

Comunicación corta

RECUPERACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DE ALPACAS DEL CONDUCTO DEFERENTE DURANTE LA EPOCA REPRODUCTIVA

Recovery of alpaca sperm from vas deferens during the breeding season

M. Guido Pérez¹, J. Zevallos², U. Harold Pérez³.

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

Obtener espermatozoides de calidad y cantidad repetitivamente en camélidos, permitiría el desarrollo de las técnicas reproductivas, de manera similar que en bovinos, ovinos y caprinos. El objetivo del estudio fue determinar las características macroscópicas y microscópicas de los espermatozoides recuperados del conducto deferente, durante la época reproductiva. Los espermatozoides fueron recuperados repetidamente (2 sesiones/semana en 12 semanas) de conductos deferentes desviados quirúrgicamente de 2 alpacas macho y para la determinación de sus características fue diluido en el dilutor comercial Triladyl®. El color de las muestras recuperadas fue descrito subjetivamente y el volumen recuperado fue determinado en gotas, debido a su bajo volumen, la concentración de espermatozoides fue determinado por recuento en el hemocitometro, la motilidad de los espermatozoides fue determinada en microscopio óptico a 400X. La vitalidad y la morfología de los espermatozoides fueron evaluados en un frotis con Eosina-Nigrosina con ayuda de un microscopio óptico a 1000X. Los resultados indican que la

totalidad de las muestras recuperadas eran de color blanco lechoso. El volumen fue de 11,5 vs 8,0 gotas, la concentración espermática fue de 159 000 y 98 000 de espermatozoides/mm³, para alpaca macho 1 vs 2 respectivamente, mostrando diferencia estadística entre los individuos (P<0,05). La motilidad y vitalidad espermática fue de 56,8 vs 56,2% y 47.8 vs 52.0% para alpaca macho 1 vs 2 respectivamente y no mostraron diferencias estadísticas significativas (P>0.05). Las anomalías espermáticas en la cabeza y cola fueron inferiores a 2,9 y 16,3%. Los espermatozoides recuperados repetidamente de los conductos deferentes desviados quirúrgicamente tienen buena calidad y cantidad, que pueden ser utilizados en técnicas reproductivas modernas.

Palabras clave: *Alpaca, conducto deferente, espermatozoide*

INTRODUCCIÓN

En los camélidos sudamericanos para la colección de semen, comúnmente, se utiliza la vagina artificial acondicionada a un maniquí en posición de copula y durante la copula se desvía el pene en dirección a la vagina artificial. Esta técnica ha permitido evaluar el comportamiento sexual del macho y determinar las características seminales en llamas (Lichtenwalner, *et al.*, 1996; Giuliano *et al.*, 2008; Giuliano *et al.*, 2012) y en alpacas (Pérez, 1997; Bravo *et al.*, 1997a; Bravo *et al.*, 1997b; Flores *et al.*, 2002). Sin embargo, hay reportes que indican que algunas características del semen como espumoso y altamente viscoso en diferentes grados, dificultan el trabajo de evaluación de calidad y cantidad (Pérez, 1997; Bravo *et al.*, 1997a), asimismo, Flores *et al.* (2002) indican que el semen colectado se convierte en un líquido mucoso espeso después de dos horas de conservación.

Pérez *et al.* (2006) demostraron que es posible recuperar repetidamente espermatozoides de conductos deferentes desviados quirúrgicamente de alpacas y llamas macho y también facilitó la evaluación del volumen, concentración, motilidad, anormalidades y posterior criopreservación, logrando mayor a 20% de sobrevivencia espermática a la descongelación.

La función de los conductos deferentes es transportar a los espermatozoides a la uretra en preparación para la eyaculación y también sirven de almacén de los espermatozoides (Knobil and Neill, 2006). En Camélidos sudamericanos, el conducto deferente es delgado (2 mm) en su comienzo y se engrosa cuando alcanza la cavidad abdominal (3 mm) (Youngquist y Threfall, 2007).

Siendo, la espermatogénesis en el macho post púber un proceso continuo y con una producción diaria de espermatozoides en los túbulos seminíferos. Es posible recuperar repetidamente espermatozoides viables de los conductos deferentes, que nos pueda permitir aplicarlos en programas de reproducción asistida, tales como

inseminación artificial (IA), fecundación *in vitro* (IVF), inyección citoplasmática (ICSI), etc.

El objetivo del presente estudio fue determinar las características macroscópicas y microscópicas de los espermatozoides recuperados del conducto deferente, durante la época reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo entre Enero y Marzo del 2011 en el Laboratorio de Reproducción, Biotecnología y Cirugía Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano, Puno- Perú, localizado a una altitud de 3820 msnm en la meseta del Collao. Se utilizaron dos 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 aparece las gotas (porción espermática) en el borde la fístula, esta es aspirada con una jeringa de tuberculina

humedecida con 0,5 mL de dilutor comercial (Triladyl®, Minitube, Alemania). Las muestras espermáticas fueron trasladadas a tubos de ensayo siendo mantenidas en baño maría a 37 °C.

Se realizó la recuperación de espermatozoides de un solo conducto deferente por macho y con una frecuencia de dos veces por semana (12 semanas) durante los meses de Enero, Febrero y Marzo.

El color de las muestras recuperadas fue descrito subjetivamente y el volumen recuperado fue determinado en gotas (porción espermática), que se obtuvieron producto de cada fricción lineal de los conductos deferentes. La concentración de espermatozoides fue determinado por el método de hemocitómetro, la motilidad total de los espermatozoides fue determinada a 400X. La motilidad total fue determinada en muestras calentadas a 37°C. La vitalidad y la morfología de los espermatozoides fueron evaluados en un frotis con Eosina-Nigrosina a 1000X. Para el análisis de motilidad, concentración, vitalidad y morfología espermática se realizó con microscopio Leica modelo ICC50 con sistema de captura de imagen a computadora con aplicación LAZ suite (Leica Microsystems GmbH, Alemania)

Se evaluaron las variables volumen, concentración espermática, motilidad, vitalidad y morfología y para determinar si existe diferencias significativas entre individuos se sometieron a la prueba t-Student ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS

La Tabla 1 y 2, muestran los resultados de características macroscópicas y microscópicas de la porción espermática recuperados de un solo conducto deferente desviado quirúrgicamente por macho.

Los resultados indican que la totalidad de las muestras recuperadas eran de color blanco lechoso. El volumen fue de 11,5 vs 8,0 gotas, la concentración espermática fue de $15,9 \times 10^4$ y $9,8 \times$

10^4 de espermatozoides/mm³, para alpaca macho 1 vs 2 respectivamente, mostrando diferencia estadística entre los individuos ($P<0,05$). La motilidad y vitalidad espermática fue de 56,8 vs 56,2% y 47.8 vs 52.0% para alpaca macho 1 vs 2 respectivamente y no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$).

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas de espermatozoides recuperados de conductos deferentes desviados quirúrgicamente.

I N D	n	Volumen (# gotas)	Motilidad (%)	Conc. ($\times 10^4$ / mm ³)	Vitalidad (%)
1*	23	11,5 \pm 2,0 ^a	56,8 \pm 9,8	15,9 \pm 6,8 ^a	47,8 \pm 8,8
2*	23	8,0 \pm 2,4 ^b	56,2 \pm 7,2	9,8 \pm 4,0 ^b	52,0 \pm 9,3

* Solo un conducto deferente por macho. IND. Machos

a, b Letras diferentes, indica que existe diferencia estadística significativa ($p<0,05$)

Tabla 2. Morfología de los espermatozoides recuperados de conductos deferentes desviados quirúrgicamente.

Morfología	Macho 1 (% \pm D.E.)	Macho 2 (% \pm D.E.)
Normales	90,4	70,9
Anormalidades de cabeza	2,9 \pm 2,5	2,1 \pm 1,3
Anormalidades de cola	4,7 \pm 4,6	16,3 \pm 12,5
Gota citoplasmática	2,0 \pm 1,2	2,6 \pm 1,6

DISCUSIÓN

Existen varias investigadores que han desarrollado diferentes técnicas de obtención de espermatozoides en camélidos; el uso de esponjas vaginales, fundas vaginales, preservativos (San Martín *et al.*, 1968; Sumar, 1983), fístula (von Kubicek, 1974), electroeyaculación (Fernández-Baca y Calderón, 1966; Calderón *et al.*, 1968; Sumar, 1983), vagina artificial (Garnica *et al.*, 1993; Pérez, 1997; Bravo *et al.*, 1997a).

Nuestros resultados de calidad espermática 56.5% de motilidad, 49.9% de vitalidad y concentración de 12.8×10^4 de espermatozoides/mm³, obtenidos de muestras espermáticas de conductos deferentes desviados quirúrgicamente, fueron diferentes numéricamente a los reportados por Pérez *et al.* (2006) utilizando la misma técnica de recuperación espermática, logrando 72.3% de motilidad, 60.8% viabilidad y concentración de 32.7×10^4 de espermatozoides / mm³; esta diferencia pudo deberse por la menor frecuencia de obtención espermática y trabajo con machos estimulados con hembra en celo, que permitió, esta variabilidad de resultados. Foote (1970) y Rodríguez *et al.* (1993), sostienen que es muy importante estimular al macho previa a la colección para mejorar la cantidad y calidad del eyaculado.

En diferentes especies se han reportado exitosamente la recuperación de los espermatozoides del epidídimo de animales muertos y destrucción del epidídimo en placa Petri en laboratorio, Kaabi *et al.* (2003) y Ehling *et al.* (2006) en ovinos, Herold *et al.* (2004) y Martins *et al.* (2007) en vacunos, Garde *et al.* (1998), Soler *et al.* (2003), Fernández-Santos *et al.* (2006) en ciervos. Sin embargo, en el presente trabajo, la recuperación repetida de espermatozoides se realizó en animal *in vivo* y con una frecuencia de 2 veces por semana, durante la estación reproductiva.

El color de la porción espermática es un indicador subjetivo de la concentración espermática, por lo que valorar ascendentemente como blanco translucido, blanco lechoso y blanco cremoso, puede indicar mayor concentración espermática. En Alpacas, diferentes investigadores colectaron semen con vagina artificial, tales como; Lichtenwalner *et al.* (1996); Bravo *et al.* (1997a); Bravo *et al.* (1997b); Flores *et al.* (2002); Urquieta *et al.* (2005) han reportado diferentes tonalidades de semen desde blanco cremoso, pasando por blanco lechoso, blanco opalescente y color translucido.

Los resultados en este estudio de 56.5% de motilidad, 49.9% de vitalidad espermática obtenida

de Alpacas macho con conductos deferentes desviados quirúrgicamente, son inferiores a tasas de motilidad entre 71,4 al 92% obtenidos de muestras recuperadas del epidídimo de animales muertos [Kaabi *et al.* (2003) y Ehling *et al.* (2006)] en ovinos, [Herold *et al.* (2004) y Martins *et al.* (2007)] en vacunos, [Garde *y col.* (1998), Soler *et al.* (2003), Fernández-Santos *et al.* (2006)] en ciervos. Sin embargo, esta diferencia pudo deberse a varios factores tales como método de obtención espermática, especie, edad, tamaño de testículo, etc.

La morfología de los espermatozoides procedentes del conducto deferente fue 2,5% de anomalías de cabeza, 10,5% de anomalías de cola y 2,3% de gota citoplasmática, sin embargo, Lichtenwalner *et al.* (1996) reporta un mayor porcentaje de anomalías en Alpaca, siendo 20,1% anomalías de cabeza, 8,1% anomalía de cola y 11,1% de gotas citoplasmáticas.

CONCLUSION

Los espermatozoides pueden ser recuperados repetidamente de los conductos deferentes desviados quirúrgicamente obteniendo buena calidad y cantidad de espermatozoide, que pueden ser utilizados en técnicas reproductivas modernas.

REFERENCIAS

- Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology* 1997a; 47:619-626.
- Bravo PW, Flores D, Ordoñez C. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biol Reprod* 1997b; 57:520-524.
- Calderón W, Sumar J, Franco E. Avances en la Inseminación artificial de las alpacas (Lama pacos). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; Lima, Perú. 1968; 22:19-35.
- Ehling C, Rath D, Struckmann C, Frenzel A, Schindler L, Niemann H. Utilization of

- frozen-tawed epididymal ram semen to preserve genetic diversity in Scarpie susceptible sheep breeds. *Theriogenology* 2006; 66:2160-2164.
- Fernández-Baca S, Calderón W. Methods of collection of semen in the alpaca. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú*, 1966; 13:18-20.
 - 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* 2006; 41:114-118.
 - Flores P, García-Huidobro J, Muñoz C, Bustos-Obregón E, Urquieta B. Alpaca semen characteristics previous to a mating period. *Anim Reprod Sci*, 2002; 72:259-266.
 - Garde JJ, Ortiz N, Garcia AJ, Lopez A, Gallego L. Criopreservación postmortem de material espermático e inseminación artificial en el ciervo Iberico. *Arch Zootec* 1998; 47:351-356.
 - Foote RH. Fertility of bull semen at high extension rates in tris-buffered extenders. *J Dairy Sci* 1970; 10:1475-1477.
 - Garnica J, Flores E, Bravo PW. Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. *Anim Reprod Sci* 1993; 32:85-90.
 - Giuliano S, Director A, Gambarotta M, Trasorras V, Miragaya M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Anim Reprod Sci*, 2008; 104:359-369.
 - Giuliano S, Chaves MG, Trasorras VL, Gambarotta M, Neild D, Director A, Pinto M, Miragaya MH. Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen. *Anim Reprod Sci*, 2012; 131:204-210.
 - Herold FC, Aurich JE, Gerber D. 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*, 2004; 61:715-724.
 - Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixio JC, Roussi H, Herrez P, Anel L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, 2003; 60:1249-1259.
 - Knobil and Neill S. Physiology of reproduction. In Vol. 1 Male reproductive system. *Third ed. Elsevier Inc*, 2006.
 - Lichtenwalner AB, Woods GL, Weber JA. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology* 1996; 46:293-305.
 - Martins CF, Rumpf R, Pereira DC, Dode MN. Criopreservación of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Anim Reprod Sci*, 2007; 101:326-331.
 - Pérez MG. Avances en la inseminación artificial en camélidos sudamericanos domésticos. En: *Actas 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. *Allpaca, revista de investigación del IIPC*, 2006; Vol. 11 Nro 01. p. 17-23. Puno Perú.
 - Rodríguez F, Stellflug JN, Fitzgerald JA. Inseminación artificial intrauterina por laparoscopia de semen ovino congelado en un diluyente a base del gel de la planta aloe vera. *Latinoam Prod Anim* 1993; 1(1): 9-15.
 - San Martín M, Copaira M, Zúñiga J, Rodríguez R, Bustinza G, Acosta L. Aspectos of reproduction in the alpaca. *J Reprod fértil*, 1968; 16:395-399.
 - Soler AJ, García AJ, Fernández-Santos MR, Estes MC, Garde JJ. Effects of thawing procedure on postthawed *in vitro* viability and *in vivo* fertility of Red Deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *J Androl* 2003; 24: (5) 746-756.
 - Sumar J. Studies on reproductive pathology in alpacas. *Masters Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Upsala and Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, 1983. 103 pp.

- Urquieta B, Flores P, Muñoz C, Bustos-Obregon E, Garcia-Huidobro J. Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a mating period. *Anim Reprod Sci* 2005; 90:329-339.
- von Kubicek J. Semen collection in alpaca with a urethral fistula (German). *Zeitschrift Tierzucht und Zuchtungsbiologie*, 1974; 90:335-351.
- Youngquist R.S. and Threlfall W.R. Current therapy in large animal theriogenology: in *Reproductive Anatomy and Life Cycle of the Male and Female Llama and Alpaca. 2th ed. by Saunders, an imprint of Elsevier Inc*; 2007.