

**CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE ALPACAS OBTENIDO POR  
ELECTROEYACULACIÓN Y SU MOTILIDAD DURANTE LA REFRIGERACIÓN**

Characteristics of the alpaca semen obtained by electroejaculation and motility  
during cooling

K. Choez, I. Arriaga, M. Terreros, R. Condori, G. Arroyo, W. Huanca

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.9>

<sup>1</sup> *Laboratorio de  
Reproducción Animal,  
Facultad de Medicina  
Veterinaria, Universidad  
Nacional Mayor de San  
Marcos. Lima- Perú.*

E-mail:  
kathyvet3@hotmail.com

**RESUMEN**

En alpacas, una limitante para el desarrollo de la conservación del semen es la dificultad en la colección del mismo. Ante esto la técnica de electroeyaculación constituye una alternativa para obtener mejor calidad de eyaculados y no necesita de un entrenamiento previo de los machos como la vagina artificial. Por ello nuestro objetivo fue determinar las características del semen de alpacas obtenido por electroeyaculación y su motilidad durante el proceso de refrigeración. Se utilizaron 5 alpacas machos huacaya de 3 a 5 años. El semen fue colectado por la técnica de electroeyaculación, obteniéndose un total de 27 eyaculados. Se empleó un dilutor a base de TRIS para la refrigeración a 5 °C y se evaluaron las características del semen fresco y el porcentaje de motilidad a la hora, 12 y 24 horas de refrigeración. El análisis de los datos se realizó mediante un modelo de regresión lineal mixta y los resultados concluyeron que las características del semen fresco de alpacas colectadas por la técnica de electroeyaculación son diferentes a los obtenidos en otras especies de camélidos sudamericanos debido a la variabilidad existente entre especies. Además se determinó que el mayor tiempo de refrigeración afecta negativamente al porcentaje de motilidad de las muestras refrigeradas.

**Palabras clave:** *Alpacas, semen, electroeyaculación*

**ABSTRACT**

In alpacas, an obstacle for the development of the storage of semen is the difficulty in the collection of the same. Given this electroejaculation technique is an alternative for better quality of ejaculates and does not require prior training of males as artificial vagina. Therefore, our objective was to determine the characteristics of semen obtained by electroejaculation

and motility during cooling. Five male alpacas huacaya 3 to 5 years were used. Semen was collected by electroejaculation technique, yielding a total of 27 ejaculates. One diluter was used to Tris base for cooling at 5 ° C and the characteristics of fresh semen and percentage motility at the time, 12 and 24 hours cooling were evaluated. The data analysis was performed using a mixed linear regression model and the results concluded that the characteristics of fresh semen

collected by alpacas electroejaculation technique are different from those obtained in other species of South American camelid due to variability between species. Furthermore it was determined that the greatest cooling time adversely affects the percentage motility of refrigerated samples.

**Keywords:** *Alpacas, semen, electroejaculation*

## INTRODUCCION.

En alpacas, una limitante para el desarrollo de la conservación del semen es la dificultad en la colección del mismo. Se ha demostrado que el método de colección utilizado influye sobre el aspecto del semen obtenido; pudiendo ser muy espumoso o estar contaminado con impurezas del suelo tras la colección con vagina artificial (VA), sin embargo aún sigue siendo uno de los métodos más utilizados actualmente (Giuliano *et al.*, 2008). Por su parte la electroeyaculación (EE) permite obtener eyaculados más limpios y sin espuma, además no necesita de un entrenamiento previo de los machos y es el único método con el que se ha logrado obtener semen de CSA silvestres (Giuliano *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2011). Adicionalmente las características propias del semen de las alpacas como la alta viscosidad, bajo porcentaje de motilidad y baja concentración espermática han condicionado la evaluación, manipulación, dilución y conservación del semen utilizado en los protocolos de refrigeración y congelación.

El objetivo del presente estudio fue determinar las características del semen de alpacas obtenido por electroeyaculación y su motilidad durante el proceso de refrigeración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó a nivel del mar, en la sección de Biotecnología Reproductiva del Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, la cual se encuentra ubicada en el departamento de Lima. La fase experimental tuvo una duración de 7 meses, esta comprendió los meses de mayo a noviembre. Se utilizaron 5 alpacas machos de raza Huacaya entre 3 a 5 años, el parámetro para elegir a los animales fue que tuvieran testículos con 4 cm de largo y 3.5 de ancho. La alimentación fue a base de heno de alfalfa y agua ad libitum. Para el alojamiento de las alpacas se utilizó un corral de 10 m de largo x 5 m de ancho.

La colecta de semen se realizó 2 veces por semana mediante la técnica de electroeyaculación (Director *et al.*, 2007), obteniéndose un total de 27 eyaculados. El semen fresco fue diluido 1:1 con el dilutor de refrigeración. La composición del dilutor fue 2.6 g de TRIS, 1.35 g de ácido cítrico, 1.2g de glucosa, 0.9 g de fructosa disuelto en 100 ml de agua bidestilada autoclavada con un pH de 6.9 y 10000 UI/ml de Penicilina G sódica, 10mg/ml de estreptomocina sulfato y 20% de yema de huevo (v/v) (Niasari *et al.*, 2007). Las muestras diluidas fueron refrigeradas a 5 °C, donde permanecieron por un periodo de 24 horas. Se evaluaron las características del semen fresco, el porcentaje de motilidad a la hora, 12 y 24 horas de refrigeración a 5 °C y el porcentaje de espermatozoides con membrana funcional a la primera hora de refrigeración a 5 °C (figura 1 y 2).

Las características seminales evaluadas fueron las siguientes: el volumen por medición en un tubo graduado; el color por observación directa; el pH usando un papel indicador universal especial Merck® (6,4 a 8,0); la motilidad colocando 10 ul de semen en una lámina portaobjetos, observando a 10 y 40x por microscopía óptica; la concentración espermática con la cámara de Neubauer y el resultado se expresó en millones de espermatozoides/ml; la morfología se evaluó por microscopía óptica a 100x luego de teñir una lámina portaobjetos con Tinción 15; la funcionalidad de la membrana plasmática del espermatozoide mediante la prueba de hiposmótica (HOS test) según la técnica descrita por Giuliano *et al.* (2002). Se consideró como espermatozoides con membrana funcional aquellos espermatozoides que presentaron la cola hinchada (HOST+).

El análisis de los datos se realizó mediante un modelo de regresión lineal mixta para evaluar el efecto de tiempos de refrigeración, variabilidad individual y número de muestreos sobre los porcentajes de motilidad, los cuales fueron transformados como funciones arcoseno. Diferencias entre los tiempos de refrigeración fueron analizadas mediante el test de Duncan, con un nivel de significancia de 0.05. Se utilizó el paquete estadístico Stata 12.0 (College Station, TX). Las características obtenidas de las muestras en fresco y los resultados del porcentaje de motilidad durante el proceso de refrigeración (1 hora, 12 horas y 24 horas) fueron organizados mediante estadísticos descriptivos.

## RESULTADOS

Los valores de las características del semen fresco de alpacas colectados por la técnica de electroeyaculación se observan en la tabla 1.

Los resultados de motilidad y funcionalidad de la membrana plasmática durante el proceso de refrigeración son presentados en la tabla 2. A la primera hora de refrigeración se observó 50.93% de motilidad en las muestras, mientras que a las 12 y 24 horas estos porcentajes fueron menores (38.52% y 17.89% respectivamente). Todos estos valores fueron

estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). El análisis de regresión lineal mixta demostró un efecto estadísticamente significativo de los tiempos de refrigeración y del número de muestreo en animales sobre los porcentajes de motilidad ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3).

Tabla 1. Determinación de las características del semen de alpacas obtenido por electroeyaculación

Características del semen	
% Color	
▪ Lechoso	22.22
▪ Transparente	77.78
Volumen (ml)	1.64 ± 0.65
pH	7.24 ± 0.28
Filancia (cm)	3.30 ± 1.73
Concentración (10 <sup>6</sup> /ml)	41.96 ± 14.46
Motilidad espermática (%)	55.93 ± 11.85
Funcionalidad de la membrana plasmática (%)	51.33 ± 12.04
Espermatozoides normales (%)	72.23 ± 5.55
Espermatozoides anormales totales (%)	27.77 ± 5.55
▪ Anormalidades de la cabeza (%)	7.20 ± 2.62
▪ Anormalidades de la cola (%)	15.90 ± 4.51
▪ Anormalidades del cuello (%)	0.82 ± 0.84
▪ Gota citoplasmática (%)	3.89 ± 2.74

Valores son porcentajes, promedios y desviación estándar

Tabla 2. Efecto del tiempo de refrigeración (1, 12 y 24 horas) sobre el porcentaje de motilidad y funcionalidad de la membrana plasmática de espermatozoides de alpaca obtenido por electroeyaculación

Características del semen	Tiempos de evaluación en refrigeración		
	1 hora	12 horas	24 horas
Motilidad espermática (%)	50.93 ± 11.10 <sup>a</sup>	38.52 ± 13.57 <sup>b</sup>	17.89 ± 15.34 <sup>c</sup>
Funcionalidad de la membrana plasmática (%)	46.78 ± 13.49	NSE	NSE

Valores son promedios ± desviación estándar

<sup>a, b, c</sup>letras diferentes dentro de una fila indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

NSE (no se evaluó)

Tabla 3. Efecto de los tiempos de refrigeración, efecto individual y número de muestreos sobre los porcentajes de motilidad espermática

Variables	Coficiente	Pvalue	IC 95%
Tiempo de refrigeración	-0.18	<0.001	[-0.21 - -0.15]
Alpaca	0.03	0.116	[-0.01 - 0.07]
Muestreos	-0.02	<0.001	[-0.04 - -0.01]
Intercepto	0.69	<0.001	[0.53 - 0.85]



Figura 1. Colección de semen por la técnica de electroeyaculación



Figura 2. a) Semen obtenido por electroeyaculación y b) Muestras diluidas mantenidas en refrigeración

## DISCUSIÓN

Con respecto a las características espermáticas determinadas en nuestro estudio, el volumen obtenido es similar al reportado por Ordóñez *et al.* (2013) quienes mencionan un valor promedio de  $1.58 \pm 1.76$  ml. Menores valores obtuvieron Pacheco *et al.* (2011) en vicuñas, pero se han reportado mayores valores en llamas (Giuliano *et al.*, 2002), estas diferencias podrían deberse a la variabilidad que existe entre las especies. En cuanto al color del semen, el 77.78 % de las muestras fueron de color transparente, y sólo un 22.22% fué de color lechoso, lo que se contradice con Ordóñez *et al.* (2013) quienes indican que el color predominante en su estudio fué el blanco lechoso (58.33 %), en otras especies se reportan colores blanco cristalino y blanquecino (Pacheco *et al.*, 2011; Giuliano *et al.*, 2002).

La concentración espermática obtenida, fué menor que la encontrada por Ordóñez *et al.* (2013) quienes reportan valores de  $84.08 \pm 62.92$  millones de espermatozoides por ml. Sin embargo, fue superior a

la obtenida por Pacheco *et al.* (2011); Giuliano *et al.* (2002) en semen de vicuña y llama respectivamente. Asimismo el porcentaje de funcionalidad de la membrana plasmática fue superior al obtenido en otras especies de camélidos (Pacheco *et al.*, 2011; Director *et al.*, 2007), posiblemente por que dichos autores utilizaron diferentes concentraciones de solución hiposmótica. Finalmente, el porcentaje de espermatozoides anormales, fué similar al obtenido por Giuliano *et al.* (2002) quienes reportan valores de 25 a 44 % en espermatozoides de llama.

El presente estudio también evaluó el efecto del tiempo de refrigeración sobre el porcentaje de motilidad y funcionalidad de la membrana plasmática de espermatozoides de alpaca obtenido por electroeyaculación, ya que existen investigaciones que mencionan que el principal daño celular inducido por el proceso de refrigeración es la alteración morfológica y la ruptura de la membrana plasmática (De Leeuw *et al.*, 1990; Hammerstedt *et al.*, 1990) disminuyendo de esta manera la motilidad y viabilidad de las muestras refrigeradas. Nuestros resultados indican que a medida que aumenta el tiempo de refrigeración disminuye el porcentaje de motilidad, reduciéndose casi al 50 % del valor inicial a las 12 horas y en un 70 % a las 24 horas de refrigeración. Por su parte, Huanca y Gauly (2001) encontraron en semen de llamas porcentajes similares a nuestro estudio de 43% a las 6 h, 28% a las 12 h, 21% a las 24 h, 14% a las 48 h y 8,7% a las 72 h partiendo de muestras con un 54% de movilidad inicial y utilizando como dilutor BSA - glucosa.

## CONCLUSIÓN

Las características del semen fresco de alpacas colectadas por la técnica de electroeyaculación son diferentes a los obtenidos en otras especies de camélidos sudamericanos debido a la variabilidad existente entre especies. Además se determinó que el mayor tiempo de refrigeración afecta negativamente al porcentaje de motilidad de las muestras refrigeradas.

## REFERENCIAS

- De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ. The role of membrane plays in cold shock and freezing injury. *Reprod Dom Anim Suppl* 1990; 1:95-104.
- Director A, Giuliano S, Trasorras V, Carretero MI, Pinto M, Miragaya M. Electroeyaculation in llama (*Lama glama*). *J Camel Prac. Res* 2007; 14: 203-206.
- Giuliano S, Spirito S, Miragaya M, Capdevielle E, Agüero A, Boquet M, Ferrari MR. Electroeyaculation and seminal parameters in vicugna (*Vicugna vicugna*). *Proceedings Annual Conference*

- of the International Embryo Transfer Society. *Theriogenology* 2002; 57:583.
- 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 Scien* 2008; 104:359-369.
  - Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990; 11:73-88.
  - Huanca, W.; M. Gauly. Conservación de semen refrigerado de llamas. *Rev. Inv. Vet. Peru* 2001; 1:460-461.
  - Niasari-Naslaji A, Mosafieri S, Bahmani N, Gerami A, Gharahdaghi A, Abarghani A, Ghanbari A. Semen cryopreservation in Bactrian camel (*Camelus bactrianus*) using SHOTOR diluent: Effects of cooling rates and glycerol concentrations. *Theriogenology* 2007; 68:618-625.
  - Pacheco JI, Mamani RH, Deza HW. Colección de semen mediante electroeyaculación de vicuñas mantenidas en Cautiverio. *Spernova* 2011; 1:131-133.
  - Ordóñez C, Cucho H, Ampuero E, Antezana W, Cayo S. Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. *Spernova* 2013; 3: