

## Evaluación de características microscópicas de espermatozoides de llama (*Lama glama*) tratada con bromelina fresca, crioconservados en dos dilutores

### Microscopic evaluation of llama sperm characteristics (*Lama glama*) treated with fresh bromelin cryopreserved in two dilutors

Delgado-Callisaya Pedro Angel <sup>\*1</sup> Parisaca-Mollericona, Veronica.<sup>2</sup> Delgado-Choque, Erick Jheicob.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Investigador área de ciencias agrícolas pecuarias y recursos naturales-UPEA.

Persona de contacto E-mail: \*Autor correspondiente. Cel.: 591-75832062

E-mail address \*: pedro.delgado@fulbrightmail.org

<sup>2</sup>Profesional Investigador independiente en Análisis laboratorial El Alto, Bolivia.

<sup>3</sup>Investigador independiente en Reproducción Animal "IZIP - UPEA". El Alto, Bolivia.

#### Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar las características microscópicas de semen de llama (*Lama glama*) crioconservados en dos dilutores. El estudio, se desarrolló en Kallutaca, de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UPEA, Se procesaron 30 eyaculados obtenidos mediante electroeyaculación de 12 llamas machos de diferentes edades. El semen fue mezclado en una proporción 1:1 con dilutor a base de AndroMed y jugo de piña (0.25:0.75). Los tratamientos fueron: AndroMed-Fixed y Tris-Yema-glicerol. Las variables evaluadas fueron: motilidad espermática (%) y vitalidad espermática (%). Al comparar las variables en el semen congelado-descongelado se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre dilutores, para motilidad espermática (%) y vitalidad espermática (%), obteniéndose una motilidad espermática posdescongelado de 33.52% y 27.09%. con AndroMed-Fixed y Tris-Yema-glicerol respectivamente, de la misma manera se obtuvo 52.58% y 49.38% para vitalidad espermática posdescongelado. Los resultados posdescongelacion muestran que es posible mantener espermatozoides crioconservados en ambos dilutores gracias al proceso previo a la congelación.

**Palabras clave:** espermatozoides llama, cinética espermatozoides llama, electroeyaculación.

#### Abstract

The objective of this research was to evaluate the microscopic characteristics of llama semen (*Lama glama*) cryopreserved in two diluents. The study, was developed in Kallutaca, of the career of Veterinary Medicine of the UPEA. 30 ejaculates obtained by electroejaculation of 12 male llamas of different ages were processed. The semen was mixed in a 1: 1 ratio with diluter based on AndroMed and pineapple juice (0.25: 0.75). The treatments were: AndroMed-Fixed and Tris-Yema-glycerol. The variables evaluated were: sperm motility (%) and sperm vitality (%). When comparing the variables in the frozen-thawed semen, significant differences were found ( $P < 0.05$ ) between diluters, for sperm motility (%) and sperm vitality (%), obtaining a post-frozen sperm motility of 33.52% and 27.09%. with AndroMed-Fixed and Tris-Yema-glycerol respectively, in the same way, 52.58% and 49.38% were obtained for post-frozen sperm vitality. Post-freeze results show that it is possible to keep cryopreserved sperm in both diluents thanks to the process prior to freezing.

**Key words:** morphometry-called sperm, sperm kinetic llamas, electroejaculation.

## Introducción

La crianza de llamas es muy importante para las regiones andinas de Bolivia (Cárdenas *et al.*, 1999).

Gran parte del territorio Alto Andino de Bolivia, tiene ptitudes para la crianza de llamas (Ratto *et al.*, 1999), empero apenas presenta un 6% en su crecimiento vegetativo anual (Bravo *et al.*, 2002), y apenas un 50% fertilidad y natalidad reportados por diferentes autores.

Los estudios realizados hasta la fecha sobre la reproducción en machos de llamas no son aún suficientes. La inseminación artificial ha contribuido al progreso genético en diferentes especies de animales como en bovinos y ovinos. En llamas hay muy poca información acerca de la mejor técnica de manipulación del semen en camélidos (Ferré & Werkmeister 1996).

La viscosidad del semen de llamas hace extremadamente difícil su manejo en el laboratorio. (Fernández-Baca y Calderón 1965).

La conservación espermatozoides requiere del uso de dilutores específicos para nutrir, controlar el pH y proteger de cambios de temperatura durante el proceso de crioconservación (Herrera 1986).

Se han utilizado varios dilutores para semen de llamas, entre estos están la leche, citrato-yema, Tryladil y tris buffer; de los cuales el que mas a resultado es el tris buffer (Bravo 1989), aunque hay muchos trabajos que no concluyen nada específico aún.

Por estas situaciones se diseñó este trabajo de investigación con los siguientes objetivos: determinar la motilidad y vitalidad espermática del semen de llama crioconservado en AndroMed y Tris-yema-glicerol).

## Materiales y métodos

### Localización de la investigación.

La investigación se realizó en los predios de Kallutaca de la Universidad Pública de El Alto (UPEA), ubicada a 16°31'28" de latitud sur y 68°20'39" de longitud oeste y una altitud de 3990 msnm (IGM 2005).

Se colectaron 30 muestras de semen de 12 llamas machos tipo intermedios de un promedio de 3, 4 y 5 años de edad. Cada grupo de edad se alojó en corrales de 18 m<sup>2</sup>. Se tuvo un periodo de adaptación de 30 días. Alimentandose a estas llamas con dietas controladas. Los dilutores se prepararon de acuerdo a lo recomendado por Delgado-Callisaya (2010). Se preparó AndroMed-fixed y Tris-yema-glicerol.

Se colectó semen dos veces por semana. Para la colección por electroeyaculación se tranquilizó por vía Intramuscular con 0.3 mg/kg peso vivo (PV) de Xilazina al 2 %, y 10 mg/kg PV intramuscular de Ketamina al 10 % (Giuliano *et al.*, 2008), los animales quedaban anesteciados después de 8 minutos, durando la colecta de semen un promedio de 30 min.

Se utilizó un Electroeyaculador desarrollado para camélido (Cruz y Delgado, 2011) adaptado a un pulsador de bovino (LANE MANUFACTURING-PULSATOR IV) colectándose de cubito ventral sobre una mesa de colección diseñada para camélidos. La técnica utilizada fue de acuerdo a las recomendaciones de Cruz y Delgado (2011). El total de pulsos para la electroeyaculación tuvo una duración de 8-10 min.

**Cuadro 1.** Componentes para la preparación de 50 ml de dilutor TRIS, usado para la conservación de semen de llamas (*Lama glama*)

Insumo	Cantidad
TRIS	1.817 g
Ácido cítrico	0.995 g
Fructosa	0.550 g
Gentamicina	120 g/ml
Yema de huevo	20%

**Fuente:** Delgado-Callisaya (2010).

El dilutor AndroMed®-fixed además de tener sus propios componentes (preparado con fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de alta pureza y antibióticos, como Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina y Lincomicina, Valle, 2013). Se adiciona 1.5% de glicerol al total de la mezcla, adicionándose esto solo en la fracción B y procesándose como con el Tris-Yema-Glicerol.

**Cuadro 2.** Componentes para la preparación de 100 ml AndroMed-Fixed, usado para la conservación de semen de llamas (*Lama glama*)

Insumo	Fraccion A	Fraccion B
AndroMed	10 ml	10 ml
AGUA DESTILADA	40 ml	40 ml
Glicerol	-	3 ml

**Fuente:** Elaboración propia.

Para disolver la viscosidad del semen de llama se utilizó la mezcla Jugo de piña (*Ananas comosus*) y AndroMed en una proporción de 75% y 25% respectivamente. La dilución utilizada entre dilutor a base de jugo de piña y semen de llama utilizada fue de 1:1 (1ml de dilutor a base de jugo de piña: 1 ml de semen colectado) para romper la viscosidad.

## Método de crioconservación

El congelamiento se realizó mediante vapores de nitrógeno colocando pajuelas llenas con semen diluido a 4 cm sobre el nivel del nitrógeno por 15 min, sumergiendo las pajuelas al nitrógeno líquido luego de este tiempo.

## Evaluación pre y post- descongelación

Después de la colección la cantidad eyaculada se valoró directamente, del tubo de colección.

La evaluación del color, se realizó por observación directa, en el tubo colector (Falcón), considerando para tal efecto tres tonalidades: cristalino, gris y lechoso, de acuerdo a Bustinza (2001).

Con el sistema ISASCASA se midió la concentración y motilidad en semen fresco, utilizando 10  $\mu$ L de semen diluido con jugo de piña en el portaobjetos y cubriéndose con una lámina cubreobjetos, llevándose luego al microscopio atemperado, para determinar el porcentaje de espermatozoides que presentan un movimiento progresivo (Delgado-Callisaya, 2010).

Para la determinación de espermatozoides vivos y muertos pre y post-descongelados se utilizó la técnica descrita por Evans & Maxwell (1987), usando tinción de Eosina-Nigrosina, colocándose en microscopio a 40x, contando 100 espermatozoides. Los espermatozoides muertos se tiñen con la Eosina (color rojo) en especial sus cabezas, mientras que los vivos permanecen incoloros (Torres 1989; Agraz 1989).

## Análisis Estadístico

Se aplicó el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), y la prueba de Duncan a 5% de significancia.

Se determinó las variables macroscópicas y microscópicas de semen fresco: Volumen, Color, Concentración espermática (millones/ml), Motilidad espermática (%), Vitalidad espermática (%)

En el semen crioconservado y descongelado se midió variables microscópicas: Motilidad espermática (%), Vitalidad espermática (%), Espermatozoides anormales (%).

## Resultados y discusiones

### Evaluación de características macroscópicas y microscópicas de semen fresco.

Mediante electroeyaculación se logró colectar un volumen promedio de  $1.56 \pm 0.25$  ml de semen de llama. El color más usual colectado fue el blanco lechoso. Al valorar la concentración espermática se determinó  $38.22 \times 10^6 \pm 11.67$  espermatozoides/ml. Los espermatozoides mostraron  $28.78 \pm 7.4$  y  $88.27 \pm 5.29\%$  de motilidad y vitalidad respectivamente.

El volumen de semen de nuestras llamas colectado por electroeyaculación fue similar al descrito por Giuliano et al. (2008), Cruz y Delgado (2011), quienes obtuvieron 1.61 ml y 1.4 ml respectivamente, utilizando también electroeyaculación.

El color blanco translucido fue el más usual utilizando el método de electroeyaculación, este mismo color fue reportado por Cruz y Delgado-Callisaya (2011). Al respecto Bustinza (2011) menciona que la concentración de espermatozoides puede predecirse por su color (Bustinza 2001).

Se obtuvo una concentración  $38.22 \times 10^6 \pm 11.67$  espermatozoides /ml, similar a los reportes de

Giuliano et al. (2008), Cruz y Delgado-Callisaya (2011) ( $33.01 \times 10^6$  y  $29.00 \times 10^6$  espermatozoides/ml respectivamente).

En una investigación sobre colección de llamas (*Lama glama*) en la UMSA, se obtuvo un volumen de 1.56 ml con vagina artificial (AV) y 0.25 ml con electroeyaculación (Valle, 2013) indicando que con electroeyaculación siempre hay menor volumen colectado que con vagina artificial.

Investigadores como Chiri (2002), mencionan que la cantidad de eyaculado dependerá no solo de la edad, sino del estado nutricional y confort medioambiental, los cuales afectan en la obtención de un buen volumen de eyaculado, por lo cual siempre son mas voluminosas en época húmeda.

Se determinó  $28.78 \pm 7.4\%$ , de motilidad espermática en esta investigación que es relativamente similar a otros trabajos donde se colectó por electroeyaculación como el de Giuliano et al. (2008), Enciso (2009) y Valle (2013) (28%, 46.08% y 53.95% respectivamente). El plasma seminal, posee una filancia muy característica lo que la hace altamente viscosa (parecido a la clara de huevo), que dificulta la motilidad de los espermatozoides.

Un dato interesante es la presencia de 86.67% de espermias vivos, dato que supera a resultados obtenidos por Cruz (2011) y Valle (2013), (67.25% y 60.83% respectivamente).

Esto puede deberse al control estricto de factores los externos al momento de la colección y al procedimiento de valoración de vitalidad que fue rigurosamente desarrollado en función a su protocolo.

Evaluación de parámetros post incubación con jugo de piña y Andromed

El semen de llama que fue colectado y valorado, se trato con dilutor a base de jugo de piña (0.75:0.25

jugo de piña y AndroMed respectivamente) y semen de llama a una proporción de 1:1 (1ml de dilutor a base de jugo de piña: 1 ml de semen colectado) para romper la viscosidad. Lográndose  $71.48 \pm 2.4\%$  de motilidad y  $84.49 \pm 9.32\%$  de vitalidad respectivamente.

Evaluación de características microscópicas de semen criopreservado descongelado.

De acuerdo al ANVA hay diferencias significativas entre la motilidad de espermatozoides de llama criopreservados en los dilutores Andromed-Fixed y Tris-Yema-glicerol ( $P=0.002$ ). El coeficiente de variación entre datos fue de 12.46%. Mediante la prueba Duncan se determinó que el dilutor AndroMed-Fixed mantiene 33.52% de motilidad espermática (después de la criopreservación y descongelación) mejor que el dilutor Tris-Yema-glicerol, con el cual solo se encontró un promedio de 27.09%.

Podemos deducir comparando con trabajos anteriores, que el dilutor AndroMed no cuenta con una adecuada concentración de glicerol para semen de camleidos y que de alguna manera la lecitina de soya que es parte del AndroMed no protege al igual que la yema de huevo que posee el dilutor Tris-Yema-glicerol. Al respecto Salomón & Maxwell (2000) mencionan que la yema de huevo preserva mejor el semen durante el proceso de refrigeración y protege a los espermatozoides contra el choque al frío durante el congelamiento y descongelamiento.

Autores como Giuliano et al., (2008) y Bravo et al., (2002), demuestran que los diluyentes a base de Lactosa-yema de huevo o TRIS-ácido cítrico reflejan ser mejores para preservar a los espermatozoides de llamas y alpacas.

La motilidad espermática tratado con jugo de piña al momento del proceso de enfriado se mantuvo alrededor de 71% de motilidad.

Luego de la descongelación el 33.52% de espermatozoides aún estaban motiles con AndroMed-Fixed y 27.09% con Tris-Yema-glicerol, estos valores muestran un descenso de más del 50% de espermatozoides motiles. Esto puede atribuirse al tiempo del proceso de criopreservación del semen, es decir a medida que pasa el tiempo la calidad seminal disminuye (Delgado-Callisaya et al., 2003).

Aller *et al.* (2003), valorando la influencia de la criopreservación sobre la motilidad, de espermatozoides de llama (*Lama glama*) observaron que los espermatozoides motiles disminuyen contundentemente de  $54.3 \pm 10.5$  en muestras de semen fresco a  $20.4 \pm 7.5$  en muestras descriegadas. Investigaciones utilizando diferentes concentraciones de trealosa en la congelación de semen camleido mostraron un promedio de 4.74% de motilidad espermática posdescongelación (Aisen et al., 2012).

Watson (2000) señala que los espermatozoides criopreservados presentan una gran disminución en la proporción de espermatozoides móviles encontrándose posdescongelación una pérdida de 40 a 50% de motilidad.

En cuanto a la vitalidad, al determinar que antes de la congelación el semen poseía un promedio de 84% de vitalidad. Luego del procedimiento de criopreservación y descongelación se determinó que el 52.58% de espermatozoides aún están vivos con AndroMed-Fixed y 49.38% con Tris-Yema-glicerol, a pesar de que estadísticamente no hay diferencia ( $P>0.05$ ) entre estos dilutores para mantener células vivas, esta variación podría deberse al estrés osmótico y formación de hielo intracelular. Salomón (2011), indica que pocos espermatozoides vivos se deben a: cambio de temperatura, estrés osmótico, formación de particular congeladas a nivel de citoplasma celular y e intoxicación de estas células por los componentes de los dilutores.

Tanto la reducción de temperatura como la elevación súbita de este, produce un estrés en la membrana, relacionado con un cambio de fase en los lípidos. Las lesiones producidas en las membranas celulares antes y durante el congelamiento son irreversibles después del descongelamiento. El glicerol al ser tóxico también produce la muerte de los espermatozoides.

Santalla (2013), utilizando cuatro dilutores para conservación espermática de llama (*Lama glama*), reportó que el dilutor tris-yema-glucosa mantuvo una mayor vitalidad de los espermatozoides, ya que este dilutor contenía como fuente energética a la glucosa, el cuál es utilizado por los espermatozoides para la producción de ATP.

Aller *et al.*, (2003), observaron que los espermatozoides vivos disminuyeron drásticamente desde  $68.5 \pm 12.3\%$  en semen fresco a  $32.4 \pm 10.5\%$  en muestras descriegadas.

### Conclusión

Las particularidades reproductivas de los camélidos sudamericanos dificultan la homogenización de una técnica práctica para coleccionar semen de una forma segura. Muchos centros de investigación en camélidos sudamericanos no ofertan una técnica apropiada para colección de semen. La técnica de electroeyaculación aún no está bien perfeccionada por la gran variabilidad de datos en diferentes investigaciones. El mayor tiempo de refrigeración y estabilización afecta negativamente en el porcentaje de motilidad de espermatozoides de llama.

La filancia del semen de camélidos no permite un buen manejo del semen, impidiendo que los espermatozoides sean procesados adecuadamente, por lo tanto se necesita desarrollar un tratamiento enzimático que posibilite el manejo de las muestras de semen a criopreservar, cuidando de que no dañe

a los espermatozoides en su integridad morfológica ni de movimiento. Hasta la actualidad no hay un protocolo de criopreservación de semen de llamas y alpacas adecuado por lo que aun es necesario investigar sobre este tema.

### Bibliografía

- Aisen EG, Bérnago NS, Medina VH, Martínez CY, Vagnoni YC. 2012. Efecto de la trehalosa en la congelación de semen de llama. Parámetros de integridad espermática in vitro. IV Congreso Mundial de Camelidos Sudamericanos. Arica. Chile. p 118.
- Aller JF, Rebuffi GE, Cancino AK, Alberio RH. 2003. Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (*Lama glama*). Arch Zootec. 52: 15-23.
- Bravo PW, Flores U, Garnica J, Ordoñez C. 1997a. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. Theriogenology. 47: 619-626.
- Bravo PW, Moscoso R, Alarcón V, Ordóñez C. 2002. Ejaculatory process In: Johnson LW (eds) Update on Llama Medicine. Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice WB Saunders, Philadelphia. p. 100-132.
- Chiri R. 2002. Producción de Camélidos Sudamericanos. Oruro - Bolivia.
- Cruz A, Delgado-Callisaya P. 2011. Desarrollo de un electroeyaculador para llamas (*Lama glama*) en el Departamento de La Paz. [tesis licenciatura]. Zootecnia-Unidad Académica Campesina Tiahuanacu. La Paz, Bolivia.
- Delgado-Callisaya P, Flores F, Fernández R, González V, Maceda E, Copa S, Medina J. 2003. Técnicas de colección de semen en llamas. III Congreso mundial de camélidos. Potosí Bolivia.
- Delgado-Callisaya PA. 2010. Apuntes de maestría. Arkansas of University. Arkansas – USA.
- Fernández-Baca S, Calderón W. 1965. Métodos de colección de semen de la alpaca. Rev Fac Med Vet Perú. 20: 13-17.

- Garabito A. 2003. Evaluación física de semen en llama (*Lama glama*) q'hara y tampulli. [tesis licenciatura] Oruro. Universidad Técnica de Oruro. Bolivia. p. 90-93.
- Giuliano S, Director A, Gambarotta 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.
- Gonzales H, Dávalos R, Moina M, Mellisho E. 2008. Obtención y criopreservación de espermatozoides de alpacas. *Scientia.* 10: 223-234.
- Hafez E. 1996. Reproducción e Inseminación Artificial en Rumiantes, 6ª ed. en castellano. Edit. McGraw-Hill. p 300-330.
- Herrera E. 1986. Evaluación de dilutores para la conservación de semen en ovinos. Tesis de Bachiller. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Univ. Nacional del Altiplano. Puno. p 72.
- López J. 2001. Evaluación de la morfología espermática del semen de camélidos sudamericanos tratado con tripsina. III Congreso mundial de camélidos. Potosí.
- Mendoza O. 2001. Determinación de la sobrevivencia de los espermatozoides de alpaca (*Lama pacos*) colectados del conducto deferente con el uso de tres dilutores. [tesis licenciatura] Puno. Perú.
- Ratto M, Wolter M, Gómez C, Berland M. 1999. Refrigeration of epididymal sperm from lama with three different extenders. En: II Congreso Mundial sobre Camélidos. Cusco, Perú.
- Ruiz JA. 2005. Comercialización de productos y subproductos de la explotación de camélidos sudamericanos. Resumen de conferencia. IV Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. Curitiba-Brasil.
- Salomón A. 2011. Capacitación del espermatozoide caprino durante el proceso de estabilización pre crioconservación. Veracruz-México.
- Salomon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen, *Anim Reprod Sci.* 62: 77-111.
- Santalla IS. 2013. Viabilidad espermática del semen de llama (*Lama glama*) refrigerado en cuatro dilutores. [tesis licenciatura]. La Paz. Zootecnia. Unidad Académica Campesina Tiahuanacu. La Paz: Bolivia.
- Valle EM. 2013. Evaluación de dos técnicas de colección de semen en llamas (*Lama glama*) en la Estación Experimental de Choquenaira. [tesis licenciatura]. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia. p. 162.
- Vaughan J. 2003. Improving the efficiency of reproduction and breeding in alpacas. Rural Industries Research and Development Corporation, Barton. Australia. p. 20.
- Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Repro Sci.* 60- 61: 481-49