

EVALUACIÓN DE TRES DILUTORES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN DE ALPACA (*Vicugna pacos*) EN PELETS

Three extenders evaluation in cryopreservation of alpaca (*Vicugna pacos*) semen in pellets

César Ordoñez¹, Enrique Ampuero¹, Virgilio Alarcón¹, Enrique Franco¹, Christian Hanzen², Hernán Cucho¹

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.27>

¹ Carrera Profesional de Zootecnia, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú

² Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Lieja, Bélgica

E-mail: hernancucho@yahoo.com

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar tres dilutores: AndroMed®, Triladyl® y base Tris en la criopreservación en pellets de semen de alpaca colectado mediante electroeyaculación. Se utilizaron 15 eyaculados, provenientes de 7 alpacas machos; la criopreservación se evaluó mediante la motilidad y los parámetros de movilidad (VCL, ALH); se encontraron diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) en la motilidad del semen refrigerado siendo el Triladyl® y base Tris superiores. La velocidad curvilínea del espermatozoide (VCL) fue superior en Triladyl® en relación a los otros dilutores. En el semen descongelado se halló diferencias estadísticas ($p < 0,05$) en la VCL, siendo Triladyl® superior a los demás. La motilidad espermática al descongelado de los pellets aún es baja, falta afinar protocolos que nos permitan tener parámetros espermáticos similares a los que se tienen en refrigeración.

Palabras clave: Alpaca, criopreservación, pellets.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate three diluters: AndroMed®, Triladyl® and Tris base in the cryopreservation of alpaca semen in pellets, it's was electroejaculation collected. 15 ejaculates from 7 male alpacas were used; cryopreservation was evaluated by motility and sperm motility patterns (VCL, ALH); highly significant differences ($p < 0,01$) in total sperm motility were found in cooled semen, Tris base and Triladyl® were higher. Sperm curvilinear velocity (VCL) in

Triladyl® was higher relative to other diluters. In the thawed semen statistical differences ($p < 0,05$) was found in the VCL, being superior to others Triladyl®. The thawed sperm motility of the pellets is still low, lack refine protocols that allow us to have similar sperm parameters that are taken into cooling.

Keywords: Alpaca, cryopreservation, pellets

INTRODUCCION.

La crianza de alpacas (*Vicugna pacos*) se realiza en zonas con alturas mayores a los 4 000 metros de altitud, aprovechando los pastizales de tipo césped de puna y bofedales, siendo una de las especies más eficientes en su uso, en dichas condiciones es la principal producción ganadera y por ende fuente de ingreso para quienes realizan su crianza. La criopreservación de semen de alpacas tiene larga data, generalmente se realiza usando pajillas; los primeros ensayos de criopreservación de semen de camélidos sudamericanos en pellets los realizó Graham *et al.* (1978), luego fueron estudiados por Morton *et al.* (2007 y 2010) que realizaron la criopreservación de espermatozoides epididimarios de alpacas en pellets; es por ello que se ha planteado el presente estudio evaluando tres dilutores AndroMed®, Triladyl® y base Tris en la criopreservación de semen de alpaca en pellets, en este caso de espermatozoides colectado por electroeyaculación.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fue realizado en la época de secas (julio – octubre) en el Centro de Investigación en Camélidos Sudamericanos (CICAS) La Raya de la Facultad de Agronomía y Zootecnia de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco a 4 133 metros de altitud.

Se utilizaron 15 alpacas machos de entre 5 y 10 años de edad, con un peso corporal promedio al inicio del estudio de $68 \pm 5,1$ kg, de éstos solamente 7 proporcionaron semen con la motilidad y concentración necesarias para su congelación. La alimentación fue a base de pradera nativa.

La colección de semen se realizó por electroeyaculación, bajo anestesia general, se hizo algunas modificaciones a la técnica descrita por Director *et al.* (2007); la dosis de xilacina fue de 0,25ml/20 kg PV y la de ketamina de 2,5 ml/100 kgPV. La erección se logró en promedio a los 4,5 voltios, y la eyaculación a los 7,2 voltios; la duración de la colecta fue de 9 minutos.

Para el estudio se utilizaron 15 eyaculados, cada uno de los cuales fue dividido en 3 alícuotas: AndroMed®, Triladyl® (Minitüb, Tiefenbach, Alemania) y base Tris. Para la criopreservación de semen de alpacas en pellets, primero se diluyó el semen hasta alcanzar una concentración final de $12,15 \pm 3.6$ millones de espermatozoides por ml, en el proceso de criopreservación se pasó por las siguientes etapas: dilución, refrigeración a 4°C, congelación de pellets en hielo seco (-78°C) durante 2 minutos y almacenamiento en nitrógeno líquido (-196°C). El descongelado de los pellets (200 µl), se realizó 10 días

después de la congelación; se evaluó la motilidad y los parámetros de movilidad.

La movilidad de los espermatozoides en las diferentes etapas (fresco, refrigerado y descongelado) fue evaluada en el módulo de motilidad del Integrated Semen Analysis System (ISAS® v 1,2), un sistema computarizado de análisis de semen (Proiser R+D, Paterna, Valencia, España), que emplea un microscopio UOP – UB200i. Muestras de 5 µl se analizaron con una lente de 10X de contraste de fase negativo y platina térmica (37 °C); la señal de video fue adquirida con una video cámara Proiser 782C. Se capturaron 25 imágenes por segundo. Las áreas de las partículas capturadas estuvieron comprendidas entre 5 y 80 µm², se utilizó una progresividad de 75% del STR (índice de rectitud) y una conectividad de 14.

Se determinó el porcentaje de espermatozoides estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos. También se determinaron los parámetros de velocidad de los espermatozoides: velocidad curvilínea (VCL), velocidad rectilínea (VSL), velocidad media (VAP), índice de rectitud (STR), índice de linealidad (LIN), índice de oscilación (WOB), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y frecuencia de batida de la cabeza (BCF), analizándose la VCL y ALH que son las dos variables más representativas de los parámetros de velocidad de los espermatozoides.

La concentración de espermatozoides (millones/ ml), se evaluó en el ISAS® empleando la misma muestra utilizada para evaluar la motilidad. Para la morfometría espermática, se tiñeron éstos con Diff Quik®, se evaluó empleando la lente de 100X con aceite de inmersión, también se hizo en el ISAS® en el módulo de morfometría usando la configuración de cabeza total.

Se determinó la normalidad de las variables en estudio; se empleó la estadística descriptiva para evaluar el volumen del eyaculado, concentración y morfometría del espermatozoide. La motilidad y sus parámetros de velocidad fueron transformados (proc transreg) para ser evaluados en un diseño completamente al azar, las medias se evaluaron con el test de Duncan. Se empleó el SAS para el análisis de los datos.

RESULTADOS

De la evaluación de los 15 eyaculados de alpacas obtenidos por electroeyaculación, se encontró un volumen seminal de $1,63 \pm 0,19$ ml, el color predominante fue el blanco lechoso con 66.67%, la concentración espermática fue de $36,51 \pm 11,68$ millones de espermatozoides por ml.

Se evaluaron 1200 espermatozoides para la morfometría, hallándose el área ($15,03 \pm 2,42 \mu\text{m}^2$), perímetro ($16,93 \pm 1,47 \mu\text{m}$), largo ($5,84 \pm 0,58 \mu\text{m}$) y ancho ($3,15 \pm 0,34 \mu\text{m}$).

Se ha determinado los porcentajes de espermatozoides estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos en semen fresco, refrigerado y descongelado, éstos dos últimos evaluando el uso de 3 dilutores, los que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes de espermatozoides estáticos, móviles no progresivos y progresivos en semen fresco, refrigerado y descongelado utilizando AndroMed, Triladyl y base Tris.

Tipo semen	Dilutor	n	Estáticos (%)	Moviles progresivos (%)	Móviles no progresivos (%)
Fresco		15	42,04	2,37	55,59
Refrigerado	AndroMed®	15	98,08	0,00	1,92
	Triladyl®	15	53,05	1,44	45,51
Descongelado	Base Tris	15	56,98	0,08	42,94
	AndroMed®	15	100,00	0,00	0,00
	Triladyl®	15	84,30	0,14	15,56
	Base Tris	15	88,91	0,12	10,97

En el semen refrigerado, se encontró diferencias altamente significativas ($p < 0,01$) en el porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos, siendo los tratamientos utilizando Triladyl® y base Tris superiores a AndroMed®; lo mismo ocurrió con el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos, siendo superior el tratamiento con Triladyl® en relación a los otros dos.

En el semen descongelado se halló que los espermatozoides diluidos con Triladyl® y base Tris son superiores ($p < 0,01$) al tratado con AndroMed®, ello en el porcentaje de espermatozoides móviles no progresivos.

El porcentaje de motilidad total (móviles no progresivos más móviles progresivos) en semen fresco, refrigerado y descongelado, se muestran en la Figura 1.

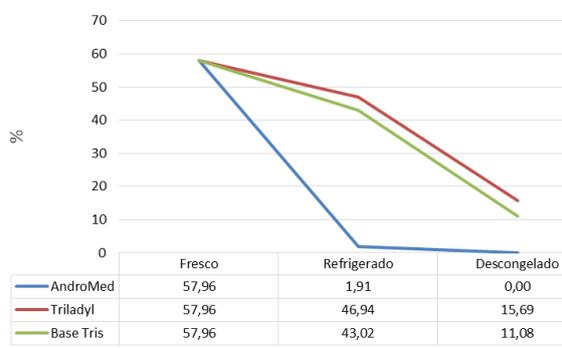


Figura 1. Porcentaje de motilidad total en semen fresco, refrigerado y descongelado usando AndroMed, Triladyl y base Tris.

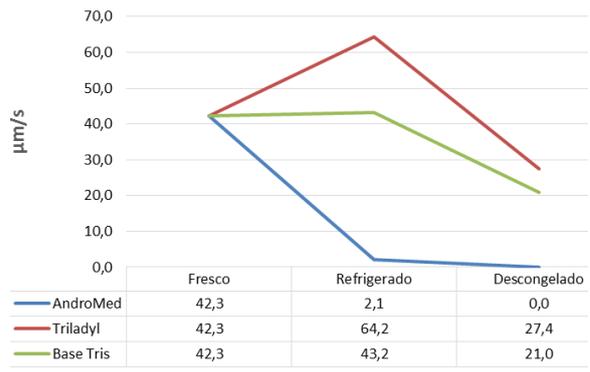


Figura 2. Velocidad curvilínea (VCL) en semen fresco, refrigerado y descongelado usando AndroMed®, Triladyl® y base Tris.

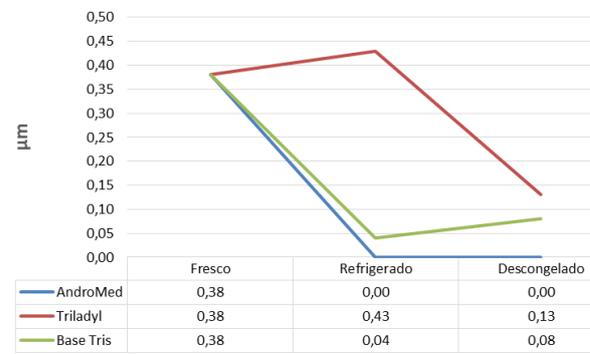


Figura 3. Amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH) en semen fresco, refrigerado y descongelado usando AndroMed®, Triladyl® y base Tris.

Se determinó los parámetros de velocidad de los espermatozoides en fresco, refrigerado y descongelado, en las figuras 2 y 3, se muestran las tendencias de la velocidad curvilínea (VCL) y de la amplitud del movimiento lateral de la cabeza (ALH).

DISCUSION

El volumen seminal fue similar a lo reportado por Ordoñez *et al.* (2012 y 2013) y Quispe (2015), también en alpacas y por el mismo método de colección, e inferior a lo señalado por Giuliano *et al.* (2008) en llamas; la concentración espermática encontrada es inferior a la reportada por Ordoñez *et al.* (2012 y 2013) que se debería a que este estudio se realizó en época de secas y los otros en época reproductiva. Tanto el área y largo de la cabeza del espermatozoide son similares a los reportados por Buendía *et al.* (2002).

La motilidad total en fresco (57,96%) es superior a lo reportado por Morton *et al.* (2007 y 2010), quién empleando espermatozoides epididimarios de machos castrados solamente alcanzaba el 53% de motilidad, las diferencias se deberían precisamente a la procedencia de los espermatozoides; en cambio es similar a lo reportado por Ordoñez *et al.* (2013) en un trabajo realizado en el mismo lugar.

En el presente estudio durante la refrigeración empleando Triladyl® y base Tris se ha obtenido entre 43 y 46% de motilidad, superior a lo reportado por Morton *et al.* (2007) empleando citrato, base tris y lactosa, las diferencias son similares a las indicadas anteriormente. En el año 2010, Morton *et al.*, utilizando base lactosa y Equex STM® obtuvo alrededor de 47% de motilidad similar a la obtenida con este trabajo; pero es inferior a lo reportado por Ordoñez *et al.* (2013) usando base Tris, las diferencias podrían deberse a las diferencias de las épocas de estudio.

Al descongelado de los pelets usando Triladyl® y base Tris obtuvimos 15 y 11% de motilidad, muy superior a lo que obtuvo Morton *et al.* (2007 y 2010) que en el mejor de los casos fue de 1% de motilidad al descongelado, las diferencia se deberían a las distintas procedencias de los espermatozoide de alpacas, dilutores, presencia de plasma seminal. La mala performance que ha tenido AndroMed® desde la refrigeración hasta el descongelado probablemente se haya debido a que éste sea específico para bovinos.

En relación a la VCL y ALH, éstos son inferiores a los reportados por Ordoñez *et al.* (2012) y Quispe (2015), ello se debería que estos trabajos se realizaron en diferentes épocas del año (secas y lluvias). La VCL de los espermatozoides diluidos con Triladyl y base Tris son

similares a los hallados por Quispe (2015), en cambio las ALH son menores a las encontradas por ésta autora, que congeló espermatozoides de alpacas en pajillas, que podría ser una de las razones de dicha diferencias, lo que probablemente también haya influido en los patrones de movimiento de los espermatozoides. En las Figuras 2 y 3, podemos observar que hay una mejora de la VCL y ALH en el semen refrigerado con base Tris y Triladyl® en relación al semen fresco, esta podría atribuirse a una capacitación espermática anticipada en esta fase.

CONCLUSIÓN

Hasta la refrigeración se tiene buenos porcentajes de motilidad en el semen diluido con Triladyl® y base Tris, que nos permitiría el transporte de semen a lugares distantes 10 horas del lugar de colección. Para el semen congelado en pelets aún falta afinar protocolos que nos permitan tener parámetros espermáticos similares a los que se tienen en refrigeración.

REFERENCIAS

- Buendía P, Soler C, Paolicchi F, Gago G, Urquieta B, Pérez-Sánchez F, Bustos- Obregón E. Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer –assited system. *Theriogenology*. 2002; 57: 1207-1218
- Director A, Giuliano S, Trasorras V, Carretero I, Pinto M, Miragaya M. Electroejaculation in llama (*Lama glama*). *Journal of Camel Practice and Research*. 2007; 2: 203-206.
- 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
- Graham EF, Schmell MK, Eversen BK, Nelson DS. Semen preservation in nondomestic mammals. *Symp. Zool. Soc. London*. 1978; 43: 153 – 173
- Morton KM, Evans G, Maxwell WM. Effect of glycerol concentration, Equex STM ® supplementation and liquid storage prior to freezing on the motility and acrosome integrity of frozen-thawed epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm. *Theriogenology*. 2010; 74: 311 – 316
- Morton KM, Bathgate R, Evans G, Maxwell WM. Cryopreservation of epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm: a comparison of Citrate, Tris and Lactose based diluents, and pellets and straws. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007; 19: 792 – 796.
- Ordoñez C, Ampuero E, Cucho H, Franco E. Avances en la determinación de la velocidad del espermatozoide de alpaca en semen diluido usando el Integrated Sperm Anaysis System (ISAS). *Spermova*. 2012; 2: 63 – 64.

- Ordóñez C, Cucho H, Ampuero E, Antezana W, Cayo S. Inseminación artificial de alpacas con semen fresco, refrigerado y descongelado colectado por electroeyaculación. Spermova. 2013; 3: 65 – 66.
- Quispe D. Evaluación reproductiva del plantel de reproductores del Banco de Germoplasma de alpacas de color del CICAS LA Raya. Tesis Ingeniero Zootecnista. Cusco, Perú. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, 2015. 94 pp.