

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DE ESPERMATOZOIDES DE LLAMA (*Lama glama*) TRATADA CON 3 CONCENTRACIONES DE BROMELINA, CRIOCONSERVADOS EN UN DILUTOR COMERCIAL READECUADO

MICROSCOPIC CHARACTERISTICS OF LLAMA SPERM (*Lama glama*) TREATED WITH 3 CONCENTRATIONS OF BROMELAIN CRYOPRESERVED IN A COMMERCIAL READJUSTED EXTENDER

Delgado-Callisaya Pedro Angel *1 Bustos-Fernández Franz2 Delgado-Choque, Erick Jheicob.3
1Profesional Investigador Reproducción Animal Ingeniería Agronómica -UPEA El Alto, Bolivia.

*Autor correspondiente.

Contacto oficial: *: pedro.delgado@fulbrightmail.org Cel.: 591-75832062

2Profesional Investigador Reproducción Animal CEAC- UTO Oruro, Bolivia.

3Investigador independiente en Reproducción Animal "IZIP - UPEA". El Alto, Bolivia.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar las características microscópicas de espermatozoides de llama (*Lama glama*) tratada con 3 concentraciones de bromelina, crioconservados en un dilutor comercial readecuado. La investigación fue desarrollada en los predios del CEAC de la Universidad Técnica de Oruro. Se procesaron 45 eyaculados obtenidos mediante electroeyaculación de 15 llamas machos de 5 años de edad. El semen fue mezclado en una proporción 1:1 con dilutor a base de AndroMed y 60, 70 y 80% de bromelina procesada. Luego de la destrucción de la viscosidad y filancia se diluyó el semen tratado con AndroMed readecuado. Se midió la motilidad espermática (%) y vitalidad espermática (%) antes y después de la criopreservación. Se obtuvo una motilidad espermática de 79.08% y 86.93% de espermatozoides vivos antes de la congelación. Luego de la crioconservación se logró una motilidad espermática de 43% y 55% de espermatozoides vivos, utilizando 80% de bromelina. Los resultados posdescongelación muestran que es posible mantener espermatozoides crioconservados adecuadamente gracias al porcentaje de bromelina usado y el dilutor readecuado.

Palabras clave Crioconservación espermatozoides llama, motilidad, bromelina, filancia.

Abstract

The objective of this research was to evaluate the microscopic characteristics of llama sperm (*Lama glama*) treated with 3 concentrations of bromelain, cryopreserved in a commercially readjusted dilutor. The research was developed on the CEAC premises of the Technical University of Oruro. 45 ejaculates obtained by electroejaculation of 15 male 5-year-old llamas were processed. The semen was mixed in a 1:1 ratio with AndroMed-based dilutor and 60, 70 and 80% processed bromelain. After the destruction of the viscosity and filancy, the semen treated with readjusted AndroMed was diluted. Sperm motility (%) and sperm vitality (%) were measured before and after cryopreservation. A sperm motility of 79.08% and 86.93% of live sperm were obtained before freezing. After cryopreservation, sperm motility of 43% and 55% of live sperm was achieved, using 80% bromelain. Post-defrosting results show that it is possible to maintain cryopreserved sperm properly thanks to the percentage of bromelain used and the re-adapted dilutor.

Keywords Cryopreservation sperm llama, motility, bromelain. Filancy.

1. Introducción

Gran parte del territorio Alto Andino de Bolivia, tiene aptitudes para la crianza de llamas (Ratto et al., 1999), sin embargo, la gente que produce estos animales reporta en su producción apenas un 6% en su crecimiento vegetativo anual (Bravo et al., 2002).

sobre la fisiología y manipulación reproductiva en llamas machos, no son aún suficientes. Técnicas como 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).

Apesar de haberse hecho varias investigaciones

La naturaleza viscosa 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 utilizaron 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 tal razón se diseñó este trabajo de investigación con los siguientes objetivos: determinar la motilidad y vitalidad espermática en el semen de llama tratado con tres concentraciones de bromelina luego de ser crioconservado en AndroMed corregido.

2. Materiales y métodos

2.1 Localización de la investigación.

La investigación se realizó en los predios del Centro Experimental Condoriri de la Universidad Técnica de Oruro (UTO), El CEAC está ubicado a 49 km, de la ciudad de Oruro y a 12 km, al norte de la localidad de Caracollo. Se encuentra a una altura de 3.830 m.s.n.m., a 17°31'41" de altitud sur y 67°14'02" de longitud oeste (IGM 2005).

Se colectaron 45 muestras de semen de 15 llamas machos tipo Q'ara de un promedio de 4 años de edad y un peso vivo promedio de 150 kg. Todos los animales se mantuvieron en un corral común. Alimentándose a parte de la pradera nativa con suplementos a base de afrecho y minerales. El dilutor se preparó de acuerdo a lo recomendado por Delgado-Callisaya (2010) y Delgado-Choque (2018) Se preparó AndroMed-corregido y Tris-yema-glicerol.

Se colectó el semen de las llamas en un ritmo de una vez por semana. Se utilizó la técnica de electroeyaculación para la colección de muestras seminales. Para esto 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; Delgado, 2018), los animales quedaban anestesiados después de un promedio de 10 minutos después de inyectado estos fármacos, la anestesia tuvo una duración promedio de 30 minutos en este tipo de animales.

Para la colección como tal, se perfeccionó un transductor para las pulsaciones con las características más apropiadas en liberación de voltaje y potencia (Delgado, 2018) adaptado a un pulsador de bovino (PORVAC Modelo e-320 Argentina) sujetándose al ejemplar sobre una mesa de cubito ventral sobre una mesa de colección diseñada para camélidos. La técnica fue readecuada y mejorada de acuerdo a las recomendaciones de Cruz y Delgado (2011). El total de pulsos para la electroeyaculación tuvo una duración de 8-10 min.

Tabla 1. Componentes para la preparación de 100 ml AndroMed-readecuado, usado para la conservación de semen de llamas (*Lama glama*)

Insumo	Fracción A	Fracción B
AndroMed	10 ml	10 ml
Agua destilada	40 ml	37 ml
Glicerol	-	3 ml

glama)

Fuente: Elaboración propia

El dilutor AndroMed®-readecuado 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 el cual se adiciona después de dos horas de equilibrio y a 5oC en 4 fracciones cada 15 min.

Se mezcló 100 mg de bromelina procesada con 10 mL de agua destilada a 20 C° para que se homogenice adecuadamente (Gonzales, 2015). Se realizó la dilución de la bromelina procesada con las siguientes concentraciones.

60% y 40%; 70% y 30%; 80% y 20% de bromelina procesada con Andromed respectivamente.

Una vez diluido adecuadamente en el dilutor readecuado el semen de llama fue empajillado en pajuelas de 0.5 ml y estabilizado a 5 oC durante 2 horas, luego de los cuales se vertió nitrógeno en una caja de poliestireno expandido (Tecnopor). las pajuelas fueron colocadas dentro de la caja de Tecnopor a 4 cm sobre el nivel de nitrógeno líquido durante 10 min luego de los cuales se introdujo todas las pajuelas dentro de nitrógeno líquido. La evaluación de pajuelas se hizo después de 7 días después de la crioconservación.

2.2 Análisis Estadístico

Se utilizó el Diseño de Bloques Completamente al Azar (DBCA), donde los bloques fueron los reproductores usados y los tratamientos fueron las tres concentraciones de bromelina. 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 (%).

3. Resultados y discusiones

3.1 Evaluación de características macroscópicas y microscópicas de semen fresco.

Mediante electroeyaculación se logró colectar un volumen promedio de 2.26 ± 0.35 ml de semen de llama. El color más usual colectado fue el blanco lechoso. Al valorar la concentración espermática se determinó $78.22 \times 106 \pm 12.65$ espermatozoides/ml. Los espermatozoides mostraron 32.25 ± 8.6 y $87.55 \pm 5.29\%$ de motilidad y vitalidad respectivamente.

El volumen de semen de nuestras llamas colectado por electroeyaculación fue relativamente mayor 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 que se presentó con más frecuencia fue el blanco translucido esto mediante 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 $78.22 \times 106 \pm 12.65 \times 106$ espermatozoides /ml, superior a a los reportes de Giuliano et al. (2008), Cruz y Delgado-Callisaya (2011) (33.01×106 y 29.00×106 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. El volumen de semen colectado en esta investigación puede deberse al tamaño de los reproductores usados, pues ninguno de ellos tenía un peso menor a 150 Kg de PV, también puede deberse a un eficiente estímulo antes de la colecta utilizando para esto dos hembras estrogenizadas.

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 más voluminosas en época húmeda.

Se determinó $32.25 \pm 8.6\%$, 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 de las llamas posee una consistencia y filancia muy característica lo que la hace altamente viscosa (similar a la clara de huevo), que dificulta la motilidad de los espermatozoides.

Un dato interesante es la presencia de 87.55% de espermias vivos, dato que supera a resultados obtenidos por Cruz (2011) y Valle (2013), (67.25% y 60.83% respectivamente).

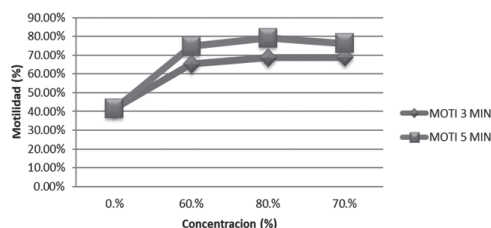
Este alto porcentaje de espermias vivos puede deberse a un eficiente control de los factores externos al momento de la colección y al procedimiento de valoración de vitalidad inmediatamente después de su colección.

3.2. Evaluación de parámetros microscópicos post incubación con 3 concentraciones de bromelina procesada y Andromed readecuado antes de la criopreservación.

Porcentaje de espermias motiles antes de la congelación

El semen de llama que fue colectado y valorado, se trató con los tratamientos 60, 70 y 80 % de bromelina para romper la viscosidad. Luego de 5 minutos de incubación se obtuvo los siguientes promedios: 74.67, 76.25 y 79.08 % de motilidad (para 60, 70 y 80% de bromelina respectivamente). Estadísticamente con 80% de bromelina y un tiempo de 5 min de incubación se logra la mayor proporción de motilidad

Figura 1. Motilidad de espermatozoides de llama después de 3 y 5 min de incubación con 60, 70 y 80% de bromelina



Porcentaje de espermatozoides vivos antes de la congelación

De acuerdo al análisis de ANOVA el porcentaje de espermatozoides vivos no presentó diferencia estadística. El promedio de espermatozoides vivos fue de 86.93 %

3.2 Evaluación de características microscópicas de semen criopreservado tratado con 3 concentraciones de bromelina y descongelado después de 7 días.

Porcentaje de espermatozoides motiles después de la congelación

De acuerdo al ANOVA hay diferencias significativas ($P=0.011$) entre la motilidad de espermatozoides de llama tratados en 3 concentraciones de bromelina y criopreservados en diluyente Andromed readequado. El coeficiente de variación entre datos fue de 15.12%. Mediante la prueba Duncan se determinó que los espermatozoides tratados con la concentración de 80% de bromelina muestran una motilidad de 43 % superior a la motilidad de los espermatozoides tratados con bromelina al 60 y 70% que tuvieron promedios de motilidad similares (37 y 40 % de motilidad para 60 y 70% de bromelina respectivamente) post descongelación.

Con los datos logrados podemos inferir que mientras más se mueven los espermatozoides indican que mayor fue la liberación de la Mucina B que ocasiona la viscosidad del semen de llamas y que recubre a los espermatozoides impidiendo su movimiento, pero también impidiendo que los crioprotectores recubran la membrana celular de los espermatozoides, deduciendo que si no hubo buena liberación no habrá buena crioprotección de los espermatozoides.

El diluyente Andromed no cuenta con una adecuada concentración de glicerol para semen de camélidos y que de alguna manera la lecitina

de soja que es parte del Andromed no protege al igual que la yema de huevo, por lo que el readequar este diluyente fue completamente favorable para los espermatozoides de llama.

Salomón & Maxwell (2000) mencionan algunos crioprotectores que se tienen en la yema de huevo preservan 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 tratada con jugo de piña al momento del proceso de enfriado se mantuvo alrededor de 71% de motilidad.

En otro trabajo anterior a este se obtuvo que 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 ± 10.5 en muestras de semen fresco a 20.4 ± 7.5 en muestras descariogenizadas. Investigaciones utilizando diferentes concentraciones de trealosa en la congelación de semen camélido mostraron un promedio de 4.74% de motilidad espermática post descongelación (Aisen et al., 2012).

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

Porcentaje de espermatozoides vivos después de la congelación

Luego del procedimiento de criopreservación y descongelación se determinó mediante el ANOVA que hubo diferencia estadística entre los tratamientos utilizados para esta variable. ($P=0.02$). la prueba Duncan determinó que el

promedio de espermatozoides vivos utilizando 80 y 70% de Bromelina fue similar ($P>0.05$) (55.63 53.56% de espermatozoides vivos para 80 y 70% respectivamente), los espermatozoides vivos de las pajulelas con 60% de bromelina solo lograron 43% de espermatozoides vivos. 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 protege al espermatozoides expulsando el agua intracelular, pero necesita un tiempo mínimo de 2 horas para ingresar dentro de la célula completamente y así poder proteger a los componentes celulares internos de la criogenización.

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 descrogenizadas.

4. Conclusiones

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.

El uso de 80% de bromelina para destruir la viscosidad es adecuado ayudando a la motilidad espermática y no daña a los espermatozoides en su integridad morfológica ni de movimiento.

El protocolo de criopreservación utilizado con Andromed readecuado logra casi el 50 % de

espermatozoides vivos.

Hasta la actualidad no hay un protocolo de criopreservación de semen de llamas y alpacas adecuado por lo que aún es necesario investigar sobre este tema.

5. 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, Ordoñez 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.

Gonzales M. (2015). Efecto de tres concentraciones de bromelina procesada y comercial sobre la filancia y las características microscópicas de semen de llama (*Lama glama*) en la estación experimental Callutaka. Tesis de grado MVZ-UPEA-La Paz. Bolivia.pp.44

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 Reprod Sci.* 60-61: 481-492