que varían entre 280 a 320 mOsm/kg, pero, esta puede sufrir cambios durante largos periodos de conservación de muestras espermáticas, debido al metabolismo de los espermatozoides, que puede afectar la sobrevivencia de los espermatozoides, esta condición puede ser más importante cuando trabajamos con muestras espermáticas obtenidas del epidídimo y conducto deferente, en las cuales no están presentes las secreciones de las glándulas anexas.

Fernández-Santos *et al.* (2007) trabajando en espermatozoides epididimales de ciervos, recomienda utilizar dilutores con presión osmótica alrededor de 400 mOsm/kg y suplementado con monosacáridos particularmente la fructosa, para mejorar la sobrevivencia de los espermatozoides epididimales de ciervos.

En los tres grupos de dilutores (citrato, tris y PBS), se observa que la adición de 20% de yema de huevo y 5% de suero de cría nacida de alpaca, es muy importante para mantener la sobrevivencia de los espermatozoides conservados en refrigeración a 5 °C, hasta por 48 h. Además, se puede observar un incremento de sobrevivencia por el uso de yema de huevo, siendo estos datos similares a los

reportados por Jones and Martin (1972), Watson and Martin (1972), Petruzzi *et al.* (1976), Prendergast *et al.* (1995) reportando la importancia en la acción protectora de la yema de huevo dada por sus componentes específicos como la fosfatidylcolina (lecitina), fosfolípidos, extracto de lípidos, fracciones de lípidos y proteínas específicas que proveen alguna protección al espermatozoide durante el shock frío. Quizás el más importante efecto de la yema de huevo es la porción del complejo de lipoproteínas (fosfolípidos, lecitinas y cefalinas) que protegen al espermatozoide contra el shock de temperatura (Kampschmidt *et al.*, 1953).

Fernandez-Santos *et al.* (2006b) indican que la yema de huevo provee al dilutor una propiedad de estabilizar la membrana de los espermatozoides contra el shock frío y protección durante la congelación-descongelación. Posteriormente, Moussa *et al.* (2002), Su *et al.* (2008), Hu *et al.* (2010) indican que las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo posee una propiedad crioprotectora de la superficie de la membrana del espermatozoide durante la congelación, formando una capa protectora contra los cristales de hielo que se forman durante la congelación.

Nuestros datos de la motilidad media en la conservación la alcanzan antes de las 24 h, indicando que el uso en programas de reproducción asistida debería ser de muestras espermáticas conservadas en refrigeración en un rango máximo de 24 h. Asimismo, se observa que el dilutor PBS presento mejor performance para mantener la viabilidad espermática y que la adición de 20% de yema de huevo y 5% de suero de cría nacida de alpaca, permitió una mejor conservación (mayor a 24 h) en refrigeración comparado al dilutor citrato y tris.

Existen estudios que señalan que la seroalbumina bovina, suero fetal homólogo adicionado a los dilutores, estimulan la motilidad de los espermatozoides en pavos, debido posiblemente a la exposición a los ácidos grasos libres presentes en la seroalbúmina o suero para los espermatozoides (Bakst and Cecil, 1992; Palacios y Zarco, 1996).

CONCLUSION

Los espermatozoides obtenidos de los conductos deferentes, mantienen su motilidad en dilutores suplementados con yema de huevo y suero fetal, durante la conservación 5 °C, hasta por un tiempo máximo 24 h, sin afectar la motilidad espermática.

REFERENCIAS

- Bakst MR, Cecil HC. Effect of bovine serum albumin on motility and fecundity of turkey spermatozoa before and after storage. *J Reprod Fert* 1992; 94:287-293.
- Bravo PW, Flores D, Garnica J, Ordoñez C. Collection of semen and artificial insemination of alpaca. *Theriogenology* 1997; 47:619-626.
- Fernandez-Santos MR, Estes MC, Soler AJ, Montoro V, Garde JJ. Effects of egg yolk and cooling rate on the survival of refrigerated Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Reprod Dom Anim* 2006a;41: 114-118.
- Fernandez-Santos MR, Estes MC, Montoro V, Soler AJ, Garde JJ. Cryopreservation of Iberian (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology* 2006b; 66: 1931-1942.
- Fernandez-Santos MR, Martienz-Pastor F, Garcia-Macías V, Estes MC, Soler AJ, de Paz P, Anel L, Garde JJ. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 2007; 67:738-753.
- Foote RH. Fertility of bull semen at high extension rates in tris-buffered extenders. *J Dairy Sci* 1970a; Vol. 53, N° 10:1475-1477.
- Foote RH. Influence of extender, extension rate, and glycerolation technique on fertility of frozen bull semen. *J Dairy Sci* 1970b; Vol. 53, N° 10:1478-1482.
- Foote RH. Tris and organic buffers for the conservation of semen of various species.

- Animal Reproduction and Artificial insemination. *Edizioni Agricole, Bologna* 1972. p. 99-105.
- Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ma ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C.V. México. 2002.
 - Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins en extenders on bull spermatozoa following freezing-tawing. *Anim Reprod Sci* 2010; 117:11-17.
 - Jones RC, Martín ICA. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrstructure of ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 1972; 35:311-320.
 - Kampschmidt RF, Mayer DT, Herman HA. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the residence and storage of bull spermatozoa. *J Dairy Sci* 1953; 36:733-742.
 - Lapwood KR, Martín ICA. Effects of some buffers and inorganic and organic sodium salts in synthetic diluents for the storage of ram spermatozoa at 37 or 5°C. *Aust J Biol Sci* 1972; 25:367-378.
 - Morton KM, Bathgate R, Evans G, Chis Maxwell WM. Cryopreservation of epidymal (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of citrate-, Tris- and lactose-based diluents and pellets and straws. *Reprod Fertil Dev* 2007; 19:792-796.
 - Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-tawed bull semen. *Anim Reprod Sci* 2002; 57:1695- 1706.
 - Palacios A, Zarco L. Efecto de la sustitución de yema de huevo por albúmina sérica bovina, suero equino o suero bovino en el diluyente de congelación sobre la viabilidad pos-descongelación del espermatozoide equino. *Vet Mex* 1996; 27 (3) 221-227.
 - Pérez MG. Avances en la inseminación artificial en camélidos sudamericanos domésticos: II Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos Córdoba- Argentina. 1997. p. 97-109.
 - Pérez MG, Apaza E, Deza H. Congelación de los espermatozoides procedentes de los conductos deferentes de camélidos. Allpaqa, *Revista de Investigación del IIPC* 2006; Vol. 11 Nro 01. pp 17-23, Puno-Perú.
 - Petruzzi S, Tarantini S, Roychoudhury PN. Effect of different semen diluents on survival on ram spermatozoa at 5°C. *Zbi Vet Med A* 1976; 23:556-561.
 - Prendergast E, Vishwanath R, Shannon P. Protection of bovine sperm from the deleterious effects of seminal plasma by charged lipoprotein fractions of egg yolk. *Proc. 27 th Ann. Conf. Austr. Soc. Rep. Biol. Melbourne* 1995; 27: p 50(abstract).
 - Rivera E, Pérez MG. Uso de la yema de huevo y glicerina en la sobrevivencia de los espermatozoides en el semen de alpaca. *VX Congreso Nac. de Ciencias Veterinarias. Cusco-Perú.* 2000. p. 14 (Abstract).
 - Su L, Li X, Quan J, Yang S, Li Y, He X, Tang X. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 212-219.
 - Watson PF, Martín ICA. The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5 or -196°C. Department of Veterinary *Physiology, University of Sidney, Sidney.* N.S.W, 1972. 927-934 pp.