

INSEMINACIÓN ARTIFICIAL DE ALPACAS CON SEMEN COLECTADO POR ASPIRACIÓN VAGINAL Y VAGINA ARTIFICIAL

ARTIFICIAL INSEMINATION OF ALPACAS WITH SEMEN COLLECTED BY VAGINAL ASPIRATION AND BY ARTIFICIAL VAGINA

Virgilio Alarcón B.¹, Wilber García V.², P. Walter Bravo³

RESUMEN

Semen de alpaca fue colectado por dos métodos: por aspiración de la vagina de la hembra después de la monta natural y con vagina artificial. El semen colectado fue evaluado y diluido con Tris tamponado, y luego usado en inseminación artificial. Se trabajó con 160 alpacas hembras adultas de capacidad reproductiva comprobada y 5 alpacas machos. Se colectó semen post cópula de los cinco machos en 10 hembras, y se hicieron 50 colecciones de semen con vagina artificial de estos machos, dos veces por semana. Se determinó volumen, motilidad, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos, viscosidad y color. Los resultados para semen colectado por aspiración de la vagina y con vagina artificial fueron: volumen (3.6 y 1.5 mL), motilidad (73.4 y 69.0%), concentración espermática (75.2 y 80.3 millones/mL), espermatozoides vivos (75.3 y 70.8%), respectivamente, con diferencia entre métodos ($p < 0.05$). El color fue mayormente rojo claro (80%) y la consistencia seminal semiviscosa (90%) en el semen colectado de la vagina natural, y blanco lechoso (60%) y viscoso (90%) en semen colectado por vagina artificial. El diagnóstico de gestación por ecografía a los 30 días de la inseminación indicó una tasa de preñez de 55% (55/100) con semen colectado por aspiración vaginal y de 48% (24/50) con semen de la vagina artificial ($p < 0.01$). Se concluye que con la colección de semen por aspiración se logra mayor volumen, mejor calidad y menor viscosidad del semen y mayor porcentaje de preñez que usando semen colectado con vagina artificial.

Palabras clave: alpaca, colección de semen, inseminación artificial, aspiración vaginal, vagina artificial

ABSTRACT

Semen from alpacas was collected by two methods: by aspiration from the female's vagina following mating and with an artificial vagina. Semen was collected, evaluated and extended with Tris buffer, and then used in artificial insemination. Altogether 160 female alpacas with proven reproductive history and five males were used. Semen was collected by vaginal aspiration from 10 females using five males as semen donors; likewise,

¹ Centro Experimental La Raya, Universidad Nacional San Antonio Abad, Cusco

² Centro de Investigación IVITA-Maranganí, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

³ Carrera Profesional de Medicina Veterinaria, Canchis, Universidad Nacional San Antonio Abad, Cusco. E-mail: pwbravo@gmail.com

semen from the same males was collected with an artificial vagina twice a week 50 times. Volume, motility, spermatic concentration, live spermatozoa, viscosity and color was evaluated. Seminal characteristics of semen collected by aspiration and with an artificial vagina were: volume (3.6 and 1.5 mL), motility (73.4 and 69.0%), sperm concentration (75.2 and 80.3 million/mL), live spermatozoa (75.3 and 70.8%) respectively, with statistical difference between methods ($p < 0.05$). Semen was mainly light red (80%) and showed a semi viscous consistency (90%) in semen collected by aspiration, and milky white (60%) and viscous (90%) from artificial vagina. Pregnancy diagnosis by ultrasonography 30 days after insemination was 55% (55/100) when using semen by aspiration and 48% (24/50) when using semen from artificial vagina ($p < 0.01$). Semen collection from the vagina following mating yielded greater volume, better quality, and semi viscous consistency, and the percentage of pregnancy was higher than semen from artificial vagina.

Key words: alpaca, semen collection, artificial insemination, vaginal aspiration, artificial vagina

INTRODUCCIÓN

Los primeros trabajos de colección de semen en camélidos sudamericanos (CSA) se hicieron con el uso de fundas vaginales (Mogrovejo, 1952), posteriormente se empleó la electroeyaculación (Fernández-Baca y Calderón, 1965), y actualmente se emplea la vagina artificial con una cérvix simulada y dentro de un maniquí en posición copulatoria (Sumar y Leyva, 1981). La vagina artificial tiene que ser mantenida a la temperatura corporal de la hembra con el apoyo de una frazadilla eléctrica (Bravo *et al.*, 1997a) para permitir que el macho no interrumpa la cópula.

El uso de la vagina artificial ha facilitado el estudio del semen en CSA y, actualmente, el nivel de conocimiento de la fisiología del espermatozoide es comparable a otras especies de granja (Garnica *et al.*, 1993; Lichtenwalner *et al.*, 1996; Bravo *et al.*, 2002); sin embargo, esta técnica tiene el inconveniente de que los machos requieren ser entrenados y algunos no aceptan fácilmente el maniquí. Por otro lado, en algunas oportunidades se requiere coleccionar semen de machos que viven en lugares distantes a los centros de investigación y no siempre se dispone del tiempo, y facilidades necesarias para su entrenamiento.

La inseminación artificial (IA) es una técnica reproductiva ampliamente utilizada en diversas especies domésticas, donde el semen previamente procesado es depositado en el aparato reproductor de la hembra en el momento oportuno del ciclo estrual. El uso y ventajas de esta técnica se aprecian más en el desarrollo de la industria vacuna lechera, donde se han producido importantes mejoras genéticas para la producción de leche, especialmente en ganado Holstein. Los trabajos de IA en CSA son escasos, debido a que la colección de semen es laboriosa por el tipo y duración de la cópula; no obstante, en los últimos años se han dado avances importantes en el proceso de congelación de semen (Apaza *et al.*, 2001; Bravo *et al.*, 2008).

Los objetivos de este trabajo fueron comparar la calidad de semen colectado directamente de la vagina luego de la monta con macho fértil y del semen colectado con vagina artificial, así como su aplicación en IA en la alpaca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio y Animales

El estudio se realizó entre enero a abril de 2009 en el Centro Experimental de

Camélidos Sudamericanos “La Raya” de la Universidad Nacional San Antonio Abad – UNSAAC, situado en el distrito de Marangani, región Cusco, Perú, a una altitud de 4200 msnm.

Se utilizaron 160 alpacas hembras de 3 a 7 años y 5 alpacas machos Huacaya de 4 a 8 años de edad. Los animales se mantuvieron en pasturas naturales de la estación experimental y las hembras fueron parte de un rebaño y se distinguieron por dos colores de cintas en el arete. Los machos se emplearon tanto para la cópula del grupo de alpacas que se les realizó la aspiración vaginal de semen como para la colección de semen con vagina artificial.

Colección de Semen por Aspiración Vaginal

Se seleccionaron 10 alpacas vacías adultas, con tres semanas postparto, sin infecciones uterinas, y sexualmente receptivas al macho. Cada hembra fue empadrada con un macho entero. La frecuencia de colección de semen fue dos veces por semana y el tiempo de cópula fue 17 ± 6 minutos. Luego de la monta, se le sujetó y se limpió la zona perineal con agua jabonosa. Se insertó un espéculo vaginal y la os externa de la cérvix fue localizada con la ayuda de una fuente de luz adosada al espéculo vaginal. El semen que se encontraba en la vecindad de la os externa (Neely y Bravo, 1998) fue colectado con el espéculo y depositado en un tubo de vidrio graduado y mantenido a 37 °C.

Colección de Semen por Vagina Artificial

Se utilizó el método de la vagina artificial modificada (Bravo *et al.*, 1997a), que consta de un tubo de PVC de 20 cm de largo por 4 cm de diámetro. La vagina artificial contiene aire a presión y agua caliente que debe mantenerse entre 38 a 40 °C. La vagina artificial se cubrió con una frazadilla eléctrica para mantener una temperatura constante y se colocó dentro de un maniquí. Los

machos fueron adiestrados por 15 días para la recolección de semen y luego de un descanso de una semana se procedió a la colecta del semen del estudio. La frecuencia de colección de semen fue dos veces por semana y el tiempo de cópula fue 18 ± 5 minutos.

Evaluación del Semen

El semen fue conservado a 37 °C en baño maría entre su colección y la evaluación. La evaluación del semen se llevó a cabo 1 a 2 minutos después de su colección. El volumen del eyaculado fue determinado comparando con la escala del tubo colector. El color fue clasificado como blanco cristalino, blanco lechoso, rojizo claro y rojizo oscuro. La motilidad espermática fue determinada tomando 10 μ L de semen en una lámina portaobjetos precalentada, cubriéndola con una laminilla y observada a 400X en un microscopio de contraste de fase. La motilidad se calificó como porcentaje de espermatozoides con movimiento oscilatorio en un campo microscópico.

El porcentaje de espermatozoides vivos se determinó en una muestra de semen coloreada con colorante vital de Hancock, proporcionado por la Sociedad de Teriogenología. Se contó un mínimo de 100 espermatozoides, considerándose espermatozoides vivos aquellos donde el colorante no penetró en la cabeza. La concentración espermática fue evaluada usando el método del hemocitómetro en una cámara de Neubauer. Una muestra de semen se diluyó 1:50 o 1:100 de acuerdo a la evaluación previa de la motilidad en solución de NaCl al 3%. La concentración espermática se expresó en millones de espermatozoides por mililitro.

Inseminación Artificial

El semen fue diluido en Tris tamponado de acuerdo a Bravo *et al.* (1999), hasta una concentración final de 10×10^6 /mL y se mantuvo a 37 °C hasta el momento de la IA. El servicio se realizó aproximadamente a los 15 minutos de la colección del semen.

Las hembras que tomaban la posición copulatoria frente a un macho vasectomizado fueron inducidas a ovular con la administración endovenosa de 750 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) por animal (San Martín *et al.*, 1968).

La IA se realizó a las 26 horas de la inducción de la ovulación. La región vulvar fue limpiada con una toalla húmeda y se introdujo el espéculo vaginal para identificar la os externa de la cérvix. El semen diluido fue cargado en una pipeta de inseminación de vacunos y se introdujo dentro del cuerpo del útero. Primero se inseminaron 100 alpacas con semen colectado por aspiración vaginal, y luego 50 alpacas con semen colectado con vagina artificial. La diferencia en el número de alpacas inseminadas se debió a la disponibilidad de animales en el centro experimental. El diagnóstico de preñez se hizo por ecografía a los 30 días del servicio. La presencia de la vesícula embrionaria dentro del útero fue considerada como preñez.

Diseño Experimental

Las características seminales de los dos métodos de colección de semen fueron comparados usando la prueba de "t" Student. La transformación \sqrt{x} (x= porcentaje) fue aplicada a las variables que no presentaron distribución normal y luego se realizó el análisis de varianza. El porcentaje de preñez se analizó con la prueba de Chi cuadrado.

RESULTADOS

Se obtuvo semen de 50 cópulas, pero se descartaron cuatro por contaminación con orina (color amarillento) y cinco por presentar un color rojo oscuro. Así mismo, de las 50 colectas de semen con vagina artificial, siete fueron inconclusas debido al desinterés sexual del macho por el maniquí, y cinco fueron descartadas por contaminación con orina.

Los resultados de la evaluación espermática se encuentran en el Cuadro 1. El volumen, motilidad, y el número de espermatozoides vivos fueron superiores en el semen colectado por aspiración vaginal ($p < 0.05$), en tanto que la concentración espermática fue superior ($p < 0.05$) en el semen obtenido con vagina artificial. Asimismo, el 90% de los eyaculados colectados con vagina artificial presentaron alta viscosidad en comparación con el 10% de los eyaculados recuperados por aspiración vaginal.

La tasa de preñez obtenida con semen colectado por aspiración vaginal fue de 55% (55/100), estadísticamente superior ($p < 0.01$) al 48% obtenido con vagina artificial (24/50).

DISCUSIÓN

Se comparó dos métodos de colección de semen de alpaca. El primero fue el método de la vagina artificial, introducido en 1981 (Sumar y Leyva, 1981), mejorado en 1997 (Bravo *et al.*, 1997a) y utilizado ampliamente como herramienta de apoyo en estudios de fisiología del semen. El segundo método, la recuperación del semen por aspiración vaginal después de la monta natural, llamado simplemente método post cópula, e introducido con fines clínicos en 1998 (Neely y Bravo, 1998).

Los dos métodos fueron viables y aplicables; sin embargo, el método de aspiración vaginal mostró mayores ventajas. Es un método que no necesitó el entrenamiento de machos a la vagina artificial, no alteró la conducta sexual del macho, y no requirió de un maniquí en posición copulatoria ni de una vagina artificial con todos sus accesorios, ya que solo requiere de una hembra receptiva al macho y el espéculo vaginal. Aproximadamente, solo un 60% de los machos responden al entrenamiento con el maniquí, dado la naturaleza nerviosa propia de la especie (Aller *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Características seminales de cinco machos alpacas de eyaculados colectados por aspiración vaginal después de la monta (n = 41) y con vagina artificial (n = 38)

| VARIABLES | 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) | 75.2 ± 20.3 ^a | 80.3 ± 25.5 ^b |
| Espermatozoides vivos (%) | 75.3 ± 7.2 ^a | 70.8 ± 12.7 ^b |
| Consistencia (%) | | |
| - Viscoso | 10 | 90 |
| - Poco viscoso | 90 | 10 |
| Color (%) | | |
| - Rojo claro | 80 | 0 |
| - Rojo oscuro | 10 | 0 |
| - Blanco lechoso | 5 | 60 |
| - Blanco cristalino | 5 | 40 |

^{a,b} Superíndices diferentes dentro de filas difieren significativamente (p<0.05)

El semen colectado por aspiración vaginal fue de poca viscosidad y de un color rojo claro, lo que se debió a la presencia de fluidos uterinos y de sangre de la hembra. En este sentido, el semen colectado se podría catalogar como hemático e hizo que la muestra sea más manejable en términos de evaluación y adición del dilutor. Muestras de semen colectadas con vagina artificial fueron viscosas y se necesita de la adición de una enzima, colagenasa (Bravo *et al.*, 2000) para reducir la viscosidad y poder proceder a la evaluación correspondiente. Esto no sucede con muestras colectadas post cópula permitiendo un ahorro de tiempo en la evaluación del semen y proceder a la dilución luego de la determinación de la concentración espermática. La presencia de sangre en la muestra de semen podría ser de preocupación para una persona experimentada en evaluación de semen de otras especies de granja, pero se debe entender que es parte de la fisiología normal de alpacas. La sangre se debe al daño que hace el proceso peneano del macho en el endometrio uterino (Velez,

1997); no obstante, el efecto del suero sanguíneo de la hembra y en contacto al semen del macho dentro del útero queda por elucidar.

Las características seminales encontradas en este estudio por ambos métodos de colección son similares a reportes en alpacas (Garnica *et al.*, 1993; De la Vega, 1996; Bravo *et al.*, 1997a, 1997b, 2000; Bravo, 2008) y llamas (Aller *et al.*, 2003); sin embargo, las características seminales del semen colectado por el método de aspiración vaginal fueron mejores a aquellas del semen colectado con vagina artificial. En este respecto, la motilidad, el porcentaje de espermatozoides vivos y menor porcentaje de espermatozoides muertos hace nuevamente esta técnica más atractiva. La menor proporción de espermatozoides vivos por el método de vagina artificial podría indicar un efecto adverso de las fundas de latex usadas en la vagina artificial. Este efecto negativo ha sido sugerido en alpacas (Urquieta *et al.*, 2005), llamas (Giuliano *et al.*, 2008), y camellos (Sieme *et al.*, 1990).

El mejor porcentaje de preñez (55%) con semen colectado por aspiración vaginal es promisorio y necesita ser validado en condiciones de campo, especialmente a nivel de comunidades alpaqueras donde los propietarios de alpacas desean usar el semen de sus machos. La tasa de preñez fue similar a otros reportes con semen obtenido con vagina artificial en alpacas (Bravo *et al.*, 1997a, 2008; Apaza *et al.*, 2001; Ponce, 2003) y llamas (Aller *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

- La colección de semen de la vagina de la hembra después de la cópula es una técnica fácil de realizar.
- Se obtuvo un mayor volumen del eyaculado y de mejor calidad en términos de motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos, y tiene poca viscosidad en comparación al semen colectado con vagina artificial.
- Se obtuvo mayor porcentaje de preñez usando semen obtenido por aspiración vaginal en comparación con el método de la vagina artificial.

LITERATURA CITADA

1. **Aller F, Rebuffi G, Cancino A, Alberio R. 2003.** Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch Zootec 52: 15-23.
2. **Apaza N, Sapana R, Huanca T, Huanca W. 2001.** Inseminación artificial en alpacas con semen fresco en comunidades campesinas. Rev Invest Vet, Perú Supl 1: 435-438.
3. **Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997a.** Collection of semen and artificial insemination of alpacas. Theriogenology 47: 619-626.
4. **Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997b.** Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. Biol Reprod 57: 520-526.
5. **Bravo PW. 1998.** Avances en fisiología reproductiva del macho llama y alpaca. En: XXI Reunión Científica Anual Asociación Peruana de Producción Animal. Puno, Perú: APPA. p 15-21.
6. **Bravo PW, Pacheco C, Quispe G, Vilcapaza L, Ordoñez C. 1999.** Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. Arch Androl 43: 239-246.
7. **Bravo PW, Ccallo M, Garnica J. 2000.** The effect of enzymes on semen viscosity in llamas and alpacas. Small Rumin Res 38: 91-95.
8. **Bravo PW, Moscoso R, Alarcon V, Ordoñez C. 2002.** Ejaculatory process and related semen characteristics of llamas and alpacas. Arch Androl 48: 65-72.
9. **Bravo PW, Alarcon V, Ordoñez C. 2008.** Experiences in artificial insemination of llamas and alpacas. ICAR 2008 Satellite Meeting on Camelid Reproduction. Budapest, Hungary: ICAR. p 23-27.
10. **De la Vega D. 1996.** Efecto de la concentración espermática y la hora de inseminación artificial con semen fresco sobre el porcentaje de gestación en alpacas. Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Puno: Universidad Nacional San Antonio Abad. 50 p.
11. **Fernández-Baca S, Calderón W. 1965.** Métodos de colección de semen de la alpaca. Rev Fac Med Vet, Lima 18-19-20: 13-17.
12. **Garnica J, Achata R, Bravo W. 1993.** Physical and biochemical characteristics of alpaca semen. Anim Reprod Sci 32: 85-89.
13. **Giuliano S, Director A, Gambarrota M, Trasorras V, Miragaya M. 2008.** Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). Anim Reprod Sci 104: 359-369.
14. **Lichtenwalner AB, Woods GL, Weber JA, 1996.** Ejaculatory patterns of llama during copulation. Theriogenology 46: 285-291.

15. **Mogrovejo D. 1952.** Estudios de semen de la alpaca. Tesis de Bachiller. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 21 p.
16. **Neely DP, Bravo PW. 1998.** Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. In: Youngquist RS (ed). Current therapy in large animal theriogenology. USA: WB Saunders. p 787-792.
17. **Ponce R. 2003.** Inseminación artificial en alpacas utilizando semen fresco. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Puno: Universidad Nacional San Antonio Abad. 107 p.
18. **San-Martín M, Copaira M, Zuñiga R, 1968.** Aspects of reproduction in the alpaca. J Reprod Fertil 16: 395-399.
19. **Sieme H, Merkt H, Musa B, Badreldin H, Willmen T. 1990.** Liquid and deep freeze preservation of camel semen using different extenders and methods. In: Proc. of the Workshop "Is it possible to improve the Reproductive performance of the Camel". Paris. p 273-283.
20. **Sumar J, Leyva V. 1981.** Colección de semen mediante la vagina artificial en alpaca. En: Resúmenes IV Conf. Internacional en Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas, Chile.
21. **Urquieta B, Conde P, Muñoz C, Bustos-Obregón E, Garcia-Huidobro J. 2005.** Alpaca semen characteristics under free and directed mounts during a breeding period. Anim Reprod Sci 90: 329-339.
22. **Vélez C. 1997.** El efecto de la cópula del macho en el endometrio uterino de la hembra, aspectos histológicos y ecográficos. Tesis de Médico Veterinario. Arequipa: Universidad Católica Santa María. 68 p.