

# CAPACITACION ESPERMATICA *IN VIVO* DE ESPERMATOZOIDES DEL CONDUCTO DEFERENTE DE ALPACAS (*VICUGNA PACOS*)

Joel I. Pacheco Curie<sup>1,2</sup>; Pedro Villalta Rojas<sup>1</sup> y Dino Barriga Ramos.

1.- Laboratorio De Reproducción animal – Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNA-Puno – Perú

2.- Instituto de Investigación y Promoción de Camélidos Sudamericanos – IIPC-UNA-Puno-Perú

Laboratorio de reproducción Animal-Universidad Nacional del Altiplano-Puno-Perú. Av Floral S/N

[mvz\\_joelpc@hotmail.com](mailto:mvz_joelpc@hotmail.com)

[www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

Volver a: [Reproducción, inseminación artificial y trasplante en camélidos](#)

## RESUMEN

El Presente estudio se realizó con los objetivos de determinar el tiempo de capacitación espermática, el porcentaje de hiperactivación espermática, el porcentaje de reacción acrosómica *in vivo* de espermatozoides colectados del conducto deferente de alpacas. Se utilizaron dos machos con desviación de los conductos deferentes para la obtención de espermatozoides y 8 hembras, los espermatozoides fueron recuperados directamente de los oviductos de las hembras a las 2, 4, 6, 8 y 10 horas después de la inseminación artificial, los espermatozoides fueron evaluados antes y después de su incubación con lisofosfatidilcolina para determinar el porcentaje de capacitación espermática y el porcentaje de reacción acrosómica, se determinó el porcentaje de hiperactivación espermática mediante la observación y conteo de espermatozoides que mostraron el patrón de hiperactividad; se concluye que el mayor porcentaje se presentó a las 6 horas post inseminación artificial.

Palabras clave: capacitación espermática, conducto deferente, inseminación, alpacas

## ABSTRACT

The Present work was carried out with the objectives of determining the time of sperm capacitation, the percentage of sperm hiperactivación, the percentage of acrosome reaction *in vivo* of sperms collected of the deferent conduit of alpacas. Two males were used with deviation of the deferent conduits for the obtaining of sperms and 8 females, the sperms were recovered directly of the oviducts from the females to 2, 4, 6, 8 and 10 hours after the artificial insemination, the sperms were evaluated before and after their incubation with lisophosphatidilcholine to determine the percentage of sperm capacitation and the percentage of acrosome reaction, the percentage of sperm hiperactivación was determined by means of the observation and count of sperms that showed the hiperactividad pattern; you concludes that the biggest percentage you presents at the 6 hours post artificial insemination.

Words key: sperm capacitation, deferent conduit, insemination, alpaca.

## INTRODUCCION

La colección de semen en camélidos sudamericanos representa un problema debido a la naturaleza del semen y la duración de la copula, para lo cual se desarrollaron diferentes métodos de colección, de los cuales el mas utilizado es la vagina artificial (Sumar, J. y Leyva, V., 1981), dicho semen necesita ser degelificado utilizando enzimas (Bravo, W. *et al.*, 1999), una alternativa a este método es la colección de espermatozoides por desviación del conducto deferente (Paricahua, E., 2001), los espermatozoides colectados mediante esta técnica son de fácil manipulación y no necesitan degelificacion.

Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas de la colección espermática en alpacas con desviación de conductos deferentes, se determinó también la sobrevivencia espermática de estos espermatozoides con el uso de dilutores en base a tris, citrato, PBS, yema de huevo y suero fetal, las características son: volumen: 0.091 mL, pH: 6.25; vitalidad: 62.47 %; concentración: 223 870/mm<sup>3</sup> y anormales: 25.98 % (Quintano, J., 2001).

Al comparar espermatozoides epididimales con espermatozoides de eyaculado completo, los espermatozoides epididimales tuvieron muy bajos índices de unión a las células oviductales en comparación de los espermatozoides de eyaculado completo, lo que podría indicar que existen componentes del plasma seminal que facilitarían esta unión y la interacción entre los espermatozoides con las células oviductales (Petrunkina, A.M., *et al.*, 2001). Durante el periodo de adherencia de los espermatozoides a las células oviductales, se mantiene la viabilidad espermática y el proceso de capacitación se retarda, esta prolongación de la vida espermática maximiza las probabilidades de concepción cuando el eyaculado no coincide con el momento de la ovulación (Smith, T.T., 1998)

Los espermatozoides epididimales de humanos adquieren la capacidad fecundante y de motilidad al interactuar con los fluidos lumbales del epidídimo, luego de la eyaculacion, estas características disminuyen, entonces los

espermatozoides no son capaces de fertilizar al ovulo, puesto que se reduce su habilidad de fertilizar al ovulo y se convierte en una célula decapacitada; una continua incubación de espermatozoides con células oviductales ó su residencia en el tracto genital femenino recapacita a los espermatozoides (De Lamirande, E. *et al.*, 1997). Los espermatozoides epididimales o colectados de los conductos deferentes presentan un proceso de capacitación diferente debido a la fuente anatómica de donde fueron colectados, se ha demostrado que espermatozoides colectados del conducto deferente del gato, son capaces de fertilizar ovocitos *in vitro* sin necesidad de ser capacitados (Bowen, R., 1977).

La reacción acrosómica es un requisito para la penetración del espermatozoide al ovulo; ocurre la fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa y resulta en la destrucción total de la membrana plasmática por su fusión con la membrana acrosomal externa, esta reacción se realiza para permitir la gradual penetración del espermatozoide en las cubiertas del ovulo (Ramalho-Santos, J. *et al.*, 2002).

La determinación de la hiperactivación de espermatozoides recuperados del oviducto mediante lavado con medios de incubación, se puede realizar mediante la técnica de la microfilmación, donde observamos el comportamiento de los espermatozoides, denominando espermatozoides hiperactivados a aquellos que presentan gran amplitud de onda en los movimientos flagelares (Overstreet, J.W. *et al.*, 1980).

El conocimiento de este proceso fisiológico podría aplicarse a la inseminación artificial con semen fresco con espermatozoides libres de las secreciones de las glándulas anexas, inseminando dentro el rango de vitalidad y estado fisiológico del espermatozoide dentro del tracto reproductivo de la hembra, aumentando así el potencial reproductivo y la multiplicación de animales sobresalientes en características productivas. Los objetivos del presente estudio fueron: determinar el tiempo de capacitación espermática, determinar el porcentaje de espermatozoides hiperactivados y determinar el porcentaje de acrosomas reactivados en espermatozoides del conducto deferente *in vivo*.

## METODOLOGIA

### MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron dos machos de fertilidad probada, los cuales tuvieron desviación de los conductos deferentes para la obtención de espermatozoides libres de plasma seminal, también se utilizaron 8 hembras en edad reproductiva

### LUGAR DE EJECUCION

El presente estudio fue ejecutado en el CIP-La Raya de la UNA-Puno a una altura de 4321 m y en el CE-La Raya de la UNSAAC-Cusco a una altura de 4200 m.

### METODOLOGIA

Las hembras fueron inseminadas con espermatozoides obtenidos de machos con desviación de los conductos deferentes (hora 0), luego se les realizó una laparotomía, desde la hora 4 hasta la hora 8 horas post monta, cada 2 horas a 2 hembras respectivamente, se realizó también laparotomías a las 2 y 10 horas de forma referencial; Se les extirpó los oviductos mediante una laparotomía mediana preumbilical. Los oviductos fueron mantenidos en suero fisiológico a 39°C, luego colocados en una placa Petri, donde se realizó el lavado del oviducto por perfusión de PBS temperado desde la zona del istmo hacia el infundíbulo, el líquido recuperado se colocó en un vial de 3 mL. el mismo que se mantuvo en baño María a 39°C, de donde se extrajo una muestra y se evaluó bajo microscopio óptico a 400X. Se utilizó la coloración de Eosina+Nigrosina, se colocó una gota de muestra y una gota de colorante, luego se deja secar por 30 min, luego se rociaron las láminas con solución de formaldehído al 4 %, y posteriormente se colocó Giemsa, se dejó secar y luego se lavó, posteriormente se evaluó bajo Microscopía de Contraste de Fases.

Se adicionó 10 ul de lisofosfatidilcolina a una concentración de 100 µg/ml a los viales con el fluido recuperado de los oviductos, se dejó incubar a 39°C por 15 minutos, luego de este tiempo se extrajo muestras para realizar tinciones diferenciales y luego evaluarlos bajo Microscopía de Contraste de Fases para determinar el porcentaje de reacción acrosómica.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los porcentajes de reacción acrosómica y de hiperactivación espermática en espermatozoides del conducto deferente recuperados del oviducto a las 4, 6 y 8 horas post inseminación sometidos a un análisis de Ji-Cuadrado ( $X^2$ ), revelan que existe diferencia estadística entre los diferentes valores, donde el valor superior se encuentra a las 6 horas de permanencia en el oviducto, descendiendo bruscamente a las 8 horas. Este comportamiento nos estaría indicando que la capacitación espermática de estos espermatozoides del conducto deferente se estaría completando a las 6 horas, a partir de donde inicia el descenso de su funcionalidad.

Los espermatozoides del conducto deferente, libres de las secreciones de las glándulas anexas, se encontrarían precapacitados, puesto que uno de los pasos de la capacitación es eliminar moléculas absorbidas del plasma seminal y sustancias decapacitantes de origen seminal (Roldan, E.R.S. 1996; Chang, M.C. 1984), entonces la capacitación en estos espermatozoides se acelera y se presenta desde las 4 horas post inseminación artificial.

La baja sobrevivencia espermática puede deberse al uso del dilutor PBS, teniendo en cuenta que solo actúa como un medio tampón y no se encuentra enriquecido con substratos energéticos; es conocida la debilidad de los espermatozoides del conducto deferente pues se encuentran desprotegidos de las secreciones de las glándulas anexas (Pacheco, J.I. 2004), estos factores podrían ser la causa de esta mortalidad temprana.

Los espermatozoides se liberan del coágulo seminal recién a las 16 horas, hora en que inician su ingreso hacia el oviducto (Moscoso, J. 1994) retardando su capacitación hasta el momento óptimo, por cuanto estos espermatozoides del conducto deferente al encontrarse libres de secreciones de glándulas anexas no necesitan esperar la licuefacción del coagulo de plasma seminal (Bravo, W. 2002) y a las 2 horas ya se encuentran dentro del oviducto, demostrando que aproximadamente un tercio de la población ya presenta capacitación espermática a las 4 horas post inseminación, alcanzando su máximo porcentaje a las 6 horas

Luego de incubar con lisofosfatidilcolina a los espermatozoides recuperados del oviducto, se observó un incremento de espermatozoides capacitados al presentar reacción acrosómica (Parrish, *et al.* 1989<sup>a</sup>), observando la diferencia aritmética a las 4 horas el porcentaje de capacitación espermática determinada por la incubación con lisofosfatidilcolina, que fue de 55.42 %, incrementándose a un máximo porcentaje de 60.48 % a las 6 horas y descendiendo luego a 46.16% a las 8 horas, lo que indica que la mayor proporción de capacitación espermática se encuentra a las 6 horas post inseminación artificial

Estos espermatozoides no tuvieron contacto con las secreciones de las glándulas anexas, por lo cual no sucede la necesidad de interactuar con las células oviductales para liberarse de sustancias decapacitantes de origen seminal como ocurre en el proceso de capacitación espermática en espermatozoides de semen entero (Roldan, E.R.S. 1996); los espermatozoides se encuentran desprotegidos de las secreciones de las glándulas anexas, las que proveen también substratos energéticos (Bedford, J.M. 1970), motivo por el cual estos espermatozoides son de vida corta, presumiblemente por desgaste energético, se pudo observar que a las 10 horas post inseminación la totalidad de los espermatozoides están muertos, la cual estaría iniciándose a partir de las 8 horas post inseminación. Tanto en la evaluación pre y post incubación con lisofosfatidilcolina, los resultados indican una alta presencia de espermatozoides capacitados, teniendo su pico a las 6 horas a partir de la cual comienza a descender llegando a la mortalidad espermática completa.

Puesto que no se observan elevados porcentajes de capacitación, asumimos que existe un sesgo en la unión de espermatozoides y células oviductales al no existir moléculas de origen seminal que sirven en el reconocimiento y unión de los espermatozoides con las células oviductales, disminuyendo esta interacción dentro del proceso de capacitación (Suárez, S. 1998; Green, C.E. *et al.* 2001), este fenómeno ha sido observado en espermatozoides epididimales de porcino, en los que se observó bajos índices de unión espermatozoide-célula epitelial del oviducto (Petrunkina, A.M., *et al.* 2001).

La sobrevivencia de estos espermatozoides es limitada a partir de las 10 horas y por ende el proceso de capacitación espermática se presenta en menor tiempo; las curvas de capacitación espermática, hiperactivación y reacción acrosómica también mantienen una gran relación de acuerdo al tiempo de recolección del oviducto, lo cual nos estaría demostrando la gran actividad de retardo de la actividad de los espermatozoides que tiene el plasma seminal al retardar la demostración de la capacitación espermática en espermatozoides de semen entero, lo cual no sucede en espermatozoides del conducto deferente libres de secreciones de glándulas anexas (Petrunkina, A.M., *et al.* 2001).

Los porcentajes encontrados al análisis de estos tres grupos (4, 6 y 8 horas), muestran el mayor porcentaje a las 6 horas de permanencia dentro el oviducto, iniciando su actividad a las 4 horas y descendiendo de manera brusca a las 8 horas, por lo que asumimos que estos espermatozoides no sobreviven mas allá de esta hora, así se demostró recuperando espermatozoides a las 10 horas de forma referencial donde se encontró a toda la población de espermatozoides muertos, también de manera referencial, se recupero espermatozoides a las 2 horas después de la inseminación, encontrando que estos espermatozoides aun no iniciaban su actividad, mostraron nula hiperactividad y muy baja respuesta a la inducción de la reacción acrosómica después de incubarlos con lisofosfatidilcolina.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA

- BEDFORD, J.M. 1970. Sperm capacitation and fertilization in mammals. *Biol of Reprod* 2: 128-158.
- BOWEN, R. 1977. Fertilization in vitro of feline ova by spermatozoa from the ductus deferens. *Biol of Reprod* 17, 144-147.
- BRAVO, W.; PACHECO, C.; QUISPE, L. VILCAPAZA, L. y ORDOÑEZ, C. 1999. Degelification of alpaca semen and the effect of dilution rates on artificial insemination outcome. *Arch. Of Andrology* Vol 43: 239-246.
- BRAVO, W., 2002. The reproductive process of south american camelids. Seagull Printing, Salt Lake City. UT. USA.
- CHANG, M.C. 1984. The meaning of sperm capacitation. *J. of Androl* 5, 45-50.
- DE LAMIRANDE, E., LECLERC, P, and GAGNON, C. 1997. Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Human Reprod* 3, 175-194.
- GREEN, C.E., BREDEL, J., HOLT, W.V., WATSON, P.F. and FAZELI, A. 2001. Carbohydrate mediation of boar sperm binding to oviductal epithelial cells in vitro. *J Reprod Fertil* 122, 305-315.
- MOSCOSO, J., 1994. Transporte de gametos en el tracto reproductivo de la alpaca (lama pacos) hembra. Tesis FAZ-UNSAAC. Cusco Perú.

- OVERSTREET, J.W., KATZ, D.F and JOHNSON, L.L. 1980. Motility of rabbit spermatozoa in the secretions of the oviducts. *Biol of Reprod* 22, 1083-1088.
- PACHECO, J. 2004. Fertilidad con Inseminación Artificial en Alpacas utilizando semen Congelado. Tesis FMVZ UNA-Puno Perú.
- PARICAHUA, E. 2001. Evaluación del Eyaculado sin la Secreción de las Glándulas Anexas en Alpacas (*Lama pacos*). Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- PARRISH, J.J; SUSKO-PARRISH, J.L.; HAN-DROW. R.R.; SIMM, M.M. and FIRST, N.L. 1989<sup>a</sup> Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. *Biol of Reprod* 40: 1020-1025.
- PETRUNKINA, A.M., GEHLHAAR, R., DROMMER, W., WABERSKI, D. and TÖPFER-PETERSEN, E. 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *J Reprod Fertil* 121, 889-896.
- QUINTANO, J. 2001. Determinación de la Sobrevivencia de los Espermatozoides de Alpacas (*Lama pacos*) colectados del Conducto Deferente Utilizando tres Dilutores. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
- RAMAHLO-SANTOS, J., SCHATTEN, G. and MORENO, R. 2002. Control of membrane fusion during spermiogenesis and the acrosoma reaction. *Biol of Reprod* 67, 1043-1051.
- ROLDAN, E.R.S. 1996. Mecanismos que preparan a los espermatozoides para la fecundación. Memorias del XIX Curso Internacional de Reproducción Animal. Madrid. España.
- SMITH, T.T., 1998. The modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol of Reprod* 58, 1102-1104.
- SUAREZ, S. 1998. The oviductal sperm reservoir in mammals: mechanism of formation. *Biol of Reprod* 58, 1105-1107.
- SUMAR, J. y LEYVA, V. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*lama pacos*). Memorias de la IV Convención Internacional sobre Camélidos Sudamericanos. Punta Arenas Chile.

[Volver a: Reproducción, inseminación artificial y trasplante en camélidos](#)