

Métodos de colección de semen en camélidos sudamericanos - Methods of semen collection in south american camelids

Pacheco Curie, Joel Iván

MVZ. Estudiante de la Maestría en Ganadería Andina, especialidad de Reproducción Animal-EPG-UNA-PUNO, Perú

REDVET: 2008, Vol. IX, N° 4

Recibido: 11.11.07 / Referencia provisional: F006_RED VET / Referencia definitiva: 040806_RED VET /
Aceptado: 08.03.08 / Publicado: 01.04.08

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040408/040806.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®. Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>

Resumen

La colección de semen depende de una buena y constante producción espermática para que la calidad del semen sea buena. Las técnicas de colección de semen están bastante desarrolladas en otros animales, especialmente en ruminantes domésticos en los cuales ya es un procedimiento de rutina, pero en camélidos, dadas las especiales características reproductivas, anatómicas y fisiológicas de estas especies, esta colección es bastante dificultosa y no existe un protocolo recomendado y una técnica óptima, así como su manejo posterior. Las características seminales son también muy variables y dependen de la forma de colección y existen varios factores que afectan su calidad, así como frecuencia de colección, edad, época, etc., por lo que también se evaluaron y desarrollaron diferentes técnicas de degelificar, diluir, conservar y congelar estas células espermáticas, de acuerdo a la técnica de colección y la especie, así como la utilización de dilutores y crioprotectores utilizados para otras especies, pudiéndose posteriormente utilizar en la evaluación reproductiva de los machos.

Palabras clave: semen | colección | espermatozoides | alpaca | llama

Summary

The collection of semen depends on a good and constant spermatogenic production so that the quality of the semen is good. The techniques of collection of semen enough developed in other animals are, especially in ruminant domestic in which is already a routine procedure, but in camélids, given the special ones characteristic reproductive, anatomical and physiologic of these species, this collection is quite difficult and it doesn't exist a recommended protocol and a good technique, as well as its later handling. The seminal characteristics are also very variable and they depend in the collection way and several factors that affect their quality, exist as well as collection frequency, age, time, etc, for what too were also evaluated and they developed different techniques of degelification, to dilute, to conserve and to freeze these spermatogenic cells, according to the collection technique and the species, as well as the extenders use and crioprotectors used for other species, being able to later on to use in the reproductive evaluation of the males.

Key Words: semen | collection | spermatozoa | alpaca | llama

Este artículo es un trabajo monográfico de revisión sobre el tema utilizando la mayor cantidad de bibliografía referida a la colección espermática en camélidos sudamericanos, realizado dentro del plan de estudios de La Maestría en Ganadería Andina de la Escuela de Post Grado de la Universidad Nacional del Altiplano, 2006.

INTRODUCCION

El comportamiento sexual varía de acuerdo a la especie, y en el caso particular de los camélidos sudamericanos, se presentan características muy peculiares. Las circunstancias de la posición coital y su temperamento nervioso hacen que la obtención de semen presente serias dificultades (Bustinza, 2001). La colección de semen en camélidos sudamericanos tiene grandes inconvenientes, tales como la duración de la cópula, la posición de cópula, el lugar de depósito del semen y el tipo de eyaculación, así como el aspecto del eyaculado, su extrema viscosidad y lo dificultoso de su manejo hizo que durante varias décadas se investigue una técnica óptima para poder extraer este semen y poder manejar los espermatozoides sin que estos pierdan su capacidad fecundante (Solís, 1997).

Las características especiales que presentan los camélidos sudamericanos en cuanto a su reproducción los hacen especies *sui generis*, por lo cual es necesario diseñar técnicas de colección de semen especialmente adecuadas para dichas características como el

prolongado tiempo de copula, la eyaculación intracornual y continua, la extrema viscosidad del semen, etc.; Los objetivos de la presente monografía son: hacer una recopilación de las diversas técnicas de colección seminal desarrolladas en camélidos sudamericanos así como también de las técnicas de manejo y los usos prácticos en que se emplea actualmente y se le puede dar en el futuro dentro la biotecnología reproductiva de estas especies.

COLECCIÓN DE SEMEN EN CAMELIDOS SUDAMERICANOS

Fundas vaginales.- Mogrovejo (1952) realizó el primer ensayo de colección de semen en alpacas, utilizando una funda de látex colocada intravaginalmente antes de la cópula; después de la monta se retiraba la funda que servía de recipiente de semen; con esta técnica se logra colectar semen, presentaba algunos inconvenientes, ya que se interfería con la cópula normal y alargaba el tiempo de monta mas allá de los valores normales; la colocación de la funda dentro del tracto genital y su fijación ofrecía serias dificultades y con frecuencia provocaban lesiones que inhabilitaban a la hembra para su uso posterior; existieron otros intentos de colectar semen con fundas vaginales, realizadas por Palomino, (1962) y Jhonson, (1989). En 1991, Sucapuca, realizó un estudio de colección de semen en alpacas mediante la técnica del preservativo, obteniendo pequeños volúmenes y bajas condiciones espermáticas, (cuadro 1 y 2).

Esponjas vaginales.- Esta investigación fue realizada por San Martín (1961) el cual usa trozos de esponja que se introducen en la parte anterior de la vagina y que absorbe el semen y otros fluidos vaginales, sirviendo como contenedores; el inconveniente de este método es que logra obtener semen muy contaminado y mezclado con los fluidos del tracto genital femenino y esto diluye el semen y lo contamina con bacterias, dificultando así su evaluación, por lo que no se recomienda su uso para fines de inseminación artificial.

Electroeyaculación.- En 1966, Fernández-Baca y Calderón reportaron el uso de la electroeyaculación para la colección de semen de alpacas, utilizando un equipo de fabricación nacional, con una intensidad máxima de 40 voltios, se obtuvieron muestras de semen con la ventaja de realizar la colección sin la necesidad de tener hembras en celo, acortar el tiempo de colección y realizarla a lo largo de todo el año; también se utilizó esta técnica para obtener semen de vicuñas y pacovicuñas (híbrido cruce de alpaca con vicuña) (Fernández Baca y Novoa, 1968). Los resultados de electroeyaculación muestran gran variabilidad entre animales y aun entre el mismo animal, además de obtenerse semen muy diluido con las secreciones de las glándulas anexas, contaminado con semen y baja concentración espermática; Jhonson (1989) obtuvo semen de llamas anestesiadas ó sedadas, se

obtuvo pequeñas cantidades (0.1 a 0.5 ml) con alta concentración pero no todos los intentos fueron exitosos. En 1987, Cárdenas y Col. realizaron un estudio comparativo de colección de semen mediante las técnicas de electroeyaculación y vagina artificial, se utilizó un electroeyaculador Plectron, obteniéndose buenos resultados con 60 cargas eléctricas de 2 segundos de duración, 14 voltios, 4 amperios, 25 ciclos/seg. y 2 seg. de descanso entre cada pulsación, el semen obtenido por este método tuvo diferentes características a las muestras obtenidas mediante vagina artificial.

Fístula uretral.- Este método requiere realizar una fístula quirúrgica en la uretra peniana entre el ano y el escroto; el semen es colectado durante la copula natural, esta técnica se realiza utilizando anestesia epidural y anestesia local para colocar un catéter plástico en la uretra desde el pene hasta la vejiga, el cual sirve para guiar la cirugía y ayuda a identificar la uretra; la insición se realiza en la piel, el músculo bulbocavernoso aislado y se separa la uretra del cuerpo cavernoso; este método no interfiere en la copula y las secuelas post operatorias parecen no afectar al animal (Kubiceck, 1974).

Aspiración vaginal postcoital.- Muestras de semen pueden ser obtenidas por aspiración del fondo de la vagina después de la cópula, ya que una pequeña cantidad de semen es eyaculada al momento de llevar el pene de un cuerno al otro, este método no es invasivo ni tedioso pero la desventaja es que este semen es incompleto, contaminado y diluido con las secreciones del tracto genital femenino, se puede utilizar este semen para realizar la evaluación de espermatozoides como motilidad, vitalidad, morfología; estas muestras frecuentemente se obtienen con residuos sanguinolentos y se ve de un color rosado ya que el endometrio se encuentra inflamado y lacerado por la cópula; la técnica es introducir un espejulo por la vulva previamente aseada y con la ayuda de una fuente de luz se ubica la cérvix, inmediatamente se aspira con una pipeta adosada a una jeringa, la utilización de este tipo de semen para evaluar la fertilidad del macho es muy cuestionada (Bravo, 2002; Neelly y Bravo, 1995).

Vagina artificial.- Esta técnica fue desarrollada por Sumar y Leyva (1981), para lo cual construyeron un maniquí en forma de una hembra sentada en posición de cópula; la vagina artificial fue una modificación de la vagina artificial usada para vacunos y ovinos, la cual consistía en un tubo rígido de 7 cm de diámetro por 25 cm. de largo con una funda interna de látex, un cono de látex al que envolvía un alambre en espiral simulando la cérvix de la alpaca y al final un frasco de colección de semen de ovino ó un tubo de centrifuga, el agua a 45° se coloca por una válvula-espita; los machos aceptaron el maniquí después de un corto entrenamiento; la copula se interrumpía cada 10 minutos aproximadamente para renovar el agua caliente, el semen colectado

varió, dependiendo del macho, el color del eyaculado, independientemente del volumen, fue de un blanco lechoso a blanco claro, este semen no muestra motilidad masal por lo espeso de su consistencia.

La utilización de vagina artificial en combinación con una hembra receptiva es la técnica más óptima de obtener semen de buena calidad, el que se puede utilizar para fines de inseminación artificial, teniendo en cuenta de usar una fuente de calor continuo y la característica que imite a la cervix (Vaughan y Col., 2003).

En un estudio llevado a cabo por Dávalos y Olazábal (2002), se encontró que utilizando hembra receptiva al lado del maniquí incrementaba la calidad del eyaculado obtenido mediante vagina artificial a comparación de solo utilizar el maniquí solo, incrementando el tiempo de cópula de 15.9 a 16.8 minutos.

En Bolivia se trato de mejorar la técnica de la vagina artificial utilizando un maniquí de grupa, el cual es un aditamento que se le coloca a la hembra sin necesidad de contar con un maniquí de cuerpo completo, la técnica es similar a la del maniquí con vagina artificial, además se evaluó otra técnica, que es la de colocar la vagina artificial por desviación del pene en el momento de la penetración, tal como se realiza en vacunos, al comparar las tres técnicas se tuvo una aceptación por parte del macho del 20 % para la técnica del maniquí completo sin hembra receptiva, 80 % para la técnica del maniquí de grupa y un 90 % para la técnica de la desviación del pene al inicio de la cópula, según el autor la ultima técnica es la mas recomendable pues evita la contaminación del eyaculado (Delgado y Col., 2003).

Desviación de los Conductos Deferentes.- Con el fin de coleccionar espermatozoides libres de la secreción de las glándulas anexas en alpacas, se desarrollaron las técnicas de la desviación de los conductos deferentes y la extirpación de la próstata; la primera técnica intenta coleccionar espermatozoides directamente de su reservorio, la cola del epidídimo, sin que estos tengan contacto con las secreciones de las glándulas anexas, desviando quirúrgicamente los conductos deferentes hacia la región ventral del animal ó la cara interna del muslo, formando una fístula permanente en la piel desde donde se puedan coleccionar continuamente sin la necesidad de tener hembra receptiva ni someter a los espermatozoides a la acción de enzimas proteolíticas que intenten licuefactar el coágulo del eyaculado para un mejor manejo espermático (Paricahua y Col., 2001; Quintano, 2002).

Bulbouretrrectomía.- Esta técnica fue desarrollada con la finalidad de obtener espermatozoides sin la secreción de las glándulas bulbouretrales, las cuales, según literatura, son las encargadas de producir el material viscoso del semen entero, el cual causa gran

dificultad en su manipulación; las características del semen obtenido se asemejan e incluso son superiores a las características del semen entero obtenido por vagina artificial, pero se indica una gran dificultad en la técnica quirúrgica por la ubicación de dicho órgano, lo que no permitió realizar esta técnica, optándose por realizar la prostatectomía (Paricahua y Col., 2001).

La técnica de la bulbourectomía para posibilitar la colección de semen de llamas con escaso nivel de viscosidad, para lo cual se describe la técnica, con una insisión en la piel perianal hasta visualizar la uretra pélvica y las glándulas bulbouretrales, las cuales fueron extirpadas, esta técnica dura en promedio 3 horas con una recuperación completa del animal en 17 días (Copa y Col., 2003). Los animales fueron sometidos a una bulbourectomía y luego del reposo post operatorio, se realizó la colección de semen utilizando vagina artificial con la técnica del maniquí de grupa a intervalos de una semana; este eyaculado no posee viscosidad por lo que su manejo es mas fácil y se puede utilizar dilutores usados en otras especies (González y Copa, 2003).

FACTORES RELACIONADOS CON LA COLECCIÓN

Además del tipo de colección, también existen varios factores relacionados con la colección y la calidad de semen obtenido, entre los cuales están:

Frecuencia de colección.- Se realizó un estudio para evaluar el efecto de la repetición de colección de semen usando el método de la vagina artificial, realizando hasta tres colecciones diarias por un periodo de 12 días seguidos, los resultados obtenidos indican que las características mas afectadas por la frecuencia de colección fueron la concentración de espermatozoides, la cual desciende significativamente en la tercera colección, así mismo el porcentaje de anormalidades en la cola se incrementa pero la motilidad, porcentaje de vitalidad y el porcentaje de espermatozoides normales no fue afectada, se vio la diferencia significativa en todas las características al hacer las comparaciones entre individuos; pero a partir del día 10 de colección, casi todos los machos tuvieron un descenso en todas las características seminales e incluso algunos solo eyacularon plasma seminal, especialmente en la tercera colección diaria (Bravo y Col., 1997). En otro estudio similar, se trato de evaluar el efecto de los intervalos de colección a determinadas horas, cada 2, 4, 12 y 24 horas; la respuesta fue de 65, 85, 100 y 100 % respectivamente, el volumen varió de 0.18, 1.08, 0.19 y 1.64 respectivamente; en la concentración: 9.2, 44.3, 36.3 y 107 millones/mm³ respectivamente; vitalidad de 4, 43, 55 y 59 % (Galindo y Garnica, 1995), estos estudios podrían indicar que la frecuencia copulatoria en época reproductiva podría ser una causa de baja fertilidad por agotamiento de las reservas espermáticas en los machos.

Duración de la cópula.- Las características del semen se relacionan con la duración de la cópula, esto ha sido descrito desde dos puntos de vista: Primero el cambio del tubo colector cada 5 minutos y segundo: La interrupción de la cópula a 5, 10, 15 y 20 minutos, en general no existen cambios considerables de volumen del eyaculado pero si existen cambios substanciales en la concentración y el porcentaje de espermatozoides vivos, la concentración se incremento a los 20 minutos de cópula, sumado a esto, la interrupción de la cópula incrementa el porcentaje de espermatozoides muertos cuando se interrumpe a partir de los 15 minutos, por lo que no se recomienda interrumpir la cópula ya que la última fracción del eyaculado parece ser la que lleva la mayor concentración de espermatozoides vivos (Bravo y Col., 2002)

Época.- Se sabe que la época así como la alimentación juegan un papel importante en la producción espermática y en la calidad del semen colectado de acuerdo a la época del año, esto en condiciones de la sierra sudamericana ya que gracias a la geografía se presentan estaciones marcadas, problema que no se presenta en el hemisferio norte por lo que no se orientan estudios hacia este tema; un reporte de la sierra argentina en llamas indica que la época juega un papel importante en la producción espermática, concentración y porcentaje de anormalidades, sobre todo de la cola, teniéndose buenas características seminales durante el verano y las anormalidades se incrementa durante el invierno (Giuliano y Col., 2006), en alpacas no se tiene un reporte escrito, pero se ha visto que en la colección de espermatozoides realizada mediante la técnica de la desviación de los conductos deferentes, ya que dicha técnica permite obtener semen a lo largo del año, se observo una disminución en la concentración y en la vitalidad de los espermatozoides, sobre todo en los meses de agosto y septiembre (Pérez, 2006, comunicación personal).

Edad.- En un trabajo realizado en llamas, para evaluar el efecto de la edad de los animales en las características seminales obtenidas mediante la técnica de la vagina artificial, se utilizaron llamas machos de 3, 4 y 5 años de edad, se determinó que esta característica no tiene influencia en las características seminales (Fernández y Col., 2003). En alpacas, la edad tiene un efecto muy sutil en la producción espermática, ya que las características mejoran ligeramente de acuerdo aumenta la edad, pero dicha diferencia no es significativa (Bravo, 2002; Quispe, 1987).

EVALUACION DE SEMEN

CARACTERISTICAS FISICAS

MACROSCOPICAS.- las características macroscópicas del semen de camélidos sudamericanos, entre las cuales se consideran volumen, color, aspecto y pH. Estas características del eyaculado dependerán del tipo de colección y de la manipulación, así como de las características fisiológicas de cada animal (cuadro 1).

Cuadro 1.- características macroscópicas del semen de camélidos sudamericanos

AUTOR	PECIE	MÉTODO DE COLECCION	LUMEN (ml)	COLOR	pH
Mogrovejo (1952)	paca	Funda vaginal.	.4-6.6	anco cristalino	5-8.8
Fernández Baca y Calderón (1966)	paca	Funda vaginal.	.2-3.5	anco cristalino	7.5
San Martín y Col. (1968)	paca	Esponja vaginal	.5-2.0	-	-
Sumar y Leyva (1981)	paca	Vagina artificial.	7-12.5	lanco lechoso	-
Quispe (1987)	paca	Vagina artificial.	.4-2.7	anco cristalino	-
Leyva y Col. (1984)	paca	Vagina artificial.	2.8	-	-
Cárdenas y Col. (1987)	paca	electroeyaculacion	± 0.47	-	.1 ± 0.2
Achata (1989)	paca	Vagina artificial.	35-4.3	anco cristalino	-
Sucapuca (1991)	paca	Preservativo	67-0.42	anco cristalino	7.32
Garnica y Col. (1993)	paca	Vagina artificial.	35-1.25	anco cristalino	-
Flores (1993)	paca	Vagina artificial.	54-2.65	lanco lechoso	-
Galindo (1995)	paca	Vagina artificial.	54-1.80	Blanco cremoso	-
Pérez (1997)	paca	Vagina artificial.	.4-4.5	anco cristalino	-
Bravo (1997)	paca	Vagina artificial.	.0-1.2	anco cristalino	-
Baca (1998)	paca	Vagina artificial.	.5-3.2	-	-
Rivera (1998)	paca	Vagina artificial.	.5-3.2	-	7.91
Verastegui (2001)	paca	Vagina artificial.	1.51	-	-
Mendoza (2000)	paca	Vagina artificial.	5-5.0-	lanco lechoso	-
Cuba (2000)	paca	Vagina artificial.	.1-4.3	-	-
Paricahua (2000)	paca	esviacion de Conductos Deferentes	.2-1.0	anco cristalino	7.88
Quintano (2001)	paca	esviacion de Conductos Deferentes	.2-1.0	Blanco transparente	-
Huanca y Gauly (2001)	paca	Vagina artificial.	09-1.4	-	-
Von Baer Helleman (1998)	ama	Vagina artificial.	3.5	-	8.6
Moscoso y Col. (1999)	ama	Vagina artificial.	.3-3.0	anco cremoso	-
Dávalos y Olazábal (2002)	paca	Vagina artificial.	.03 a 1.17	-	-
Aller y Col. (2003)	ama	Vagina artificial.	2.2	-	7.4
González y Copa. (2003)	ama	Vagina artificial.	0.55	anco cristalino	7.5
Fernández y Col (2003)	ama	Vagina artificial.	.1-3.2	anco cristalino	8.26
Delgado y Col. (2003)	ama	Vagina artificial.	.5-3.2	-	-

Kubisceck (1974)	paca	Fístula. uretral	1-21	-	-
------------------	------	------------------	------	---	---

MICROSCÓPICAS.- Las características microscópicas mas importantes que se evalúan en el semen son concentración, motilidad, vitalidad y porcentaje de anormalidades (cuadro 2).

Cuadro 2.- características microscópicas del semen de camélidos sudamericanos

AUTOR	METODO DE COLECCION	CONCENTRACION (ESP/mm³)	MOTILIDAD (%)	VITALIDAD (%)	FORMAS DESEMPEÑADAS (%)
Mogrovejo (1952)	Funda vaginal	63 000-107 600	-	-	1.23
Hernández Baca y Calderón (1966)	Funda vaginal	100 000 - 225 000	-	-	-
Kuviceck (1974)	fístula uretral	100 000-600 000	-	-	-
Sumar y Leyva (1981)	Vagina artificial.	600 000	-	-	-
Leyva y col. (1984)	Vagina artificial.	292 900	-	-	-
Cárdenas y Col (1987)	electroejaculación	384 705	8.2 ± 15.6	-	-
Cárdenas y col. (1987)	Vagina artificial.	843 230	30.6	-	-
Quispe (1987)	Vagina artificial.	1000 – 472 500	51.57	62.4	-
Sucapuca (1991)	Preservativo	83 750	-	7.58	-
Galindo (1995)	Vagina artificial.	211 - 107 000	-	1.57	18.5
De la vega (1996)	Vagina artificial.	17200	62.78	-	-
Pacheco (1996)	Vagina artificial.	77832	-	-	-
Pérez (1997)	Vagina artificial.	267 700	64.91	-	-
Bravo y col. (1997)	Vagina artificial.	1 800-72 400	80.0	72.05	6.03
Rivera (1998)	Vagina artificial.	163 300	53.92	4.15	-
Verastegui (2001)	Vagina artificial.	52 375	-	0.38	-
Mendoza (2000)	Vagina artificial.	264 700	20.18	-	9.90
Cuba (2000)	Vagina artificial.	75 000	-	7.84	-
Moscoso y col. (1999)	Vagina artificial.	131 000	52.3	16.6	-
Paricahua (2001)	Desviación de Conductos Deferentes	5 150 000	-	4.25	-
Quintano (2002)	Desviación de Conductos Deferentes	2 387 000	64.81	62.47	-
Huanca y Gaulty (2001)	Vagina artificial.	80 000	-	-	-
Von Baer y Helleman (1998)	Vagina artificial.	8 470 000	25.5	-	32.5
Dávalos y Olazábal (2002)	Vagina artificial.	280 000 a 5 750 000	2 a 68.9	4.3 a 72.1	-
Aller y col. (2003)	Vagina artificial.	7 520 000	54.3	68.5	-
Gonzales y Copa. (2003)	Vagina artificial.	2 870 000	25.7	31.8	-
Fernández y col. (2003)	Vagina artificial.	4 650 000	32.5	70.04	-

ALTERNATIVAS DE USO

Degelificación.- El semen de camélidos sudamericanos presenta la característica de tener gran viscosidad, lo que limita su manipulación, para esto se utiliza enzimas proteolíticas a fin de lisar el coágulo, pero estas enzimas tienen efectos negativos sobre la viabilidad de los espermatozoides; se utilizó cuatro enzimas: Fibrinolisisina, hialuronidasa, colagenasa y tripsina en la cantidad de 1 mg/ml de semen; se evaluó los efectos sobre la motilidad, vitalidad y la integridad del acrosoma; se obtuvo la destrucción del coágulo en un 100 y 99, 59 y 89, 88 y 36, 55 y 68 % para colagenasa, fibrinolisisina, hialuronidasa y tripsina respectivamente, tuvieron un efecto en la motilidad espermática en 4, 28,12 y 13 respectivamente para las enzimas; el efecto sobre la vitalidad fue de 7, 10, 23 y 18 % respectivamente para las enzimas, no teniéndose diferencias significativas en el daño acrosómico (Ccallo, 1996). También se puede utilizar tripsina y colagenasa para degelificar el semen (Bravo y Col., 1999).

La tripsina fue utilizada en la degelificación de semen de alpaca en una concentración de 1:250, presente en el tubo colector y después de la cópula, se evaluó la vitalidad de los espermatozoides en tres dilutores, encontrándose la efectividad de esta enzima para eliminar el coágulo, la vitalidad espermática fue de 62.9 % cuando la tripsina se añadió al semen post cópula y de 61.0 % cuando estuvo presente en el tubo antes de la colección, los dilutores presentaron los siguientes porcentajes de vitalidad a las 3 horas de incubación: PBS (12.5 %), leche descremada (7.5 %), y yema-glucosa-citrato (21.7 %) (Enríquez y col., 1997).

Pero un problema encontrado recientemente da cuenta del daño que pueden ocasionar las enzimas utilizadas en la licuefacción del eyaculado, es así que la tripsina, utilizada en una cantidad de 4 µg/ml por 3 min y luego 2 µg/ml, causan el desprendimiento de las cabezas espermáticas (25.04 con enzima y 9.06 sin enzima), no encontrándose diferencias significativas en otras características; este daño podría causar una disminución de la fertilidad de estos eyaculados tratados con enzimas (Poblete y Col., 2003).

Dilutores.- Muchos dilutores para semen han sido utilizados en programas de inseminación artificial en muchas especies domésticas; se ensayó varios dilutores para semen de alpacas, entre ellos leche descremada, PBS, glucosa-citrato, yema-glucosa-citrato, triladyl, tris, de todos estos el mejor dilutor encontrado fue el tris; en un estudio para probar la acción de tres dilutores y su evaluación después de 2 horas, se utilizaron PBS, leche descremada y glucosa-yema-citrato, obteniéndose 61.1, 60.8 y 64.0 % de espermatozoides vivos respectivamente en el momento de la colección, estos porcentajes disminuyeron después de dos horas de incubación en agua a 37° C a 22.2, 15.6 y 35.4% respectivamente y al evaluarlos después de 24 horas, la glucosa-yema-citrato obtuvo 70 % de

espermatozoides vivos, leche descremada tuvo 68% y glucosa citrato 60% (Bravo, 2002).

Otros dilutores probados en semen de alpaca colectado por vagina artificial fueron el PBS, citrato, tris y lardy + yema, la sobrevivencia de espermatozoides fue de 5, 4.48, 0.0 y 16.62% respectivamente, el lardy-yema disminuyó a 10.35 % a los 45 minutos (Mendoza, 2000).

El tiempo de sobrevivencia de espermatozoides colectados por vagina artificial es importante por lo cual se evaluó la acción de la yema de huevo en la conservación y la glicerina en la congelación, usados en diferentes concentraciones, encontrándose que la mejor proporción de yema de huevo es de 20 % ya que la glicerina a diferentes concentraciones no representa diferencia significativa, a las 18 horas se tuvo una sobrevivencia de 21.78 %, con un porcentaje inicial de 56.66% (Rivera, 1998).

Congelación y conservación.- El proceso de congelación necesita estabilizar la integridad de las células espermáticas para que no sean destruidas durante el transcurso de la congelación, es así que se evaluaron diversos dilutores para ser usados en la criopreservación de espermatozoides, encontrándose que el mejor dilutor para este fin es el tris (hidroximetil amino metano) (Bravo, 1998; Quintano, 2002). Es así que en un intento por mejorar las características seminales a la congelación/descongelación, se evaluó la acción de diferentes concentraciones de yema de huevo y de la glicerina, encontrando motilidad individual en semen conservado a 5° C de 72.3, 73.1, 64.7 % con 10, 20 y 30 : de yema de huevo respectivamente en alpacas y de 38, 42.5 y 47.6 % para llamas respectivamente, estos valores a la descongelación fueron para alpacas diluido con el 10 % de yema de huevo mas 2.5, 5.0 y 7.5 % de glicerina fue de 22.5, 27.7 y 34.4 % respectivamente, con 20 % de yema fue de 31.4, 39.2 y 41.0 respectivamente y con 30 % de glicerina fue de 32.4, 36.2 y 38.7% respectivamente, mientras que para llamas con 10 % de yema fue de 20.0, 18.0 y 19.5 % respectivamente, para el 20 % de yema fue de 31.3, 35.8 y 28.2 % y para 30 % fue de 34.6, 43.0 y 24.4 % respectivamente (Deza, H., 2004).

En la criopreservación de semen de llama utilizaron solo eyaculados con un mínimo de 75 millones de espermatozoides con no menos de 50 % de motilidad y se usa el dilutor yema+citrato+glucosa+glicerol (6 %)+DMSO (8 %), dividido en dos fracciones, el enfriado se realiza a una tasa de 0.25-0.25 °C/min hasta 5° C, equilibrándose por 45 minutos y luego el congelado a una tasa de 11° C/min hasta -50° C, 6° C/min hasta -80° C y 8° C/min hasta -120° C, en pajillas de 0.5 ml con aprox. 25 millones de espermatozoides por pajilla, a la descongelación se ve que se reduce significativamente la viabilidad: de 68.5 % a 32.4 %, y la motilidad: 54.3 a 20.4 %, la tasa de supervivencia espermática postdescongelación esta entre 20 a 25 % (Aller y Col. 2003).

En la congelación de semen de alpaca, realizando un lavado mecánico, pasándolo por una jeringa de tuberculina a presión, luego se realiza el congelado con motilidad precongelación del 60% (eyaculado intacto) y de 98 % (sometido a la acción mecánica), obteniéndose luego de la descongelación 15 y 20 % respectivamente (Valdivia y Col., 1999).

El peligro de contaminar el semen de llamas con dilutores que contengan proteína animal, por precaución de transmisión de enfermedades y microorganismos, es que se evaluó un dilutor basado en proteína vegetal (soya), denominado Biociphos plus, se le comparó con otros dilutores con proteína animal (yema), la motilidad precongelación del semen fue de 56 %, a la descongelación la motilidad con biociphos fue de 3.7 % y con los dilutores con proteína animal fue de 25 % (Bürgel y Gaulty 1999). Para el congelamiento de semen de llama bulbouretrectomizada, se evaluaron tres dilutores, tris + suero + yema + glicerina; PBS + suero + yema + glicerina y Dulbecco's + suero + yema + glicerina, obteniéndose motilidades post descongelación de 31.94, 36.18 y 38.8 % respectivamente y la vitalidad fue de 41.35, 37.02 y 44.86 %, por lo que el dilutor de elección para este tipo de eyaculado libre de la secreción de las glándulas bulbouretrales es el Dulbecco (González y Copa, 2003). Un último estudio para evaluar dos dilutores y dos crioprotectores en el congelamiento de semen de alpaca, concluyó que el dilutor con leche descremada+yema+glucosa y el crioprotector etilenglicol brindaron los mejores resultados y se recomienda su uso en la criopreservación de semen de alpaca (Santiani y Col., 2005). Ratto y Col., (1999) realizaron la comparación de tres dilutores en la refrigeración de espermatozoides epididimales, utilizando los dilutores: tris + fructosa + ácido cítrico + yema (20 %), leche descremada + glucosa y leche descremada + sales, realizando la colección de espermatozoides postmortem desde el epidídimo, se realizó el lavado de estos en solución TALP y centrifugados, se realizó el enfriamiento lento hasta 5° C y se mantuvo así por 72 horas, luego se calentaron en baño María por 3 minutos y fueron evaluados, el segundo dilutor fue el mejor ya que solo disminuyó su motilidad solo cerca de 10%, el primer dilutor causa una gran caída de la motilidad entre las 48 y 72 horas, mientras que el último dilutor causó una disminución de la motilidad en cerca de 50 %, se recomienda el uso del dilutor Kenney (leche descremada+glucosa) para ser utilizado en la conservación de espermatozoides colectados del epidídimo.

Para la conservación del semen refrigerado en llamas, se evaluó la acción de BSA+glucosa, desde una motilidad inicial de 57.6 %, descendió a 43.0 % a las 24 horas, hasta este porcentaje es aceptable para realizar la inseminación artificial, por lo que se recomienda su uso, a partir de las 24 horas la motilidad va descendiendo progresivamente (Huanca y Gaulty, 2001).

DISCUSIÓN

Existen una gran diversidad de métodos para colectar semen y/o espermatozoides en camélidos sudamericanos, cada método tiene sus propias ventajas y desventajas en relación a los demás métodos, si bien es cierto una gran cantidad de métodos nos permite elegir el mas conveniente de acuerdo a las condiciones de trabajo, las características seminales son muy diferentes y están íntimamente ligadas a factores como frecuencia de colección, época, etc., por lo que es muy necesario conocer estas características para poder elegir el método mas conveniente y preciso.

CONCLUSIONES

Las características particulares de la fisiología reproductiva de los camélidos sudamericanos dificultan los intentos de colectar semen de una forma segura y esta pueda hacerse rutinaria, la colección de semen en camélidos no se encuentra aun del todo investigada, además que los diferentes centros de investigación en camélidos sudamericanos no llegan a un acuerdo de cual de todas las técnicas es la más apropiada y así poder unificar esfuerzos para llegar a resolver este problema en la reproducción de los camélidos sudamericanos.

Los diferentes protocolos de colección, dilución y conservación se encuentran desarrolladas de acuerdo al tipo de colección de semen que se utiliza, aun así se encuentran siempre nuevos problemas y limitantes en su avance, causando un retraso en el mejoramiento de técnicas como la inseminación artificial, la cual se utiliza en otras especies en forma rutinaria, por todos estos problemas es necesario seguir investigando.

La conservación y el mantenimiento de la vitalidad de los espermatozoides ha sido mejorada en los últimos años con la ayuda de diversos dilutores utilizados en otros rumiantes, lo que ha mejorado enormemente los porcentajes de fertilidad encontrados en los diferentes trabajos de investigación realizados.

RECOMENDACIONES

Debido a esta gran diversidad de métodos de colectar semen en camélidos sudamericanos, se recomienda la elección de los métodos óptimos de acuerdo a la facilidad de su ejecución y a las mejores características seminales obtenidas para realizar la estandarización de sus protocolos en un intento de homogenizar los resultados obtenidos para poder ser empleados como métodos rutinarios, puesto que este semen y estos espermatozoides pueden ser utilizados en programas de inseminación artificial, congelamiento de semen, fecundación in Vitro, etc.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLER, J.F., REBUFFI, G.E., CANCINO, A.K. y ALBERIO, R.H. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch. Zootec. 52: 15-23.
2. BRAVO, W. 1998. Avances en la fisiología reproductiva del macho llama y alpaca. XXI Reunión Científica Anual APPA. FMVZ-UNA-Puno.
3. 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 Androl. Vol 43:239-246.
4. BRAVO, W., FLORES, D. and ORDOÑEZ, C. 2000 Effect of repeated collection on semen characteristics of alpaca. Biol. of Reprod. 57: 520-524.
5. BRAVO, W. SKIDMORE, J.A. and ZHAO X.X. 2000 reproductive aspects and storage of semen in camelidae. Anim. Reprod. Sci. 62: 173-193.
6. BRAVO, W. 2002. The reproductive process of South American camelids. Printed by Seagull Printing, Salt Lake City. USA.
7. BRAVO, W., MOSCOSO, R., ALARCON, V. y ORDOÑEZ. 2002. Ejaculatory process and related semen characteristics. J. of Androl. 48: 65-72.
8. BÜRCEL, H. y GAULY, E. 1999. criopreservación de llama (*lama glama*) semen. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco Perú.
9. BUSTINZA, V., 2001. La Alpaca, primera edición, Tomo I, Editorial Universitaria. Puno Perú.
10. CARDENAS, M., VIVANCO, M y BRAVO, W. 1987. comparación de dos métodos de colección de semen en alpacas. X Reunión científica anual del APPA. UNA - PUNO Perú.
11. CCALLO, M., 1996. Efecto de la fibrinolisis, hialuronidasa, colagenasa y tripsina sobre la viscosidad del semen de alpaca y llama. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
12. COPA, S., GONZALES, V. y MACEDA, E. 2003. técnica de bulbouretrectomía en llamas machos. III Congreso mundial de camélidos. Potosí Bolivia
13. DAVALOS, R. y OLAZABAL, J. 2002. Evaluación de dos formas de colección de semen en alpacas. Rev. Inv. Vet. Perú. 13 (2): 98-99.
14. DELGADO, P., FLORES, F., FERNANDEZ, R., GONZALES, V., MACEDA, E., COPA, S. y MEDINA, J. 2003. Técnicas de colección de semen en llamas. III Congreso mundial de camélidos. Potosí Bolivia.
15. DEZA, H. 2004. conservación de espermatozoides obtenidos a través del conducto deferente de alpacas (*lama pacos*) y llamas (*lama glama*) y su posterior viabilidad. Tesis FMVZ-UNA-Puno.
16. ENRIQUEZ, E., BRAVO, W. y ORDOÑEZ, C. 1997. Efecto de la tripsina y tres dilutores en semen de alpaca. Rev. Allpaka. Vol. 6, n1 Puno - Perú.
17. FERNANDEZ, R., COPA, S. y GUZMAN, J. 2003. Efecto de la edad y periodicidad de colección sobre las características macro y

- microscópicas del semen de llama. III Congreso mundial de camélidos. Potosí Bolivia
18. FERNANDEZ BACA, S. y CALDERON, M. 1966. métodos de colección de semen de la alpaca. Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM. 18-20: 13-26.
 19. FERNANDEZ BACA, S y NOVOA, C. 1968. primer ensayo de inseminación artificial de alpacas (*Lama pacos*) con semen de vicuña. Rev. Fac. Med. Vet. UNMSM. 22: 9-18.
 20. GALINDO, W. 1995. Efecto de eyaculaciones sucesivas sobre las características del semen de alpacas. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú
 21. GIULIANO, S., DIRECTOR, A., GAMBAROTTA, M., TRASORRAS, V. y MIRAGAYA, M. Características seminales de la especie llama glama: efectos del método de extracción, del macho utilizado y de la estación del año. Memorias del II Simposium internacional de investigaciones sobre camélidos sudamericanos. Arequipa Perú
 22. GONZALES, V y COPA, S. 2003. efecto de la bulbouresectomía y periodicidad de colección en las características macro y microscópicas del eyaculado en llamas (*Lama glama*). Camélidos, trabajos de investigación. Universidad católica Boliviana San Pablo. La Paz. Bolivia
 23. HUANCA, W. y GAULY, M. 2001. Conservación de semen refrigerado de llamas. Rev. Inv. Vet. Perú. 1: 460-464.
 24. JHONSON, L.R. 1989. Llama reproduction, en: Llama medicine. The veterinary clinics of north America. Food animal practice 5 (1) 159-182.
 25. KUBICECK, J. 1974. sanementnahme beim alpaka durch eine harnrihrenfistel. Z Tierzuechtung Zuechtungsbiologie 90: 335.
 26. MOGROVEJO, D. 1952. Estudios del semen de alpacas. Tesis FMV-UNMSM-Lima Perú.
 27. NEELY, D and BRAVO, W. 1995. Reproductive evaluation and infertility in the male llama and alpaca. In: Llama Theriogenology – Youngquist. Academy Press.
 28. PALOMINO, H. 1962. Espermiograma y dimensiones de los espermatozoides de la alpaca. Tesis Bach. FMV-UNMSM-Lima Perú.
 29. PARICAHUA, E. 2001. Evaluación del eyaculado sin la secreción de las glándulas anexas en alpaca. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
 30. POBLETE, P., VON BAER, A., VON BAER, L y DEL CAMPO, M. 2003. Evaluación de la morfología espermática del semen de camélidos sudamericanos tratado con tripsina. III Congreso mundial de camélidos. Potosí Bolivia.
 31. QUINTANO, J. 2002. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
 32. QUISPE, F. 1987. Evaluación de las características físicas del semen de la alpaca durante la época del empadre. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
 33. RATTO, M, WOLTER, M., GOMEZ, C y BERLAND, M. 1999. Refrigeration of epididymal sperm from llama with three different extenders. II Congreso Mundial sobre Camelidos. Cusco Perú.

34. RIVERA, E. 1998. Uso de la yema de huevo y la glicerina en la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
35. SAN MARTIN, F. 1961. Fisiología de la reproducción de la alpaca. An. Symp. Sobre problemas ganaderos. Lima Perú.
36. SANTIANI, A., HUANCA, W., HUANCA, T., SEPULVEDA, N. y SANCHEZ, R. 2005. Effects on the quality of frozen-thawed alpaca (*lama pacos*) semen using two different cryoprotectants and extenders. J. Androl. 7:303-309.
37. SOLIS, R. 1997. Producción de camélidos sudamericanos. Imprenta Ríos. Huancayo Perú.
38. SUCAPUCA, V., 1991 Características físicas del semen de la alpaca obtenido por el método del preservativo. Tesis FMVZ-UNA-Puno. Perú.
39. SUMAR, J. y LEYVA, C. 1981. Colección de semen mediante vagina artificial en la alpaca (*lama pacos*). Memorias del IV convención internacional sobre camélidos sudamericanos. Punta Arenas. Chile.
40. VALDIVIA, M., RUIZ, M., BERMUDEZ, L., QUINTEROS, S., GONZALES, A., MANSALVA, I., PONCE, C., OLAZABAL, J. y DABALOS, R. 1999. Criopreservación de semen de alpaca. II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco Perú.
41. VON BAER, L. y HELLEMANN M.V. 1998. Variables seminales en llamas. Arch. Med. Vet. 30 (2). Valdivia. Chile.